تاثیر درجه حرارت دوره تخم‌پروری بر تکامل جنین و لارو ماهی جنگجو (*Betta splendens*)

- **محمد نوید فرصت‌کار**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ٤١١١
- **محمد علی نعمت‌اللهی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ٤١١١

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۱

چکیده

تغییرات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی مهمی در مراحل ابتدایی تکوین ماهیان اتفاق می‌افتد. این مطالعه با هدف بررسی تکوین جنینی ماهی جنگجو، *Betta splendens* در سه دمای مختلف (۲٤،۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) تا زمان شنای آزاد لاروها انجام شد. عملیات تکثیر و تخم‌ریزی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و سپس تخم‌ها خارج شده و به تانک‌های حاوی آب با دمای مورد نظر انتقال داده شدند. تخم‌های تازه لقاح یافته حدود ۰/۸ میلی‌متر طول داشتند، سفید رنگ و از نوع تخم‌های ته‌نشین‌شونده بودند. نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شده و از آن‌ها عکس‌برداری شد. کم‌ترین زمان برای رسیدن به هریک از مراحل تکوین (مرحله دو سلولی، ۳۲ سلولی، ٦٤ سلولی، مرحله میانی بلاستولا، ٪۵۰ اپی‌بولی، تشکیل جوانه دمی، شروع ضربان قلب، تفریخ، باز شدن دهان و شروع شنای فعال) به ترتیب در دماهای ۲٤،۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثبت شدند. براساس میزان تفریخ و سرعت رشد جنین، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بهترین دما برای تکثیر ماهی جنگجو می‌باشد.

کلمات کلیدی: ماهی جنگجو، تکامل جنین، لقاح، درجه حرارت

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:malahi@ut.ac.ir

مقدمه

تکامل جنین فرآیندی پیچیده بوده که در آن ازدیاد و تمایز سلولی هم‌زمان ولی با سرعت متفاوت اتفاق می‌افتد (۵). در این فرآیند، براساس تعیین دقیق زمان مراحل توسعه‌ای جنین (از قبیل زمان باز شدن دهان یا زمان تفریخ) در یک دمای معین، می‌توان نقاطی کاربردی برای تعیین سن جنین به‌دست آورد (۲). به این علت که اغلب ماهیان خونسرد هستند، بنابراین کارکردهای بیولوژیک آن‌ها به دمای محیطی که در آن زندگی می‌کنند، بستگی زیادی دارد (۵). با افزایش دما نرخ فعالیت و متابولیسم بدن نیز افزایش می‌یابد اما این افزایش در نرخ تکامل جنین‌ها تنها در محدوده دمایی قابل قبول اتفاق می‌افتد. به‌طور کلی دامنه دمایی قابل تحمل در مراحل اولیه زندگی ماهیان نسبت به افراد بزرگ‌تر، محدودتر است (۶). مشخص شده است که درجه حرارت تاثیر زیادی بر جنبه‌های مختلف تکامل اولیه ماهیان دارد: تفریخ و شروع اولین تغذیه (۱و ۳)، بازده مصرف زرده و اندازه و وضعیت بدن در اولین تغذیه (۱۹). واکنش‌های فیزیولوژیکی فوق، نقش مهم درجه حرارت را بر فرآیندهای متابولیکی نشان می‌دهند. علاوه بر آن، هر عامل بالقوه که بتواند شرایط محیطی را تغییر دهد، می‌تواند بر سیستم فیزیولوژیک ماهی تاثیرگذار بوده و به‌عنوان مثال تکامل جنین و لاروها را دگرگون کند؛ از این عوامل می‌توان به شوری (۲۱)، فلزات سنگین (۱۱) و اکسیژن (۱۴) اشاره نمود.

ماهی جنگجو *Betta splendens*، یکی از اعضای خانواده ماهیان لابیرنت‌دار (Belonitiidae) است. نام علمی آن برگرفته از زیبایی خیره کننده رنگ‌های آن به اضافه بروز رفتارهای خشونتی در جنس نر می‌باشد (۱۶). در بین ماهیان لابیرنت، ماهی جنگجو به‌صورت تجاری براساس رنگ‌بندی خاص و شکل باله‌ها تکثیر و پرورش داده می‌شود که البته منشا آن از جنوب شرقی آسیا است. آبگیرهای آب شیرین کم‌عمق با بستری گلی یا مناطق پوشیده از گیاه را برای سکونت و تولیدمثل ترجیح می‌دهد (۹). این ماهی قادر است با کمک اندام لابیرنت، اکسیژن هوا مستقیماً از سطح آب گرفته و تنفس کند و بر این اساس در آب‌های کم‌اکسیژن نیز زنده خواهد ماند. زندگی یک ماهی جنگجو درون لایه‌ای از حباب‌ها شروع می‌شود؛ این لانه حبابی توسط مولد نر ایجاد شده و محافظت می‌شود. ماهی نر هوا را بلعیده و آن را از غدد موکوسی دهان عبور می‌دهد و با استفاده از اندام لابیرنت حباب‌هایی تولید می‌کند که طول عمر بالاتری نسبت به حباب‌های معمولی دارند (۲۲). تخم ماهی جنگجو، ساختاری مشابه تخم دیگر ماهیان استخوانی دارد، مقدار زیادی زرده داشته و در واقع از نوع تخم‌های پرزرده است. تسهیم آن به‌صورت صفحه‌ای است. قطب حیوانی در طول تکامل به خوبی مشخص بوده اما قبل از تسهیم قابل تشخیص نیست. ۲۰-۱۰ دقیقه بعد از جفت‌گیری، تخم‌های لقاح یافته به حالت نیمه شفاف درمی‌آیند و تخم‌های لقاح نیافته پس از این مدت کدر خواهند بود؛ اگرچه بعضی تخم‌های لقاح یافته نیز ظاهری کدر دارند (۲۰). بچه ماهیان پس از گذشت تقریباً سه ماه بالغ شده و طول عمر آن‌ها نیز ۲ تا ۴ سال می‌باشد (۲۲).

در این مطالعه توسعه جنینی ماهی جنگجو *Betta splendens*، بررسی شده است و این امر می تواند به پیشرفت صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی کمک نماید. تاکنون مطالعات زیادی در مورد تاکسونومی، نحوه زندگی در طبیعت، بیولوژی تکثیر و رفتارهای اکولوژیکی و فیزیولوژیکی ماهی جنگجو انجام شده است (۱۶). این در حالی است که راجع به جنین‌شناسی و آنتوژنی آن اطلاعات کمی در دسترس است و علی‌رغم اهمیت تجاری، گزارشات ناچیزی در مورد تکوین آن و دیگر گونه‌های آنابانتوئید موجود است. مسلماً اطلاعات حاصل از این مطالعه می‌تواند به فهم بهتر بیولوژی، رژیم غذایی با در نظر گرفتن زمان باز شدن دهان، زمان شروع اولین حرکات دهان، زمان تشکیل چشم‌ها و میزان مصرف زرده که همگی بر شروع اولین تغذیه و انتخاب اندازه طعمه غذایی مؤثرند و هم‌چنین شرایط محیطی این گونه با اهمیت و پر تقاضا کمک نماید.

مواد و روش‌ها

ماهی‌ها

مولدین بالغ ماهی جنگجو از یک مرکز آکواریومی در شهرستان کرج خریداری و به آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال داده شدند. مولدین نر به‌صورت مجزا درون ظروف شیشه‌ای کوچک و مولدین ماده درون یک تانک ۸۰ لیتری به‌مدت دو هفته تا شروع آزمایش نگهداری شدند. دمای آب ۱±۲۸ درجه سانتی‌گراد و رژیم نوری نیز در ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بر طبق مطالعه Jaroensutasinee و Jaroensutasinee (۲۰۰۳) حفظ گردید (۱۰). از کرم خونی منجمد، لارو شیرونومید خشک شده، دافنی و غذای تجاری بیومار به‌منظور آماده‌سازی مولدین تا حد سیری استفاده شد.

آماده سازی تانک تخم‌ریزی و نمونه‌گیری

آمادگی مولدین نر برای جفت‌گیری از ایجاد لانه حبابی بر روی سطح آب و مولدین ماده از شکم برآمده آنها در غیر از زمان تغذیه قابل تشخیص بود. از تانک‌های ۳۶ لیتری (۱۰) به منظور عملیات تکثیر استفاده شد. تانک‌ها بدون کف‌پوش شنی بوده و دمای آب به وسیله بخاری آکواریوم در ۲۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. هیچ‌گونه هوادهی انجام نشد و برای حفظ جان ماده از حملات و ضربه‌های ماهی نر در طول لانه‌سازی، یک گلدان سفالی در گوشه تانک قرار داده شد. از یک قطعه پلاستیک ۱۰×۸ سانتی‌متر مربع به‌منظور جایگاه تخم‌ریزی در سطح آب استفاده گردید. تعداد ۳ عدد مولد نر به هریک از تانک‌ها معرفی شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، ماهیان ماده آماده تخم‌ریزی نیز به آن‌ها اضافه شدند. از این تعداد ماهی نر در دو نوبت با ماده‌های مجزا جفت‌گیری به‌عمل آمد. تخم‌ها به‌صورت مستقیم همراه با لانه حبابی و بلافاصله بعد از اتمام تخم‌ریزی توسط پتری‌دیش خارج شدند. تخم‌ها در هر نوبت درون چندین پتری‌دیش با عمق آب ۱ سانتی‌متر تقسیم شده و در عرض دو ساعت با سه تیمار دمایی (۲۴، ۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) تطابق داده شدند. این سه درجه حرارت براساس Jaroensutasinee و Jaroensutasinee (۲۰۰۳) انتخاب شدند که گزارش دادند دامنه دمایی منطقه زیست این ماهی در فصل تولیدمثل (فروردین- خرداد) از ۲۷ تا ۳۱/۵ درجه سانتی‌گراد متغیر است (۱۰). هم‌چنین از دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان یک آستانه محدودکننده در تکثیر ماهی جنگجو استفاده شد. برای ثابت ماندن تیمارهای دمایی در طول آزمایش، از بخاری آکواریوم استفاده شد. پتری‌دیش‌های حاوی تخم مربوط به هر تیمار درون تانک‌های با دمای مورد نظر نگهداری شدند. در هر مرتبه حداقل چهار تخم خارج شده و بررسی گردید. نمونه‌ها بر روی لام قرار گرفته و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰X برای جنین‌ها و ۴۰X برای لاروها عکس‌برداری شدند. پایه‌ای روی عدسی چشمی میکروسکوپ نصب شده و دوربین Panasonic DMC-FX10 روی آن ثابت شد.

آنالیز آماری

داده‌های مرتبط با نرخ تفریخ تخم‌ها در سه دمای آزمایشی به‌وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار SPSS تحلیل شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار $p<0.05$ استفاده شد.

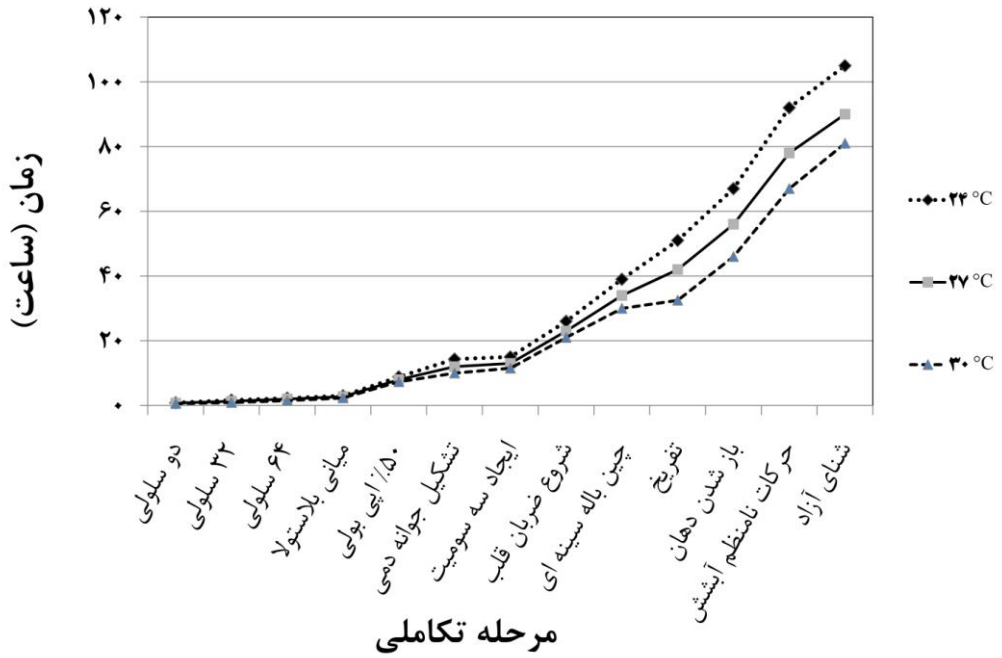
نتایج

در جدول ۱ اطلاعات مربوط به تاثیر درجه حرارت تفریخ برای انجام مراحل تکاملی در ماهی جنگجو نشان داده شده است. تخم‌ریزی حدود ۲۴ ساعت بعد از معرفی ماده‌ها به تانک‌های تکثیر انجام شد. تخم لقاح یافته در ماهی جنگجو از نوع ته‌نشین شونده و (برخلاف اغلب گونه‌های گورامی ماهیان) عاری از گلوبول‌های روغنی بود. تخم‌ها کمی بیضی شکل و نیمه شفاف بودند. قطر متوسط تخم‌های آبگیری کرده حدود ۱/۲-۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. فضای پری‌ویتلین کوچک بوده و تخم از نوع polylecithal بود. این فضا توسط مایعی خاص پر شده که این مایع از تخم و جنین در برابر آسیب‌های خارجی حفاظت می‌کند (۴). در این زمان محتوای تخم یک رنگ بوده و در نتیجه قطب حیوانی در تخم تازه لقاح یافته از نظر ظاهری قابل تشخیص نبود. با افزایش عمر جنین، در ناحیه تنه و دم سومیت‌ها (مراحل اولیه تشکیل میوتوم) تشکیل شدند که شروع آن‌ها از بخش قدامی صورت گرفت. این سومیت‌ها در نهایت به میوتوم تکامل یافته و بافت ماهیچه‌ای را ایجاد کردند؛ تعداد آن‌ها از جمله گزینه‌های مطلوب برای تشخیص سن جنین می‌باشد (۱۲).

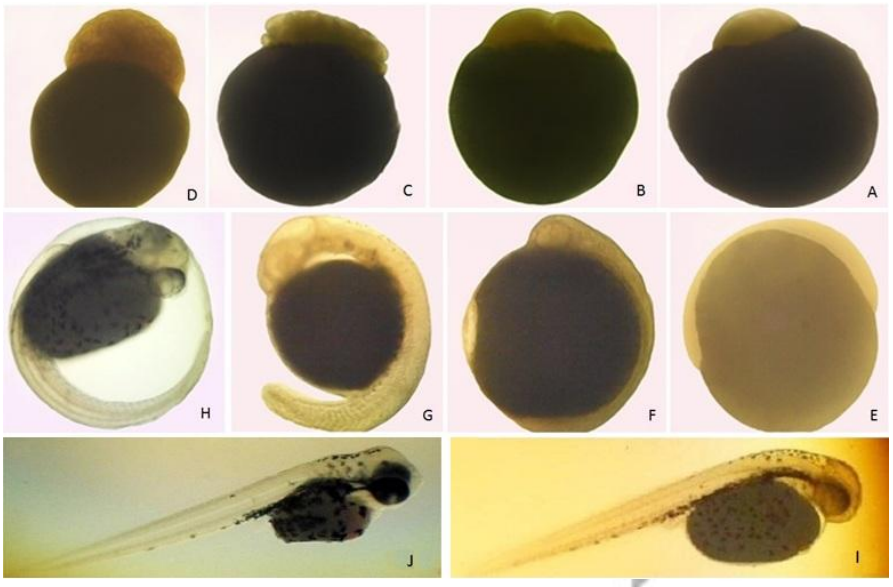
جدول ۱: زمان لازم (ساعت) برای رسیدن به هریک از مراحل تکاملی در ماهی جنگجو(*Betta splendens*)در سه تیمار دمایی (۲۴، ۲۷ و ۳۰درجه سانتی‌گراد)

مراحل تکاملی	زمان لازم (ساعت) برای رسیدن به هریک از مراحل تکاملی		
	۲۴ درجه سانتی‌گراد	**۲۷** درجه سانتی‌گراد	**۳۰** درجه سانتی‌گراد
مرحله دو سلولی	۰/۸۳	۰/۷۵	۰/۵۸
مرحله ۳۲ سلولی	۱/۹۱	۱/۷۵	۱/۳
مرحله ۶۴ سلولی	۲/۲۵	۲	۱/۵
مرحله میانی بلاستولا	۳	۲/۷۵	۲/۳۳
مرحله ٪۵۰ اپی‌بولی	۸/۸۳	۸	۷/۳۳
تشکیل جوانه دمی	۱۴/۳۳	۱۲	۱۰
ایجاد سه سومیت	۱۵	۱۳	۱۱/۵
شروع ضربان قلب	۲۶	۲۳	۲۱
ایجاد چین باله‌های سینه‌ای	۳۹	۳۴	۳۰
تفریخ	۵۱	۴۲	۳۲/۵
باز شدن دهان	۶۷	۵۶	۴۶
اولین حرکات نامنظم آبشش	۹۲	۷۸	۶۷
شروع شنای آزاد	۱۰۵	۹۰	۸۱

اطلاعات مربوط به مدت زمان لازم برای رسیدن به هریک از مراحل تکامل در تخم‌های ماهی *B. splendens* در تیمارهای مختلف دمایی (۲۴، ۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) در شکل ۱ آمده است.

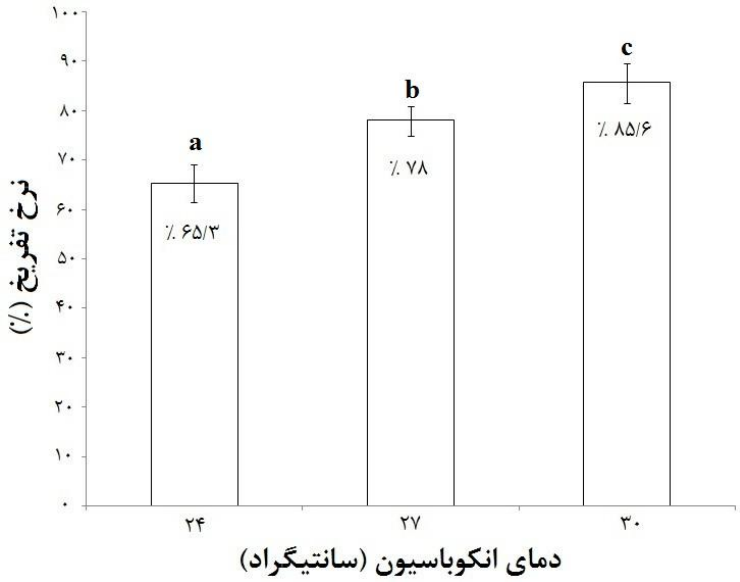


شکل ۱: زمان لازم برای ایجاد مراحل تکاملی در تخم و لارو اولیه ماهی جنگجو (*B. splendens*) در تیمارهای دمایی مختلف (۲۴، ۲۷ و ۳۰درجه سانتی‌گراد)



شکل ۲: مراحل تکوین جنین در ماهی جنگجو (*B. splendens*). (A) مرحله تک سلولی، (B) مرحله دو سلولی، (C) مرحله ۶۴ سلولی، (D) مرحله میانی بلاستولا، (E) مرحله 50% epiboly، (F) ایجاد لب‌های بینایی، (G) جدا شدن جوانه دمی از زرده، (H) کمی قبل از تفریخ، (I) لارو تازه تفریخ شده و، (J) لارو آماده برای شنای آزاد.

نرخ تفریخ در میان تیمارها، اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0.05$). کم‌ترین درصد تفریخ (۳/۷۸ ± ۶۵/۳۳)، در تیمار ۲۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. با افزایش دما از ۲۴ درجه سانتی‌گراد به ۳۰ درجه سانتی‌گراد، درصد تفریخ افزایش داشت (شکل ۳). به طوری‌که در تیمارهای ۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد، درصدهای تفریخ به‌ترتیب ۳/۰ ± ۷۸ و ۴/۰۴ ± ۸۵/۶۶ بود.



شکل ۳: نرخ تفریخ تخم‌های ماهی جنگجو (*B. splendens*) در سه تیمار دمایی مختلف (۲۴، ۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد)
حروف لاتین متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای دمایی در سطح $p<0.05$ می‌باشند.

بحث

یک گام ضروری برای پرورش موفق هر گونه، تعیین بهترین شرایط محیطی برای انکوباسیون تخم‌های آن است. دما یکی از مهم‌ترین و متغیرترین عوامل محیطی است که تاثیرات فراوانی بر تکامل تخم ماهیان دارد (۲). تمایز ارگان‌های مختلف و رشد بدن به‌وسیله آنزیم‌ها تنظیم می‌شود و آنزیم‌ها خود تحت تاثیر دما فعالیت می‌کنند. در این مطالعه، همان‌طور که انتظار می‌رفت، جذب مواد زرده‌ای و تکمیل مراحل مختلف تکاملی در دماهای بالاتر، سریع‌تر اتفاق افتاد (۳۰>۲۷>۲۴درجه سانتی‌گراد ؛ جدول ۱). بهترین میزان تفریخ تخم‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید و این میزان با افت درجه حرارت، کاهش معنی‌دار داشت ($p<0.05$؛ شکل ۳). این تفاوت را می‌توان به طبیعت ماهی جنگجو که وابستگی زیادی به دماهای بالا دارد نسبت داد. این ماهی در آب‌های گرمسیری منتهی به مناطق با پوشش گیاهی زیاد مانند برنج‌زارها زیست می‌نماید که با توجه به عمق کم آب، دمای بالا را ترجیح می‌دهد (۹). به این دلیل که برای گروه‌بندی تخم‌ها در تیمارهای دمایی مختلف مجبور به انتقال تخم‌ها بود، احتمالاً تغییرات دمایی مختصری بر آن‌ها اعمال شده بود؛ اما با توجه به این‌که دو دمای بیشینه (۳۰ درجه سانتی‌گراد) و کمینه (۲۴ درجه سانتی‌گراد) از لحاظ رسیدن به هریک از مراحل تکاملی، به‌ترتیب زودتر و دیرتر نسبت به دمای میانگین (۲۷ درجه سانتی‌گراد) بودند، پس می‌توان گفت که آن جابه‌جایی‌ها تاثیری بر روند تکامل تخم‌ها نداشتند. همان‌گونه که در شکل ۱ قابل مشاهده است، زمان لازم برای رسیدن به هریک از مراحل تکاملی در درجه حرارت ۲۴ درجه سانتی‌گراد به علت کاهش نرخ متابولیسم نسبت به دو دمای ۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بیش‌تر است. به‌طور کلی از زمان لقاح تا هنگام تفریخ تخم‌ها، دمای پایین‌تر موجب تاخیر و دماهای بالاتر باعث سریع‌تر شدن تکامل جنین می‌شوند (۸ و ۱۸) که با نتایج حاصل از این آزمایش، هم‌خوانی دارد. درصد تفریخ تخم‌ها نیز در این دما کمتر از دو تیمار دمایی ۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود که به دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌های مؤثر در تفریخ می‌باشد (۵). خروج از محدوده بهینه دمایی با کاهش نرخ تفریخ و افزایش بدشکلی و مرگ و میر در جنین و لاروهای ماهیان همراه است. دمای ۱۸/۱ درجه سانتی‌گراد که فراتر از حد بهینه در تکثیر ماهی ترومپت مخطط (*Latris lineate*) می‌باشد، باعث افزایش بدشکلی جنین‌ها شده و تلفات اکثریت آن‌ها در مرحله اپی‌بولی مشاهده شده است (۲). بیش‌ترین بقای تخم‌های لقاح یافته ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) در دمای ۸ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد بوده و در درجه حرارت‌های بالاتر و پایین‌تر، کاهش یافته است (۱۷). حداکثر تعداد جنین‌های دارای بدشکلی در ماهی روهو، *Labeo rohita*، در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است که این دما بالاتر از حد مطلوب در تفریخ تخم این ماهی کپور است (۵).

در بررسی میکروسکوپی مشاهده شد که نحوه تقسیمات همانند دیگر گونه‌های ماهیان زینتی مانند ماهی زبرا، *Danio rerio* (۱۲)، *Cichlasoma dimerus* (۱۵) و فرشته ماهی آب شیرین، *Pterophyllum scalare* (۱۳) می‌باشد (شکل ۲). در واقع تمام گونه‌های ماهیان استخوانی، تقسیم تسهیم از نوع مروبلاستیک صفحه‌ای دارند که منطقه‌ای بزرگ به نام زرده از تقسیم دور بوده و کلیه تقسیم‌ها در ناحیه‌ای کوچک موسوم به قطب حیوانی که نزدیک میکروپیل است، انجام می‌شوند (۷). در این مطالعه مطابق نظر Kimmel و همکاران (۱۹۹۵)، اولین پروسه تکاملی جنین، تسهیم یا کلیواژ در نظر گرفته شد که انتهای آن مرحله ۶۴ سلولی می‌باشد. این مراحل براساس تعداد بلاستومرهای ایجاد شده قابل تفکیک بودند که افزایش تعداد بلاستومرها نیز به‌صورت 2^n بود. بلاستومرها در قطب حیوانی توده متراکمی ایجاد کرده بودند اما قطب حیوانی به‌راحتی از زرده قابل تشخیص بود. دومین پروسه تکوین جنین، پروسه بلاستولا نامیده شد. بلاستومرها بسیار کوچک و درهم بوده و در انتهای پروسه شروع به فعالیت روخزیدگی (اپی‌بولی) می‌کنند. در طول انجام این پروسه، ارتفاع مجموعه بلاستومرها ابتدا زیاد شده و سپس کاهش یافت. در طی مرحله گاسترولا، اپی‌بولی به انتها رسیده و در ابتدای پروسه قطعه قطعه شدن، سومیت‌ها قابل تشخیص بود (شکل ۲). لوب‌های بینایی نیز قابل مشاهده بودند. با رشد و افزایش تعداد سومیت‌ها اولین حرکات جنین قابل مشاهده بود. در اندک زمانی قبل از تفریخ، حرکات لارو درون پوسته افزایش داشت که در نهایت پوسته تخم توسط دم شکافته شده و لاروها خارج شدند. مدت زمان لازم برای تفریخ کل تخم‌ها در دماهای ۳۰، ۲۷ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۲ و نیم، ۳ و ۴ ساعت به‌طول انجامید که نشان از طولانی‌تر بودن تکوین جنین در دماهای پایین‌تر است.

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود که با توجه به طبیعت گرم ماهی جنگجو استفاده از دماهای پایین‌تر از ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر و تکامل تخم‌ها مناسب نخواهد بود و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد از جنبه‌های تکامل سریع‌تر جنین و لارو ابتدایی، درصد تفریخ تخم‌ها و رسیدن به هریک از مراحل تکوین مناسب‌ترین دما می‌باشد. این دمای بهینه تکثیر با درجه حرارت منطقه زیست ماهی جنگجو در فصل تولیدمثل رابطه تنگاتنگی دارد.

منابع

1- **Beacham, T.D. and Murray, C.B., 1990**. Temperature, egg size, and development of embryos and alevins of five species of Pacific salmon: a comparative analysis. Transactions of the American fisheries society. 119: 927–945.

2- **Bermudes, M. and Ritar, A.J., 1999**. Effects of temperature on the embryonic development of the striped trumpeter (*Latris lineate* Bloch and Schneider, 1801). Aquaculture. 176: 245–255.

3- **Blaxter, J.H.S., 1992**. The effect of temperature on larval fishes. Netherlands journal of zoology. 42:336–357.

4- **Coward, K.; Bromage, N.R.; Hibbitt, O. and Parrington, J., 2002.** Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Reviews in fish biology and fisheries. 12: 33–58.

5- **Das, T.; Pal, A.K.; Chakraborty, S.K.; Manush, S.M.; Dalvi, R.S.; Sarma, K. and Mukherjee, S.C., 2006.** Thermal dependence of embryonic development and hatching rate in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). Aquaculture. 255: 536-541.

6- **Elliott, J.M., 1981.** Some aspects of thermal stress on freshwater teleosts. In: Pickering, A.D. (Ed.), Stress and Fish. Academic Press, London. pp.: 209–245.

7- **Hall, T.E.; Smith, P. and Johnston, I.A., 2004.** Stages of Embryonic Development in the Atlantic Cod *Gadus morhua.* Journal of morphology.259: 255–270.

8- **Hart, P.R. and Purser, G.J., 1995.** Effects of salinity and temperature on eggs and larvae of the greenback flounder. Aquaculture. 136: 21–230.

9- **Jaroensutasinee, M. and Jaroensutasinee, K., 2001.** Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. Journal of Fish Biology. 58: 1311–1319.

10- **Jaroensutasinee, M. and Jaroensutasinee, K., 2003.** Type of intruder and reproductive phase influence male territorial defence in wild-caught Siamese fighting fish. Behavioural Processes. 64: 23–29.

11- **Jezierska, B.; Ługowska, K. and Witeska, M., 2009.** The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish Physiology Biochemistry. 35: 625–640.

12- **Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ulmann, B. and Schilling, T.F., 1995**. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. Developmental dynamics. 203: 255-310.

13- **Korzelecka, A.; Szalast, Z.; Pawlos, D.; Smaruj, I.; Tañski, A.; Szulc, J. and Formicki, K., 2012**. Early ontogenesis of the angelfish, *Pterophyllum scalare* Schultze, 1823 (*Cichlidae*). Neotropical ichthyology. [Online]. Ahead of print [cited 2012-10-11].

14- **Matschak, T.W.; Stickland, N.C.; Mason, P.S. and Crook, A.R., 1997.** Oxygen availability and temperature affect embryonic muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Differentiation. 61: 229-235.

15- **Meijide, F.J. and Guerrero, G.A., 2000**. Embryonic and larval development of a substrate brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. Journal of zoology. 252: 481-493.

16- **Monvises, A.; Nuangsaeng, B.; Sriwattanarothai, N. and Panijpan, B., 2009.** The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. Science Asia. 35: 8–16.

17- **Ojanguren, A.F. and Brana, F., 2003.** Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. Journal of Fish Biology. 62: 580–590.

18- **Pepin, P., 1991.** Effect of temperature and size on development, mortality and survival rates of the pelagic early life stages of marine fish. Canadian journal of fisheries and aquatic sciences. 48: 503–518.

19- **Peterson, R.H.; Martin-Robichaud, D.J. and Berge, A., 1996.** Influences of temperature and salinity on length and yolk utilization of striped bass larvae. Aquaculture international. 4: 89–103.

20- **Rugh, R., 1962.** Experimental Embryology. Burgess Publishing Company, Minneapolis.

21- **Swanson, C., 1996.** Early development of milkfish: effects of salinity on embryonic and larval metabolism, yolk absorption and growth. Journal of Fish Biology. 48: 405-421.

22- **Tullock, J.H., 2006.** Betta, 2nd Edition. Copyright 2006 by Wiley Publishing, Inc., Hoboken, New Jersey. 128 P.

Effect of incubation temperature on the embryonic and larval development of the Siamese fighting fish (*Betta splendens)*

- **Mohammad Navid Forsatkar:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, P.O.Box: 4111 Karaj, Iran
- **Mohammad Ali Nematollahi***: Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, P.O.Box: 4111 Karaj, Iran

Received: November 2012 Accepted: February 2013

Keywords: Fighting fish (*Betta splendens)*, Embryonic development, Fertilization, Temperature

Abstract

Significant morphological and physiological changes occur in the early development of fishes. This study was conducted to investigate the embryonic and pre-larval development of fighting fish (*Betta splendens*) in different temperature (24, 27 and 30°C) from oocyte activation to time of free swimming. Spawning occurred in tanks at 28 °C. Fertilized eggs were removed rapidly from the breeding tanks and put in the rearing tanks with different temperature (24, 27 and 30 °C). Diameter of fertilized eggs was determined around 0.8 mm. They were white, typically when deposited, very large vitellogenin and small privitelin space. Eggs and larva in different development stages and temperatures were sampled and taken pictures. The minimum time for arrival to specific developmental stages including: first cleavage, 32 and 64 cells stage, mid blastula stage, 50% epiboly, tail bud formation, heartbeat begins, hatching, opening the mouth and finally free swimming) at 24, 27 and 30 °C was recorded. Higher hatching rate and larva faster growth occurred at 30°C show that this temperature is most suitable for egg incubation of Siamese fighting fish.

* Corresponding Author's email: malahi@ut.ac.ir