بهینه‌سازی دستورالعمل رنگ‌آمیزی ماهیان خاویاری جهت مطالعات اسکلتی در مراحل مختلف رشدی

- **رضا عسگری** *: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ٤١١١
- **سهیل ایگدری**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ٤١١١
- **غلامرضا رفیعی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ٤١١١
- **ناصر آق**: پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ٥١٨١٨-٥٧٥٦١
- **هادی پورباقر**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ٤١١١
- **حمید اسحق زاده**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، صندوق پستی: ٣٩٩٥

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۲

چکیده

دستورالعمل رنگ‌آمیزی آلسیان بلو- آلیزارین رد با موفقیت برای مراحل مختلف رشدی فیل ماهی(*Huso huso*) به‌عنوان ماهی مدل خاویاری، جهت مطالعات تکوین (فردزایی) اسکلتی تهیه شد. جهت کسب بهترین دستورالعمل رنگ آمیزی، اندازه ماهی و خصوصیات ریختی آن در هر یک از مراحل رشدی مورد توجه قرار گرفت چرا که این فاکتورها رنگ‌آمیزی بافت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. ۳ مرحله رشدی مشخص برای بهترین دستورالعمل رنگ‌آمیزی در طی این مطالعه مشخص شد: ۲۰- ۱۱ میلی متر (TL)؛ ۲۹- ۲۱ میلی‌متر (TL)؛ ۳۰ و بالاتر از ۳۰ میلی‌متر (TL). به‌طور کلی جهت رنگ آمیزی اسکلتی از رنگ آلسیان بلو و آلیزارین رد به‌ترتیب برای رنگ آمیزی غضروف و استخوان استفاده می‌شود. مدت زمان انکوباسیون برای هر یک از محلول‌های به‌کار رفته جهت نفوذ رنگ به بافت‌های غضروفی و استخوانی بدون آسیب به بافت‌ها برای هر یک از مراحل رشدی به‌خوبی تنظیم شد. از آن‌جایی که تشخیص بافت‌های تازه غضروفی شده و یا تازه استخوانی شده لاروهای بسیار کوچک (به‌ترتیب ۱۱ و ۲۰ میلی‌متر) با این دستورالعمل امکان‌پذیر است، این دستورالعمل می‌تواند برای مطالعات تکوینی اسکلتی، بدشکلی‌های اسکلتی در لاروهای کوچک و بررسی تاثیر عوامل مختلف محیطی و تغذیه‌ای بر میزان استخوانی شدن ماهیان خاویاری مفید باشد.

کلمات کلیدی: تکوین اسکلتی، ماهیان خاویاری، فیل ماهی (*Huso huso*)، رنگ‌آمیزی اسکلتی، آلسیان بلو- آلیزارین رد

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: asgarireza@yahoo.com

مقدمه

محققان بسیاری در زمینه‌های زیست‌شناسی و پزشکی نیازمند مطالعه برروی ساختارهای اسکلتی می‌باشند. علی‌رغم پیشرفت تکنیک‌های رادیولوژی و CT-Scanning برای مطالعه ساختارهای اسکلتی (غضروفی- استخوانی)، امروزه تحقیقات بسیاری در زمینه مطالعه چنین ساختارهایی در موجودات تثبیت شده و موزه‌ای به روش‌های رنگ‌آمیزی اختصاصی متکی می‌باشند. در چند دهه اخیر دستورالعمل‌های متعدد رنگ‌آمیزی ساختارهای غضروفی- استخوانی برای مهره‌داران مختلف به‌ویژه ماهیان به چاپ رسیده است (Dingerkus و Uhler، 1977؛ Taylor و Van Dyke، ۱۹۸۵؛ Potthoff، ۱۹۸۴). این دستورالعمل‌ها جهت مطالعات ریخت‌شناسی و جزئیات ساختارهای اسکلتی و هم‌چنین روند توسعه و تکوین این ساختارها در طی مراحل مختلف رشدی مورد استفاده قرار گرفته است (Wagemans و همکاران، ۱۹۹۸؛ Koumoundouros و همکاران، ۲۰۰۰؛ Gavaia و همکاران، ۲۰۰۲؛ Faustino و Power، ۲۰۰۱). علاوه بر این، روش‌های رنگ‌آمیزی ساختارهای اسکلتی به‌عنوان ابزاری جهت مطالعه ناهنجاری‌های اسکلتی و برآورد اثرات عوامل مختلف تغذیه‌ای در کیفیت اسکلتی لارو و بچه‌ماهی بسیاری از گونه‌های پرورشی ماهیان را فراهم آورده است که این ناهنجاری‌های اسکلتی در صنعت آبزی‌پروری بسیار مورد توجه می‌باشند (Darias و همکاران، ۲۰۱۰؛ Mazurais و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹؛ Ferna´ndez و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹؛ Verhaegen، ۲۰۰۷). به‌هرحال از آن جایی که نیازمندی‌های غذایی در طول تکوین لاروی تغییر می‌کند، تشخیص زود هنگام تغییرات اسکلتی می‌تواند در تعیین تاثیر مواد غذایی و سایر عوامل در مراحل ابتدایی لاروی موثر باشد. عوامل مختلفی از قبیل عوامل فیزیولوژیکی، محیطی، ژنتیکی، تغذیه‌ای و سایر عوامل ناشناخته، ساختارهای اسکلتی را پرورش لارو و بچه‌ماهی گونه‌های مختلف را می‌توانند تحت تاثیر قرار دهند (Lall و Lewis-McCrea، ۲۰۰۷).

با توجه به‌ویژگی‌های اسکلتی گونه‌های مورد مطالعه دستورالعمل‌های رنگ‌آمیزی متعددی، بهینه و ارائه شده است تا بتواند به‌عنوان دستورالعمل استاندارد در مطالعه تغییرات اسکلتی آن گروه از آبزیان در مطالعات ناهنجاری‌های اسکلتی و مطالعات تکوینی و سایر موارد، استفاده گردد (Koumoundouros و همکاران، 1997a,b؛ Ferna´ndez و همکاران، ۲۰۰۸،۲۰۰۹؛ Gavaia و همکاران، ۲۰۰۲؛ Marino و همکاران، ۱۹۹۳؛ Daoulas، ۱۹۹۱؛ Mazurais، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹؛Darias و همکاران، ۲۰۱۰). از سوی دیگر حتی در طول دوره تکاملی نیز نیاز است این دستورالعمل‌ها با توجه به کیفیت ساختارهای مراحل مختلف تکوینی بهینه‌سازی شود، چراکه هم‌زمان با رشد ماهی تغییرات بافتی و ساختاری در اندام‌های مختلف جهت تامین نیازهای عملکردی آن گونه رخ می‌دهد. دوره لاروی ماهیان از جمله حساس‌ترین دوره برای مطالعات تغییرات اسکلتی و یا تکوینی می‌باشد که با توجه به تغییرات سریع و نیاز به تشخیص مراحل شکل‌گیری ساختارهای غضروفی- استخوانی، تهیه دستورالعمل‌های بهینه‌سازی شده برای گروه‌های مختلف ماهیان می‌تواند کمک زیادی از نظر زمانی به محققان نماید.

در این خصوص تهیه دستورالعمل رنگ‌آمیزی برای مراحل مختلف تکوینی ماهیان خاویاری می‌تواند جهت تشریح تکوین اسکلتی و هم‌چنین جهت برآورد اثرات فاکتورهای مختلف بر ناهنجاری‌های اسکلتی مفید باشد. اگرچه اطلاعات مختصری در خصوص ساختار اسکلتی ماهیان خاویاری در دست است (Birstein و همکاران، ۲۰۰۲؛ Grande و Bemis، ۱۹۹۱؛ Findeis، ۱۹۹۳؛ Grande و همکاران، ۲۰۰۲؛ Hilton و همکاران، ۲۰۱۱). ولی تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تکوین اسکلتی ماهیان خاویاری به‌خصوص فیل ماهی به‌عنوان مهم‌ترین ماهی خاویاری پرورشی کشور ارایه نشده است. این مطالعه بخشی از یک مطالعه تکوین ساختارهای اسکلتی- غضروفی در ماهیان غضروفی- استخوانی (ماهیان خاویاری؛ Acipenseridae) می باشد که در آن چندین دستورالعمل رنگ‌آمیزی متداول که برای ماهیان استخوانی ارایه شده (Dingerkus و Uhler، ۱۹۷۷؛ Taylor و Van Dyke، ۱۹۸۵؛ Potthoff، ۱۹۸۴)، برای رنگ‌آمیزی مراحل مختلف رشدی، فیل ماهی (*Huso huso*) به‌عنوان ماهی مدل خاویاری، مورد استفاده قرار گرفت و در طی یک فرآیند آزمون و خطا یک دستورالعمل بهینه برای مطالعات ساختارهای اسکلتی ماهیان خاویاری برای مراحل فوق تهیه گردید. نتایج این تحقیقات می‌تواند در مطالعات آتی محققان در مطالعات ساختارهای اسکلتی ماهیان غضروفی- استخوانی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

شرایط پرورشی و نمونه‌برداری

لارو و بچه فیل ماهی (*Huso huso*) مورد مطالعه از انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری شهید دادمان استان گیلان تهیه گردید. لاروها در ابتدای آزمایش در چهار مخزن فایبرگلاس ۳۵ لیتری با تراکم اولیه ۶۰ لارو در لیتر تقسیم شدند. در طی آزمایش دما بین ۱۴ تا ۱۷ درجه سانتی‌گراد، شوری ۰/۵ گرم در لیتر، اکسیژن محلول بالای ۶ میلی‌گرم در لیتر و فتوپریود معمولی بود. لاروها از روز ۶ تا روز ۵۰ پس از تفریخ با غذای زنده و دستی مورد تغذیه قرار گرفتند.۴۰ لارو از هر مخزن در روزهای صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۴، ۲۰، ۲۶، ۳۲، ۴۰ و ۵۰ پس از هچ جهت رنگ‌آمیزی ساختارهای اسکلتی و مطالعات تکوین اسکلتی نمونه‌برداری شدند.

تثبیت نمونه‌ها

لاروهای نمونه‌برداری شده در فرمالین ۴ درصد خنثی شده تثبیت و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه زیست‌شناسی آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران جهت طی مراحل رنگ‌آمیزی و مطالعات تکوین اسکلتی منتقل شدند.

شستشو و آبدهی نمونه‌ها

قبل از شروع مراحل رنگ‌آمیزی، برخی مطالعات، به تاثیر مناسب آب‌دهی نمونه‌های مورد مطالعه اشاره شده است (Gavaia و همکاران، ۲۰۰۰) و در برخی دیگر به عدم تاثیر یا تاثیر نامناسب (Potthoff، ۱۹۸۴) این موضوع اشاره شده است. در این مطالعه به بررسی تاثیر آب‌دهی نمونه‌ها قبل از شروع رنگ‌آمیزی نمونه‌ها پرداخته شد و نمونه‌ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول که نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای به‌صورت انفرادی انتقال داده شدند. در هر ظرف یک نمونه قرار داده شد. لاروها با آب مقطر تا زمان فرو رفتن لاروها به کف ظرف مورد انکوباسیون قرار گرفتند و سپس دوبار و هربار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند، و گروه دوم که نمونه‌ها بدون آب‌دهی به‌طور مستقیم وارد مراحل رنگ‌آمیزی شدند.

هم‌چنین قبل از شروع مراحل رنگ‌آمیزی نمونه‌ها، جهت دستیابی به بهترین دستورالعمل در طول دوران رشد فیل ماهی، ۳ مرحله رشدی مشخص در طی این مطالعه مشخص شد: ۴/۵ تا ۶/۴ میلی‌متر (طول کل)؛ ۶/۷ تا ۸/۷ میلی‌متر (طول کل)؛ ۱۲/۸ تا ۱۵/۵ میلی‌متر (طول کل؛ TL).

رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان

در مطالعات مختلف دو دستورالعمل جهت رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان ماهیان ارائه شده است؛ رنگ‌آمیزی جداگانه غضروف و استخوان و رنگ‌آمیزی هم‌زمان غضروف و استخوان در یک مرحله. در این مطالعه به مقایسه این دو روش در مراحل مختلف رشدی پرداخته شد. در روش اول ابتدا به رنگ‌آمیزی غضروف و سپس بعد از مراحل خنثی‌سازی، رنگ‌بری و شفاف‌سازی، به رنگ‌آمیزی استخوان پرداخته شد. میزان ۱۰۰ میلی‌گرم آلسیان بلو، ۸۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک با یکدیگر مخلوط و از محلول به‌دست آمده ۲ میلی‌لیتر در هر ظرف اضافه و نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مورد انکوباسیون قرار گرفته‌اند. جهت رنگ‌آمیزی استخوان نیز، نمونه‌ها در محلولی شامل ۵ گرم در لیتر آلیزارین رد به‌همراه KoH ۱درصد به نسبت مساوی در مدت زمان‌های مختلف مورد انکوباسیون قرار گرفت (جدول ۱).

در روش دوم به رنگ‌آمیزی هم‌زمان غضروف و استخوان پرداخته شد. قبل از شروع مراحل شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی نسبت به آماده‌سازی محلول Double که شامل ۱۰میکرولیتر محلول ب + ۱ میلی لیتر محلول الف می‌باشد، جهت رنگ‌آمیزی هم‌زمان غضروف و استخوان اقدام شد که محلول الف شامل: ۵ میلی لیتر 0.4 درصد Alcian blue + ۲,۳ گرم $MgCl_2$ در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر+ ۵ میلی لیتر اتانول ۷۰درصد؛ محلول و محلول ب شامل: ۰,۵ درصد Alizarin red در آب مقطر بود.

در این روش، ابتدا نمونه‌های فیکس شده با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد (به‌ازاء هر نمونه) به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها با ۱ میلی‌لیتر محلول Double (به‌ازاء هر نمونه) در مدت زمان‌های مختلف همراه با تکان دادن، مورد انکوباسیون قرار گرفت (جدول ۱). در ادامه نمونه‌ها با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر (به‌ازاء هر نمونه) شستشو داده شدند.

خنثی‌سازی

باقی‌مانده اسید در بافت‌های نمونه‌ها جهت جلوگیری از هضم غضروف و استخوان نمونه‌ها به‌وسیله قرار دادن نمونه‌ها در محلول اتانول ۱۰۰درصد در KOH ۱درصد به مدت ۳ دقیقه خنثی شد.

آب‌دهی دوباره

در نمونه‌های که غضروف و استخوان جداگانه مورد رنگ‌آمیزی

قرار گرفتند، آب‌دهی مجدد نمونه‌ها و عدم آب‌دهی آن‌ها قبل از رنگ‌آمیزی استخوان مورد مقایسه قرار گرفتند. نمونه‌ها در سری الکلی (۹۵، ۷۰، ۴۰ و ۱۵درصد) در دو زمان ۱۵ دقیقه‌ای مورد آب‌دهی دوباره قرار گرفتند و سپس در آب مقطر غوطه‌ور شده تا در ته ظرف ته‌نشین شوند. در نهایت نمونه‌ها مجدداً به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر قرار داده شدند.

رنگ‌بری

نمونه‌ها با استفاده از محلول رنگ‌بری (۱ حجم H_2O_2 ۳ درصد و ۹ حجم KoH ۱درصد) در مدت زمان‌های مختلف بسته به میزان رنگ و اندازه نمونه‌ها رنگ‌بری شدند (جدول ۱).

شفاف‌سازی

به‌دلیل وجود ساختارهای پروتئینی مشاهده دقیق ساختارهای اسکلتی دشوار است. به‌همین دلیل ساختارهای پروتئینی موجود در نمونه‌ها به دو روش هضم شدند. در روش اول از محلول آنزیمی (۷ حجم آب مقطر، ۳ حجم سدیم بورات اشباع و ۲ گرم تریپسین) و در روش دوم از محلول $MgCl_2$ با غلظت‌های مختلف ۲۰، ۴۰،۶۰ و ۸۰ میلی‌مولار، در مدت زمان‌های مختلف در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شدند و این دو روش جهت دست‌یابی به بهترین روش در طی مراحل مختلف رشدی مقایسه شدند.

شستشوی نهایی

در این مرحله تمامی لاروها ابتدا به‌مدت ۵ دقیقه در آب مقطر و سپس در محلول KOH ۱درصد تا از بین رفتن تمامی رنگ‌های اضافی و شفاف شدن بدن قرار می‌گیرند.

آب‌گیری

در این مرحله جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای ذخیره‌سازی و جلوگیری از آسیب نمونه‌ها در طی زمان نگهداری، آب اضافی نمونه‌ها با استفاده از سری گلیسرول- KOH ۱درصد (۴ ساعت گلیسرول ۴۰ درصد + ۶۰ درصد KOH ۱درصد و در ادامه ۲۰ ساعت در گلیسرول ۷۰ درصد و ۳۰ درصد KOH ۱درصد) گرفته شد.

ذخیره‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده در گلیسرول ۱۰۰درصد ذخیره-سازی شدند. جهت جلوگیری از قارچ‌زدگی مقدار کمی تیمول به ظروف ذخیره‌سازی نمونه‌ها اضافه گردید.

تصویربرداری از نمونه‌ها

جهت تصویربرداری از نمونه‌ها برای مطالعات اسکلتی از روش اسکن نمونه‌ها با اسکنر Epson V600 استفاده شد. در این روش نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده در حمام گلیسرول که برروی صفحه شیشه‌ای اسکنر Epson V600 ایجاد شده بود به‌صورت انفرادی قرار داده شده و اسکن شدند (شکل ۱) لازم به‌ذکر است از نمونه‌های دیگر اسکنر نیز به شرطی که توانایی اسکن از بالا و پایین را هم‌زمان داشته باشند نیز می‌توان استفاده نمود.

نتایج

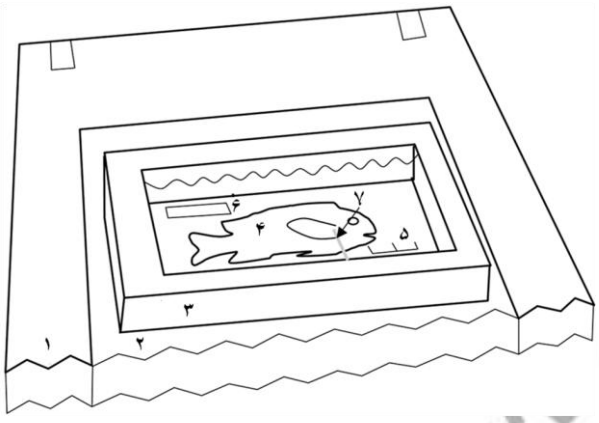
نتایج حاصل از بهینه‌سازی روش‌های موجود جهت رنگ‌آمیزی اسکلتی ماهیان خاویاری جهت سهولت استفاده سایر محققان به صورت یک جدول جداگانه گزارش شده است (جدول ۲). هم‌چنین تصاویر تهیه شده از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده در گروه‌های طولی مختلف در تصویر شماره ۲ قابل مشاهده می‌باشد. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود اجزاء استخوانی به رنگ قرمز و اجزاء غضروفی به رنگ آبی می‌باشند. با توجه به تصویر شماره ۲، با افزایش سن میزان استخوانی شدن با توجه با کاهش رنگ آبی و افزایش رنگ قرمز در نمونه‌ها، افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است به دلیل محدودیت بزرگنمایی و جهت‌های تصویر-برداری برای گزارش نهایی در مقاله، فقط سطح جانبی نمونه‌های مورد مطالعه نمایش داده شده است، از این‌رو جهت مطالعه دقیق اجزاء اسکلتی و روند تکوین آن‌ها بررسی دقیق نمونه‌ها با بزرگنمایی مختلف و جهت‌های مختلف ضروری می‌باشد.

جدول ۱: مراحل مختلف رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان فیل ماهی در گروه‌های مختلف رشدی

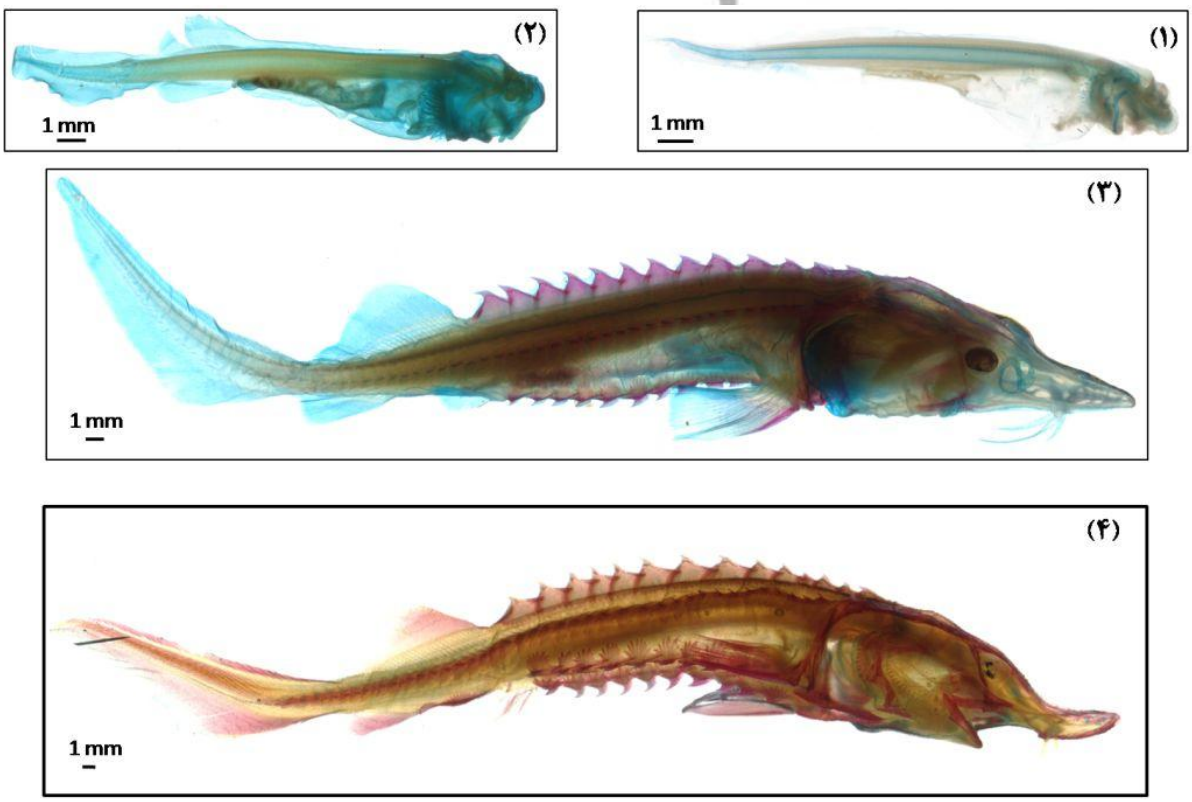
گروه‌های مختلف رشدی	۱	۲	۳
سن ماهی	۹- ۱ روز پس از تفریخ	۲۵- ۱۰ روز پس از تفریخ	بالاتر از ۳۰ روز پس از تفریخ
طول کل	۲۰- ۱۱ میلی‌متر	۲۹- ۲۱ میلی‌متر	۳۰ و بالاتر از ۳۰ میلی‌متر
	مدت زمان هر مرحله		
رنگ‌آمیزی غضروف	۳۰ دقیقه تا ۲۴ ساعت	۳۰ دقیقه تا ۲۴ ساعت	۳۰ دقیقه تا ۲۴ ساعت
رنگ‌آمیزی استخوان	۳۰ دقیقه تا ۲۰ ساعت	۳۰ دقیقه تا ۲۰ ساعت	۳۰ دقیقه تا ۲۰ ساعت
رنگ‌آمیزی هم‌زمان غضروف و استخوان	۲۴-۱۰ ساعت	۲۴-۱۰ ساعت	۲۴-۱۰ ساعت
رنگ‌بری	۶۰- ۲۵ دقیقه	۶۰- ۲۵ دقیقه	۶۰- ۲۵ دقیقه
شفاف‌سازی	۱۲- ۶ ساعت محلول $MgCl_2$ در غلظت‌های مختلف	۱۲- ۶ ساعت محلول $MgCl_2$ در غلظت‌های مختلف	۱۲- ۶ ساعت محلول $MgCl_2$ در غلظت‌های مختلف
	۲۰- ۱۰ ساعت محلول آنزیمی	۲۰- ۱۰ ساعت محلول آنزیمی	۲۰- ۱۰ ساعت محلول آنزیمی

جدول ۲: نتایج رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان فیل ماهی در گروه‌های مختلف رشدی

گروه‌های مختلف رشدی	۱	۲	۳
سن ماهی	۹- ۱ روز پس از تفریخ	۲۵- ۱۰ روز پس از تفریخ	بالاتر از ۳۰ روز پس از تفریخ
طول کل	۲۰- ۱۱ میلی‌متر	۲۹- ۲۱ میلی‌متر	۳۰ و بالاتر از ۳۰ میلی‌متر
	مدت زمان هر مرحله		
رنگ‌آمیزی غضروف	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۲۴ ساعت
رنگ‌آمیزی استخوان	۳۰ دقیقه	۲۰ ساعت	۲۰ ساعت
رنگ‌آمیزی هم‌زمان غضروف و استخوان	۱۰ ساعت	۲۰ ساعت	۲۴ ساعت
رنگ‌بری	۲۵ دقیقه	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه
شفاف‌سازی	۶ ساعت محلول ۴۰ میلی مولار $MgCl_2$	۱۲ساعت محلول ۴۰ میلی مولار $MgCl_2$	۲۰ ساعت محلول آنزیمی



شکل ۱: آماده‌سازی اسکنر جهت تصویر برداری با کیفیت بالا. ۱: سطح پایینی اسکنر ۲: صفحه شیشه‌ای اسکنر ۳: حوضچه گلیسرول ۴: نمونه ماهی ۵: کاغذ شطرنجی ۶: شماره و مشخصات نمونه ۷: سوزن نگهداری ثابت نمونه



شکل ۲: رنگ‌آمیزی اسکلتی فیل ماهی در مراحل مختلف رشدی؛ (۱) لارو یک روزه؛ (۲) لارو ۱۰ روزه؛ (۳) بچه‌ماهی ۴۰ روزه؛ (۴) بچه‌ماهی ۸۶ روزه

بحث

دستورالعمل رنگ‌آمیزی حاضر، جهت مطالعه مراحل تکوینی اسکلتی فیل ماهی، با توجه به دستورالعمل‌های ارایه شده برای ماهیان مختلف، بهینه‌سازی شده است (Dingerkus و Uhler، ۱۹۷۷؛ Park و Kim، ۱۹۸۴؛ Potthoff، ۱۹۸۴؛ Taylor و Van Dyke، ۱۹۸۵؛ Gavaia و همکاران، ۲۰۰۰؛ Walker و

Kimmel، ۲۰۰۷).

در این تحقیق جهت دستیابی به بهترین دستورالعمل رنگ‌آمیزی، زمان غوطه‌وری در محلول‌ها و غلظت‌های مختلف آن‌ها، توصیف شده در قسمت مواد و روش‌ها، بسته به اندازه و مرحله تکوینی نمونه مورد آزمون و خطا قرار گرفت و کیفیت وکمیت مناسب آن‌ها برای رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان در کنار جلوگیری از آسیب‌های بافتی به‌دست آمد. بهترین نتایج رنگ‌آمیزی زمانی به‌دست آمد که نمونه‌ها به ۳ مرحله تکوینی طبق جدول ۱ تقسیم شدند. از این رو این دستورالعمل بهینه شده، امکان آماده‌سازی ساختارهای اسکلتی را برای بررسی آن‌ها در ماهیان خاویاری فراهم آورد (شکل ۲).

در مرحله تثبیت در دستورالعمل‌های مختلف غالبا" از محلول ۱۰ درصد فرمالین خنثی شده در کربنات کلسیم استفاده شده است که در این مطالعه با توجه به اندازه نمونه‌ها از محلول ۴ درصد خنثی شده جهت تثبیت نمونه‌ها استفاده شد. Potthoff (۱۹۸۴) بیان کرده است که مرحله آب‌گیری قبل از رنگ‌آمیزی غضروف بسیار مهم است چرا که مقدار کم آب در رنگ‌آمیزی غضروف ایجاد مشکل می‌کند. از سوی دیگر، Gavaia و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشته‌اند که آب‌دهی نمونه‌ها قبل از رنگ‌آمیزی غضروف در کیفیت رنگ‌آمیزی نسبت به زمانی که نمونه‌ها مورد آب‌گیری و یا انتقال مستقیم از مرحله تثبیت نمونه‌ها با فرمالین به محلول رنگ‌آمیزی غضروف اثرات بسیار مثبتی دارد و این موضوع نیز در مطالعه حاضر مورد تایید قرار گرفت.

مدت زمان انکوباسیون نمونه‌ها با آلسیان بلو مشابه بعضی از مطالعات انجام شده بر روی سایر گونه‌ها بود (Potthoff، ۱۹۸۴؛ Gavaia و همکاران، ۲۰۰۰). براساس پیشنهاد Gavaia و همکاران (۲۰۰۰) محلول الکل و KOH جهت خنثی‌سازی باقی مانده محلول رنگ‌آمیزی غضروف و جلوگیری از آسیب به ساختارهای استخوانی- غضروفی مورد استفاده قرار گرفت. این موضوع جهت جلوگیری از دست رفتن کلسیم و بافت‌های استخوان و در نتیجه دستیابی به کیفیت بالاتر رنگ آلیزارین رد مورد استفاده قرار گرفت.

مهم‌ترین تفاوت بین دستورالعمل‌های مختلف، در مرحله رنگ‌بری و شفاف‌سازی مشاهده می‌شود. در مطالعه حاضر این مرحله قبل از مرحله رنگ‌آمیزی استخوان انجام شد که با مطالعات (Gavaia و همکاران، ۲۰۰۰؛ Dingerkus و Uhler، ۱۹۷۷؛ Taylor و Van Dyke، ۱۹۸۵؛ Potthoff، ۱۹۸۴) (جدول ۲). این مرحله به‌دلیل از بین بردن رنگدانه‌های نمونه‌ها و به‌دست آوردن تصاویر شفاف و مشاهده دقیق ساختارهای اسکلتی مختلف بسیار حائز اهمیت است.

افزایش مدت زمان غوطه‌وری نمونه‌ها در آلیزارین رد هم‌زمان با افزایش میزان بافت‌های استخوانی نسبت به بافت‌های غضروفی در مطالعه حاضر مشاهده شد (جدول ۲) که این موضوع با مطالعه Potthoff (۱۹۸۴) مطابقت دارد ولی با مطالعه Gavaia و همکاران (۲۰۰۰) که مدت زمان مشخصی (۳۰ دقیقه) برای تمامی نمونه‌ها استفاده کرده است مغایرت دارد.

در نهایت استفاده از آنزیم تریپسین جهت هضم بافت‌های پروتئینی و مشاهده دقیق ساختار اسکلتی و غضروفی برای نمونه‌های بالاتر از ۲۶ روزگی بسیار مناسب بود (جدول ۲)، که این موضوع در مطالعات دیگر نیز استفاده شده است (Gavaia و همکاران، ۲۰۰۰). برخی مطالعات به‌دلیل آسیب تریپسین به بافت‌های مختلف به‌جای استفاده از تریپسین از $MgCl_2$ استفاده شده است (Walker و Kimmel، ۲۰۰۷) که این موضوع در مطالعه حاضر مورد آزمون قرار گرفت ولی تاثیر مناسبی در شفاف‌سازی نمونه‌ها به‌خصوص نمونه‌های بزرگ‌تر از ۳۲ روزگی شفاف‌سازی مناسبی حاصل نگردید ولی در نمونه‌های کوچک‌تر از ۳۲ روز، با موفقیت مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲). در این مطالعه میزان ۴۰ میلی مولار $MgCl_2$ بهترین نتیجه را در شفاف‌سازی فیل ماهی در نمونه‌های کوچک‌تر از ۳۰ میلی‌متر به‌همراه داشت که Walker و Kimmel (2007) میزان ۶۰ میلی‌مولار را بهترین غلظت برای شفاف‌سازی ماهی زبرا پیشنهاد داده بودند (جدول ۲).

تشکر و قدردانی

از همکاری و زحمات مسوولین و کارکنان محترم انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری شهید دادمان استان گیلان و مسوولین و کارکنان کارگاه شهید مرجانی استان گلستان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. **Birstein, V.J.; Waldman, J.R. and Bemis, W.E., 2002.** Sturgeon biodiversity and conservation. Kluwer Academic Publishers, 444 p.
2. **Daoulas, C.H.; Economou, N.A. and Bantavas,I.,1991**. Osteological abnormalities in laboratory reared European sea bass (*Dicentrachus labrax*) fingerlings. Aquaculture, 97:169–180.
3. **Darias, M.J.; Mazurais, D.; Koumoundouros, G.; Glynatsi, N.; Christodoulopoulou, S.; Huelvan, C.; Desbruyeres, E.; Le Gall, M.M.; Quazuguel, P.; Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L., 2010**. Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrachus labrax*, Linnaeus, 1758). Aquaculture, 298:300–307.
4. **Dingerkus, G. and Uhler, L.D., 1977**. Enzyme clearing of Alcian blue stained whole small vertebrates, for demonstration of cartilage. Journal of Stain Technology, 52:229–232.
5. **Faustino, M. and Power, D.M., 1998**. Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. Journal of Fish Biology, 52:11–22.
6. **Faustino, M. and Power, D.M., 1999**. Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. Journal of Fish Biology, 54:1094–1110.
7. **Faustino, M. and Power, D.M., 2001**. Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. Journal of Fish Biology, 58:537–572.
8. **Ferna´ndez, I.; Hontoria, F.; Ortiz-Delgado, J.B.; Kotzamanis, Y.; Este´vez, A.; Zambonino-Infante, J.L. and Gisbert, E., 2008.** Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture, 283: 102– 115.
9. **Ferna´ndez, I.; Pimentel, M.; Ortiz-Delgado, J.B.; Hontoria, F.; Sarasquete, C.; Este´vez, A.; Zambonino-Infante, J.L. and Gisbert, E., 2009**. Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. Aquaculture, 295:250–265.
10. **Findeis, E.K., 1993.** Skeletal anatomy of the North American shovelnose sturgeon *Scaphirhynchus platorynchus* (Rafinesque, 1820) with comparisons to other Acipenseriformes. PhD diss., University of Massachusetts, Amherst.
11. **Gavaia, P.J.; Sarasquete, C. and Cancela, M.L., 2000**. Detection of mineralized structures in early stages of development of marine Teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique for bone and cartilage. Journal of Biotechnic and Histochemistry, 75:79–84.
12. **Gavaia, P.J.; Dinis, M.T. and Cancela, M.L., 2002**. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 211: 305–323.
13. **Grande, L. and Bemis, W.E., 1991.** Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes. Journal of Vertebrate Paleontology, 1: 1–121.
14. **Grande, L.; Jin, F.; Yabumoto, Y. and Bemis, W.E., 2002.** *Protopsephurus liui*, a well-preserved primitive paddlefish (Acipenseriformes: Polyodontidae) from the Early Cretaceous of China. Journal of Vertebrate Paleontology, 22:209–237.
15. **Hilton, E.J.; Grande, L. and Bemis, W.E., 2011.** Skeletal Anatomy of the ShortnoseSturgeon,*Acipenser brevirostrum* Lesueur, 1818, and the Systematics of Sturgeons (Acipenseriformes, Acipenseridae). Journal of Fieldiana Life and Earth Sciences, 3:1-168.
16. **Koumoundouros, G.; Gagliardi, F.; Divanach, P.; Boglione, C.; Cataudella,**

S. and Kentouri, M., 1997a. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. Aquaculture, 149:215–226.

17. **Koumoundouros, G.; Oran, G.; Divanach, P.; Stefanakis, S. and Kentouri, M., 1997b**. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Aquaculture, 156:165–177.
18. **Koumoundouros, G.; Divanach, P. and Kentouri, M., 2000**. Development of the skull in *Dentex dentex* Osteichthyes: Sparidae). Journal of Marine Biology, 136: 175–184.
19. **Koumoundouros, G.; Maingot, E.; Divanach, P. and Kentouri, M., 2002**. Kyphosis in reared European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. Aquaculture, 209: 49–58.
20. **Lall, S.P. and Lewis-McCrea, L., 2007**. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish, an overview. Aquaculture, 267:3–19.
21. **Marino, G.; Boglione, C.; Bertolini, B. and Cataudella, S., 1993**. Observations on development and anomalies in the appendicular skeleton of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, larvae and juveniles. Journal of Aquaculture Fish Management, 24:445–456.
22. **Mazurais, D.; Darias, M.J.; Gouillou-Coustans, M.F.; Le Gall, M.M.; Huelvan, C.; Desbruye`res, E.; Quazuguel, P.; Cahu, C. and Zambonino-Infante, J.L., 2008**. Dietary vitamin mix levels influence the ossification process in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. American Journal of Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol, 294: 520–527.
23. **Mazurais, D.; Glynatsi, G.; Darias, M.J.; Christodoulopoulou, S.; Cahu, C.L.; Zambonino-Infante, J.L. and Koumoundouros, G., 2009**. Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. Aquaculture, 294: 262–270.
24. **Park, E.H. and Kim, D.S., 1984**. A procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae while rendering all other tissues transparent. Journal of Staining Technology, 59:269–272.
25. **Potthoff, T., 1984**. Clearing and staining techniques. In: Ontogeny and sytematics of fishes. Moser H.G., Richards W.J., Cohen D.M., Fahay M.P., Kendall A.W., Richardson S.L., (Eds). The American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Spec. Publishers. 1:35–37.
26. **Taylor, W.R. and Van Dyke, G.C., 1985**. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. Journal of Cybium, 9:107–119.
27. **Verhaegen, Y.; Adriaens, D.; De Wolf, T.; Dhert, P. and Sargeloos, P., 2007.** Deformities in larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a qualitative and quantitative analysis using geometric morphometrics. Aquaculture, 268:156-168.
28. **Wagemans, F.; Focant, B. and Vandewalee, P., 1998**. Early development of the cephalic skeleton in the turbot. Journal of Fish Biology, 52:166–204.
29. **Walker, M.B. and Kimmel, C.B., 2007.** A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. Journal of Biotechnic and Histochemistry, 82:23-28.

Sturgeon fishes optimizing of staining protocol for skeletal studies during developmental stages

- **Reza Asgari∗:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, P.O. Box: 4111, Karaj, Iran
- **Soheil Eagderi:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, P.O. Box:4111, Karaj, Iran
- **Gholam Reza Rafiea:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, P.O. Box:4111, Karaj, Iran
- **Naser Agh:** Artemia and Aquatic Animal Institute, University of Urmia, P.O. Box: 57561-51818, Urmia, Iran
- **Hadi Pourbagher:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, P.O. Box: 4111, Karaj, Iran
- **Hamid Eshaghzade:** Department of Fishery, Faculty of Natural Resources and marine Sciences, University of Hormozgan, Box:3995, Bandar Abbas, Iran

Received: January 2013 Accepted: May 2013

Keywords: Skeletal ontogeny, Sturgeon fishes, Beluga (*Huso huso*), skeletal staining, Alcian blue-Alizarin red

Abstract

Alcian blue-Alizarin red staining protocol during different growth stages of Beluga (*Huso huso*), as a model of sturgeon fishes, for skeletal ontogeny studies was prepared successfully. For an optimal staining protocol design both fish size and their morphological characteristics at each developmental stage were considered, since such parameters notably influence the staining of tissues. Three developmental windows were determined for an optimal staining procedure: (i) 11-20 mm, (ii) 29-30 mm, and (iii) more than 30 mm total length (TL). Generally, for skeletal staining, alcian blue and alizarin Red are used for stain cartilage and bone respectively. The incubation times of the different solutions were adjusted to allow the stain penetration for revealing the integrity of cartilaginous and bony tissues without significant tissue degradation. Since it was possible to detect the first cartilaginous and mineralized structures in specimens as small as 11 and 20 mm TL, respectively, this procedure is a useful tool to study the sturgeon fishes skeletal ontogenesis, to precociously diagnose skeletal malformations in small larvae and eventually to better characterize the effect of different environmental and/or nutritional factors on the ossification status of specific skeletal components.

∗Corresponding author's email: asgarireza@yahoo.com