ارتباط وزن بدن بچه ماهیان دو تابستانه آزاد خزر (*Salmo trutta caspius*) با توان تنظیم اسمزی در آب لب شور (۱۳ppt)

حلیمه رجبی و صابرخدابنده *

نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه بیولوژی دریا

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

چکیده

در فرایند اسمولتیفیکاسیون و سازگاری با دریا، وزن و سن ماهی مهم می باشد. در مطالعه حاضر، نرخ مرگ‌و میر، تغییرات مورفولوژیک آبشش و سلولهای کلراید آبششی در اوزان ۵، ۱۵ و ۲۵ گرم (ماهیان هم سن) در ماهی آزاد خزر، پس از ۱۰ روز انتقال به آب لب شور خزر مقایسه کردیم. بافت شناسی آبشش با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و ایمونولوکالیزه نمودن $Na^+K^+ATPase$ با استفاده از آنتی‌بادی $IgG\alpha_5$ صورت گرفت. تصاویر ایمونو گرفته شده با استفاده از نرم افزار Image Tools بررسی شد. نرخ مرگ و میر، در اوزان مختلف ۵، ۱۵ و ۲۵ گرم پس از مواجه با آب لب شور خزر (۱۳ppt)، به ترتیب برابر با: ۲۵٪، ۸٪، و۰٪ بود و ضایعاتی در ساختار آبشش نمونه‌ها مشاهده گردید. سلولهای کلراید در وزن ۵ گرم، افزایش ولی مساحت آنها کاهش معنی‌دار داشت. در وزن ۱۵ گرم، تعداد کل سلول های کلراید و مساحت آنها در مواجه با شوری ۱۳ppt تغییری نداشت اما در وزن ۲۵ گرم، کاهش معنی‌داری در تعداد سلولهای کلراید مشاهده شد. با توجه به نتایج حاضر، در بچه-ماهیان هم‌سن، ماهی با وزن کم (۵گرم) قادر به تنظیم اسمزی نبوده و در وزن ۱۵گرم دارای سازگاری بهتری به آب دریای خزر نسبت به سایر وزن‌هاست و پس از رسیدن به ۲۵ گرم با توجه به پشت سر نهادن مرحله اسمولتیفیکاسیون، به محیط آب شیرین سازگار شده و در دراز مدت توانایی تنظیم اسمزی در آب شور را از دست می‌دهند.

واژه های کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، *Salmo trutta caspius*، وزن، نرخ مرگ و میر، سلول کلراید

* نویسنده مسئول، تلفن : ۰۱۲۲-۶۲۵۳۱۰۱ ، پست الکترونیکی: skhoda@modares.ac.ir

مقدمه

ماهیان استخوانی یوری هالین، توانایی سازگاری با شوری-های مختلف محیطی را دارند، زیرا که فعالیت چندین مکانیسم تنظیم اسمزی در اپی تلیوم برانشی و کلیه در نگهداری محیط درونی آنها کمک می‌کند. در جریان سازگاری با محیط، دو فاز پیاپی روی می‌دهد: دوره نخست با تغییر در متغیرهای اسموتیک مشخص می‌شود و در پی آن یک دوره تنظیم شدید وجود دارد، تا زمانی که این متغیرها به حالت پایدار برسند (۱۸). فعالیت پمپ آنزیم Na^+K^+ سلولهای کلریدی برانشی برای قرارگیری در محیط با شوری جدید ضروری است. تغییرات فعالیت پمپ آنزیم $Na^+ K^+$ آبشش با شوری محیط متغییر است (۱۳، ۱۱ و ۴۲). در گونه‌های آنادرم یا مهاجر به رودخانه مثل *Oncorhynchus kisutch* (۴۱)، *Salmo gairdneri* (۲۲)، *Salmo salar* (۲۸)، فعالیت پمپ$Na^+ K^+$ ATPase ۳-۷ روز بعد از انتقال به آب دریا مشاهده شده، تاخیر در فعالیت $Na^+K^+ATPase$ آبشش در واکنش به تغییرات اسمزی، منعکس کننده تغییر در بیان ژن است (۳۶ و ۴۵). تغییر فعالیت $Na^+K^+ATPase$ در طی سازگاری با شوری در بیشتر ماهیان با تغییر در تعداد و اندازه سلولهای کلریدی برانشی همراه است. جایگاهی که بیشترین تنظیم

یونی را برعهده دارد (۴۲، ۴۳ و ۴۸). سلولهای کلراید (سلولهای غنی از میتوکندری) در آبشش‌ها، مهمترین متعادل کننده برخی یونها در ماهیان هستند که اولین جایگاه ترشح سدیم و کلر در آب دریا می باشند (۱۱). Na^+K^+، یک پمپ کلیدی در انتقال یون است و در غشای قاعده ای-جانبی جای گرفته است. این پمپ تولید شیب یونی و الکترونی در ترشح نمک در آب دریا و جذب یون در آب شیرین می‌کند (۱۱و ۳۱).

ماهی آزاد دریای خزر از جمله ماهیان مهاجر و زیر گونه بومی دریای خزر می-باشد که در دریا زندگی و تغذیه می کند و جهت تخم ریزی وارد رودخانه می‌گردد. زیستگاه این ماهی در سواحل غربی و جنوبی دریای خزر پراکنده می باشد و در سواحل شمالی و همچنین سواحل شرقی کمتر مشاهده می‌شود (۵). ماهی آزاد خزر بیشتر عمر خود را در دریا سپری می‌کند. پس از ورود به دریا ۳ الی ۵ سال در دریا تغذیه و رشد کرده و پس از رسیدن به سن بلوغ به حکم غریزه به رودخانه مادری مهاجرت می‌کند.

توانایی تنظیم اسمزی در آب دریا تقریبا تحت تاثیر اندازه بدن است (۲۱). ارتباط مثبت بین قابلیت تنظیم اسمزی، تحمل آب دریا و قابلیت مهاجرت از یک طرف و اندازه بدن آزاد ماهیان در بسیاری مطالعات مشاهده شده است (۲۱، ۲۵ و ۴۹). افزایش توانایی تنظیم اسمزی با افزایش وزن، فاکتور اصلی در گسترش توان تحمل شوری و تنظیم اسمزی می‌باشد (۶و۳۹). در طبیعت بچه‌ماهیان پس از یک یا دو سال و یا حتی بیشتر هم ممکن است به محدوده وزنی معینی نرسند، اما در کارگاههای تولیدی، تنها پس از چند ماه به اندازه مناسب جهت تنظیم اسمزی دست می-یابند که به این ماهی‌ها در این مرحله اسمولت گویند. اگر جلوی مهاجرت اسمولت‌ها گرفته شود قدرت تحمل شوری بعد از چند هفته تحلیل رفته و قابلیت تنظیم اسمزی را از دست می‌دهند (۳).

سالانه میلیون ها بچه‌ماهی دو تابستانه دریای خزر که معمولاً دارای وزن متفاوتی بین ۵ تا ۳۰ گرم می‌باشند در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی کلاردشت تولید و به دریای خزر رهاسازی می‌شوند. گرچه این بچه‌ماهیان هم سن هستند ولی تفاوت وزن و سایز در آنها، می‌تواند سبب تفاوت توانایی آنها برای مقابله با استرس‌های بعد از رهاسازی، خصوصاً شوری آب باشد. علی رغم انجام پاره-ای تحقیقات روی تنظیم اسمزی بچه‌ماهیان آزاد خزر، ارتباط وزن با توان تنظیم اسمزی در بچه ماهیان هم سن، کمتر مطالعه شده و از روش ایمونوهیستوشیمی برای این سنجش استفاده نشده است. لذا تحقیق حاضر به منظور سنجش آمادگی این بچه ماهیان برای انجام تبادلات یونی در اوزان مختلف (۵، ۱۵ و ۲۵ گرم) با استناد به الگوی پراکنش سلولهای کلراید به روش ایمونوهیستوشیمی انجام گرفت.

مواد و روشها

تیمارها: این تحقیق به مدت ۱۰ روز در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی شهید باهنر کلاردشت بر روی بچه ماهیان دو تابستانه آزاد دریای خزر با اوزان مختلف انجام شد. ۱۸۰ قطعه بچه ماهی با وزن‌های ۵، ۱۵، ۲۵ گرم (هم سن) پس از رقم بندی به تعداد ۶۰ قطعه به حوضچه-های بتونی ۱ متر مکعبی حاوی ۰/۳ متر مکعب آب شیرین و آب دریای خزر ppt۱۳ منتقل شدند (۳۰ قطعه از هر وزنی به آب شیرین و ۳۰ قطعه به آب خزر). در طول دوره ده روزه، هر روز میزان مرگ و میر ثبت شده و پس از پایان این دوره ماهی‌های زنده مانده بعد از بیهوشی توسط پودر گل میخک، بیومتری گردیدند. آبشش ۴ عدد ماهی از هر وزن، جهت انجام بافت شناسی جدا و در آب شست و شو داده شده و در محلول بوئن به مدت ۴۸ ساعت فیکس شدند (۳۸).

بافت شناسی و ایمونو هیستوشیمی: نمونه‌ها بعد از ۴۸ ساعت از بوئن خارج و پس از آبگیری در داخل پارافین

مایع (داخل آون با دمای ۵۸ درجه سانتی گراد) قرار داده شد و در نهایت در پارافین قالب‌گیری شدند.

از قالب‌ها بوسیله میکروتوم (ساخت شرکت دید سبز) برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه و جهت مطالعه بافت شناسی بوسیله هماتوکسلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری Micros مطالعه شدند.

ایمونولوکالیزه نمودن پمپ $Na^+K^+ATPase$ با استفاده از آنتی بادی $IgG\alpha_5$ (Mouse Monoclonal Antibody Raised Against the α-subunit of the Chicken $Na^+K^+ATPase$; Hybridoma Bank, University of lowa, USA), و میکروسکوپ نوری فلوئورسانس انجام گرفت. لام‌ها بعد از پارافین زدایی و آبگیری در الکل اتانول به ترتیب ۱۰ دقیقه در محلول PBS (Phosphate Buffered Saline)، ۱۰ دقیقه در محلول A (۲۵۰ سی سی PBS ده میلی مول + ۲/۱۸ گرم کلرید سدیم) و ۲۰ دقیقه در محلول B (۵۰ درصد PBS و ۵۰ درصد پودر شیر خشک Regiler جهت ایجاد یک محیط پروتئینی برای کارکرد بهتر آنتی بادی) قرار داده شدند (۱، ۶ و ۱۵). سپس لامها به مدت ۲ دقیقه در PBS شستشو و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب، چیده شدند. بر روی هر لام ۲-۳ قطره از آنتی بادی $IgG\alpha_5$ رقیق شده در PBS [(۵۰٪آنتی بادی +۵۰٪ محلول C (۲ سی سی محلول B +۸ سی سی آب مقطر)] اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق نگه داری شد. بعد از سپری شدن این زمان، لامها به مدت ۲ دقیقه در محلول PBS شستشو داده شدند. آنگاه ۲-۳ قطره از آنتی بادی FITC (Mouse Monoclonal Anti-florescein Antibody; Merck Germany (Fluorescein Isothiocyanate Conjugate; روی هر لام اضافه شده (۹۸۵ µlآنتی بادی + ۱۵ µl محلول C) و به مدت یک ساعت و سی دقیقه در محیط کاملا تاریک نگه داشته شدند. سپس لام ها در PBS شستشو شده و با استفاده از مایع مونتاژ، مونتاژ شدند.

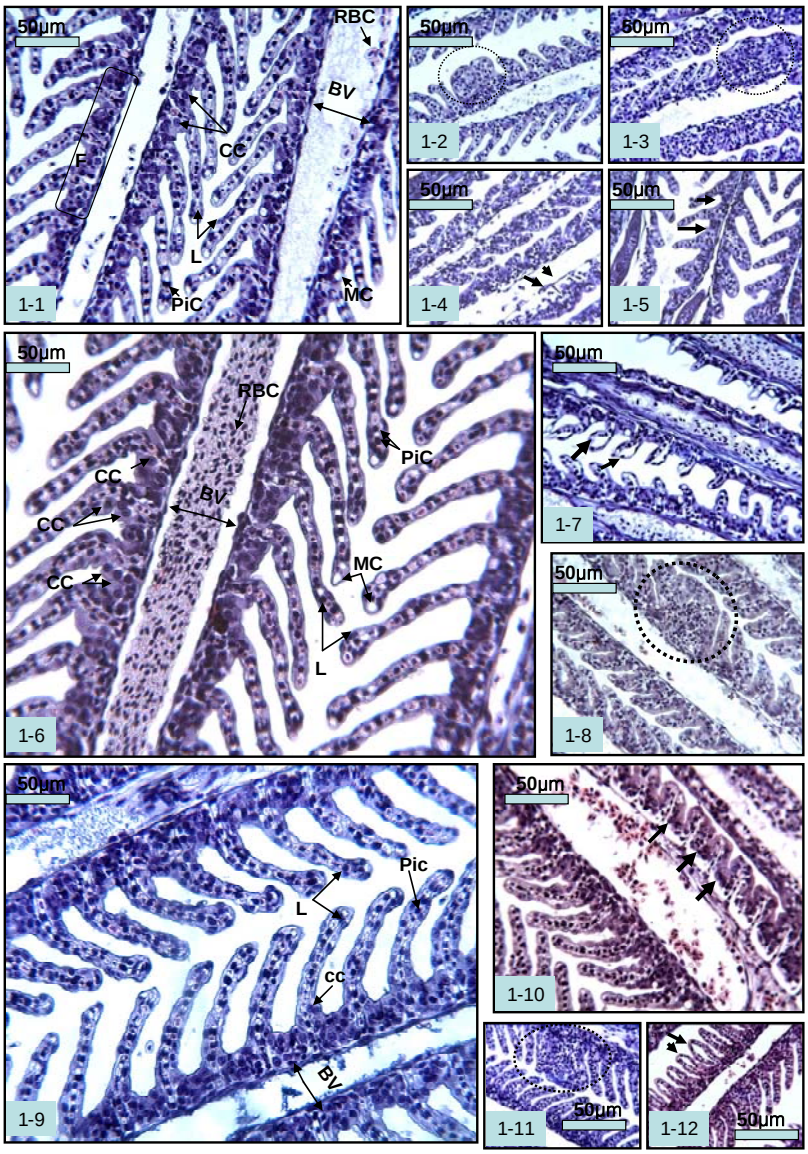
لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس (TE2000S،Nikon) مشاهده و عکس‌برداری شدند. تمام اندازه‌گیری ها توسط نرم افزار ImageTools انجام شد. سلولهای کلراید در سطح ۱ mm^2 بافت آبششی شمارش شدند و درصد سطح اشغالی توسط سلولهای کلراید نیز محاسبه گردید (۴۶).

مقایسات آماری: تمامی مقادیر بدست آمده با استفاده از نرم افزار Spss 11.5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده‌ها به صورت Mean ± SEM ارائه شده و $P<0.05$ به عنوان کمترین سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

در جریان انتقال بچه‌ماهیان آزاد خزر از آب شیرین به آب لب شور، نرخ مرگ و میر هر یک از وزن‌ها، پس از طی دوره ده روزه ثبت گردید. وزن ۵ گرم حدود ۲۵٪، وزن ۱۵ گرم حدود ۸٪، وزن ۲۵ گرم تلفاتی نداشتند. همچنین مشاهدات بافت شناسی نیز نشان دهنده ضایعات در آبشش بچه ماهیان آزاد خزر پس از انتقال به آب لب شور بود. در تمامی نمونه‌های شاهد در همه اوزان، فیلامنت‌ها و لاملاها ساختاری طبیعی داشتند (شکل ۱-۱، ۶-۱ و ۹-۱). اما پس از انتقال به آب لب شور، ضایعاتی از قبیل چسبندگی لاملا (شکل ۲-۱، ۳-۱، ۸-۱ و ۱۱-۱)، پارگی در لاملا (شکل ۷-۱ و ۱۲-۱)، جدا شدن لاملا از سطح فیلامنت (شکل ۴-۱، ۱۰-۱) و همچنین انقباض رگ خونی (۵-۱) مشاهده شد.

در مطالعه ایمونوهیستوشیمی نیز، در نمونه‌های آب شیرین همچنان که در تصاویر دیده می شود. در همه اوزان فیلامنت ها و لاملاها ساختاری کاملاً طبیعی را نشان می دهند. (شکل ۱-۲) و (شکل ۵-۲) و (شکل ۷-۲) و پس از مواجه با آب لب شور خزر برخی از ضایعات بافتی قابل رویت بودند (شکل ۲-۲، ۳-۲، ۴-۲، ۶-۲، ۸-۲ و ۹-۲).



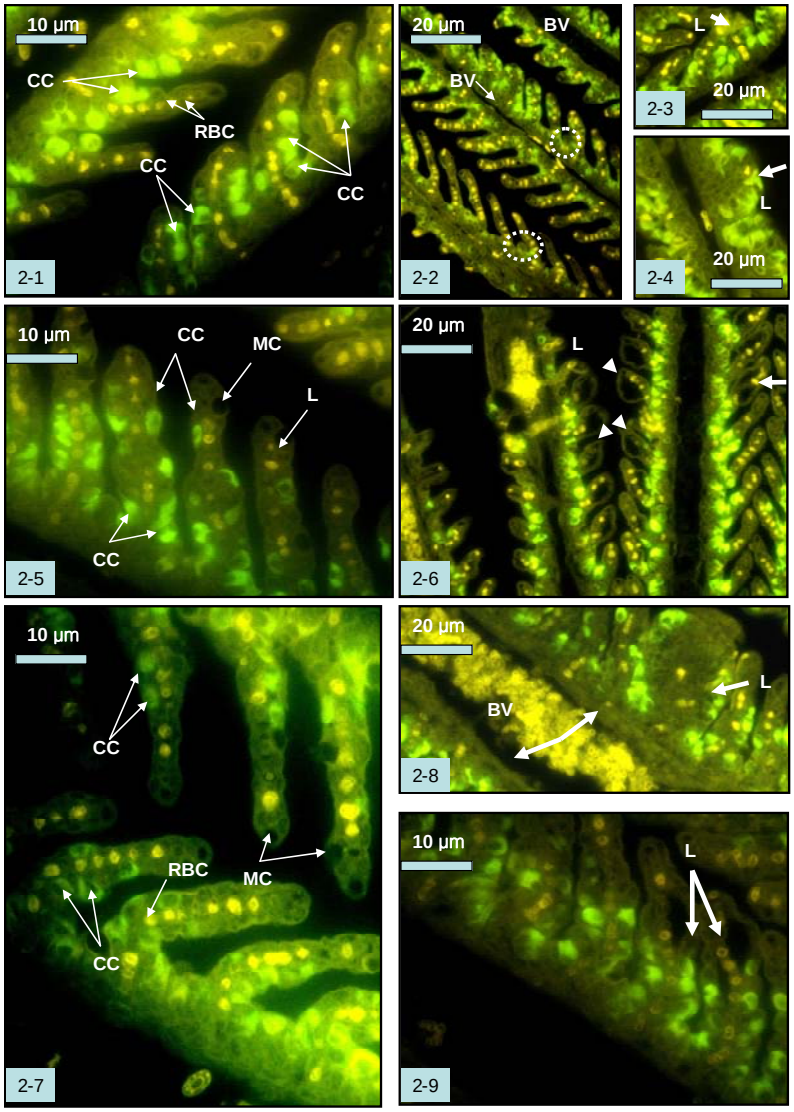
شکل ۱- بافت شناسی کلاسیک آبشش بچه ماهی آزاد دریای خزر در اوزان مختلف و مشاهده تغییرات ساختاری پس از مواجه با آب لب شور۱۳ ppt (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین)

برش طولی از رشته های آبششی در وزن ۵ گرم در آب شیرین، لاملاها دارای ساختاری کاملا طبیعی هستند (شکل۱-۱) و پس از مواجه با آب لب شور ppt۱۳ چسبندگی در لاملاها (شکل۲-۱ و شکل ۳-۱)، جدایی لاملا از سطح فیلامنت (شکل ۴-۱) وانقباض عروق خونی (شکل ۵-۱) مشاهده شد.

برش طولی از رشته‌های آبششی در وزن ۱۵گرم در آب شیرین، لاملاها دارای ساختاری کاملاً طبیعی هستند (شکل۶-۱) و پس از مواجه با آب لب شور ppt۱۳، پارگی در لاملاها (شکل ۷-۱) و چسبندگی در لاملا (شکل ۸-۱) مشاهده شد.

برش طولی از رشته‌های آبششی در وزن ۲۵گرم در آب شیرین، لاملاها دارای ساختاری کاملاً طبیعی هستند (شکل۹-۱) و پس از مواجه با آب لب شور ۱۳ ppt، جدایی لاملا از سطح فیلامنت (شکل ۱۰-۱) و چسبندگی در لاملاها (شکل ۱۱-) و پارگی در لاملاها (شکل ۱۲-۱) مشاهده شد.

اختصارات: BV: رگ خونی (Blood Vessel)، CC: سلول کلراید (Chloride Cells)، F: رشته آبششی (Filament)، L: تیغه آبششی (Lamellae)، MC: سلول موکوسی (Mucus Cell)، PC: سلول سنگفرشی (Pavement Cell)، PiC: سلول پیلار (Pillar Cell)، RBC: سلولهای خونی (Red Blood Cells)



شکل ۲- مکان یابی سلول‌های کلراید با استفاده از مکان یابی پمپ $Na^{+}K^{+}ATPase$ در بچه‌ماهی آزاد خزر و مشاهده تغییرات ساختاری پس از مواجه با آب لب شور۱۳ ppt(به روش ایمونو هیستوشیمی).

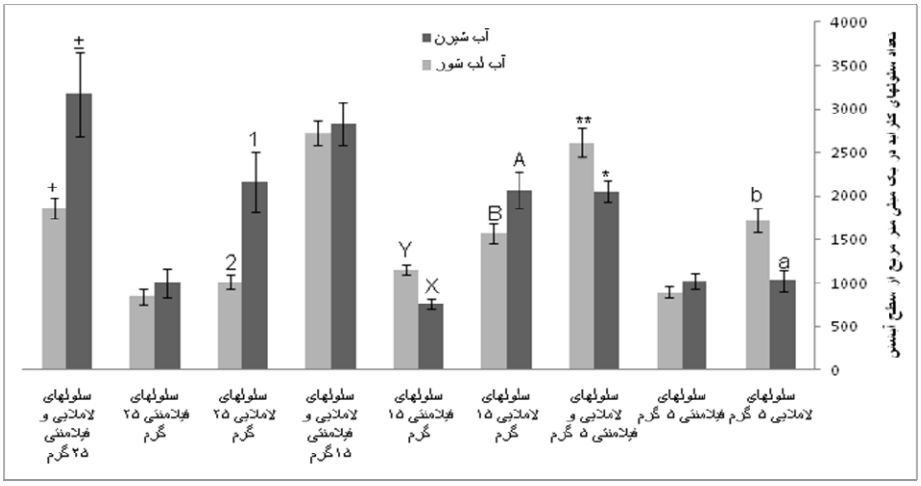
با افزودن آنتی کوری$IgG\alpha_5$ سلول‌های کلراید به رنگ سبز درخشان در نواحی مختلف ظاهر شده اند (شکل۱-۲). در وزن ۵ گرم پس از مواجه با آب لب شور۱۳ppt، ضایعاتی از قبیل انقباض عروق خونی (شکل ۲-۲) و چسبندگی در لاملاها (شکل ۳-۲) و (شکل ۴-۲) نشان داده شده است. همچنین چند تک سلولی در لاملاها دیده می شوند (شکل ۲-۲).

برش طولی از رشته‌های آبششی در وزن ۱۵گرم در آب شیرین، لاملاها دارای ساختاری کاملاً طبیعی هستند (شکل۵-۲). پس از مواجه با آب لب شور خزر پارگی لاملا (شکل ۶-۲) دیده می‌شود.

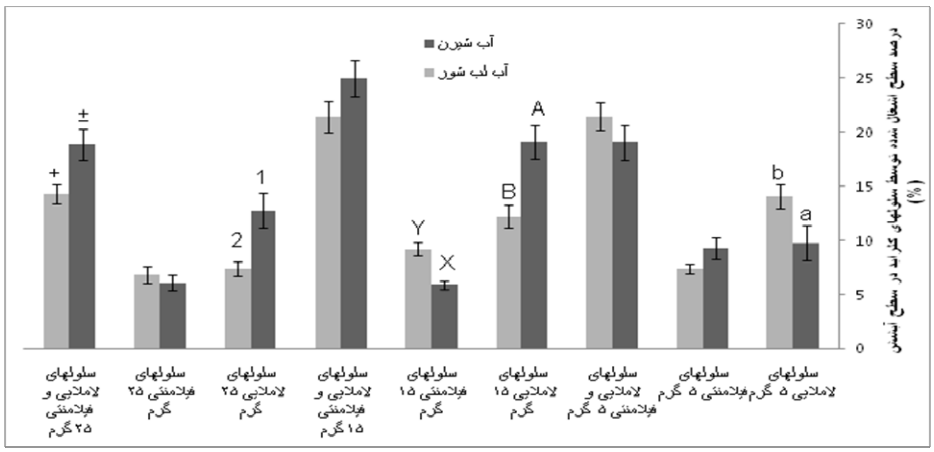
برش طولی از رشته‌های آبششی در وزن ۲۵ گرم در آب شیرین، لاملاها دارای ساختاری کاملاً طبیعی هستند (شکل۷-۲) و پس از مواجه با آب لب شور خزر چسبندگی لاملاها (شکل ۸-۲) و پارگی لاملا (شکل ۹-۲) به وضوح دیده می شود.

اختصارات: BV: رگ خونی (Blood Vessel)، CC: سلول کلراید (Chloride Cells)، L: تیغه آبششی (Lamellae)، MC: سلول موکوسی (Mucus Cell)، RBC: سلولهای خونی (Red Blood Cells)

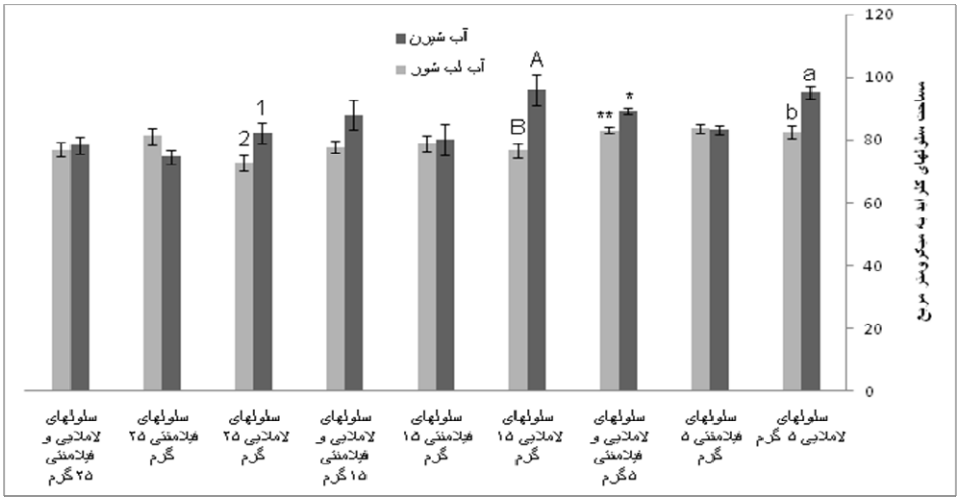
در وزن ۱۵ گرم، تعداد کل سلولهای کلراید در $1mm^2$ از مقطع آبشش، اندازه آنها و درصد سطح اشغال شده توسط آنها، در دو محیط آب شیرین و لب شور تفاوتی نداشت. اما تعداد و اندازه سلول های کلراید لاملایی و درصد سطح اشغال شده توسط آنها در مواجه با آب لب شور کاهش معنی‌داری را نشان داد. در حالی که، تعداد و درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید فیلامنتی افزایش معنی داری داشت و در اندازه سلول های کلراید فیلامنتی تغییری حاصل نشد ($P<0.05$) (نمودارهای ۱، ۲ و ۳).



نمودار ۱- مقایسه تعداد سلولهای کلراید در ماهیان دو تابستانه آزاد خزر در آب شیرین و آب لب شور. تعداد کل سلولهای کلراید لاملایی و فیلامنتی در وزن ۵ گرم افزایش و در وزن ۲۵ گرم کاهش و در وزن ۱۵ گرم تفاوت معنی‌داری نداشت.
(حروف و علائم غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) در دو گروه ماهیان آب لب شور و آب شیرین در اوزان مختلف می باشد)



نمودار ۲- مقایسه درصد سطح اشغالی توسط سلولهای کلراید در مقطع آبششی در ماهیان دو تابستانه آزاد خزر در آب شیرین و آب لب شور. سطح اشغالی سلولهای کلراید در دو وزن ۵ و ۱۵ گرم پس از انتقال به آب لب شور خزر بدون تغییر اما در وزن ۲۵ گرم کاهش معنی داری داشت.
(حروف و علائم غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p<0.05$) در دو گروه ماهیان آب لب شور و آب شیرین در اوزان مختلف می باشد)



نمودار ۳- مقایسه مساحت سلول‌های سلولهای کلراید در ماهیان دو تابستانه آزاد خزر در آب شیرین و آب لب شور. در انتقال به آب لب شور خزر تنها اندازه سلولهای کلراید وزن ۵ گرم کاهش معناداری داشت و در دو وزن دیگر تغییری مشاهده نشد.
(حروف و علائم غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P<0.05$) در دو گروه ماهیان آب لب شور و آب شیرین در اوزان مختلف می باشد)

در وزن ۲۵ گرم، تعداد سلول‌های کلراید و درصد سطح اشغال شده توسط آنها در $1mm^2$ از مقطع آبشش، پس از مواجه با آب لب شور کاهش یافت. که این کاهش در بخش لاملایی آبشش مشاهده شد و در تعداد و اندازه و سطح اشغال شده توسط سلول‌های کلراید فیلامنتی تغییری مشاهده نشد. همچنین اندازه سلول های کلراید لاملایی در آب لب شور نسبت به آب شیرین کاهش معنی داری داشت ($p<0.05$) (نمودار ۱، ۲ و ۳).

بحث

نرخ مرگ و میر بچه ماهیان دو تابستانه آزاد خزر هم سن، پس از دوره ده روزه، یک روند کاهشی با افزایش وزن داشت. به این صورت که بیشترین مرگ و میر در وزن ۵ گرم (حدود ۲۵٪) مشاهده شد و در وزن ۲۵ گرم، مرگ و میری دیده نشد. در مطالعه‌ای، انتقال هیبرید ماهی آزاد و قزل آلا به شوری ۱۲ و ۱۸ ppt، منجر به تلفاتی در حدود ۲۳٪ و ۴۰٪ گردید و انتقال ماهی آزاد ۱۰ گرمی به همین شوری‌ها مرگ و میری نداشت (۲). در تحقیقات سایر محققین بر روی گونه‌های مختلف و با اوزان متفاوت، انتقال بچه‌ماهیان به آب لب شور ۱۳ ppt (۱۲، ۳۲) تلفاتی نداشت. همچنین پیش سازگاری آزاد ماهیان با شوری‌های کمتر قبل از اسمولت شدن، مقاومت به شوری را افزایش می دهد (۷). Parry (۱۷)، بیان کرد که فاکتور اصلی در گسترش توان تحمل شوری در آزاد ماهیان اندازه بدن بوده و ارتباطی به سن ماهی ندارد، که در نتایج سایر محققین هم اشاره شده است (۱۷، ۳۹).

صیاد بورانی و همکاران (۱۳۸۹)، نیز دلیل مهم در عدم توانایی اسمزی ماهیان ۵ گرمی در آب خزر را افزایش سطح فشار اسمزی و به دنبال آن عدم فعالیت غده تیروئید (بدلیل تاثیر مستقیم این غده در اندامهای دخیل در تنظیم اسمزی و پدیده اسمولت شدن) بیان نمودند، که در نهایت باعث مرگ و میر بیشتر در این وزن نسبت به سایر اوزان می گردد. (۴). در بررسی حاضر در خصوص افزایش توان تحمل شوری در بچه‌ماهیان، نتایج مبین آن است که تحمل شوری در انتقال مستقیم بچه ماهیان با اندازه بدن و وزن بچه ماهی افزایش می‌یابد.

در مشاهدات تصاویر هیستولوژی، پس از مواجه با آب لب شور، ضایعاتی از قبیل چسبندگی در لاملاها، پاره شدن

لاملا و همچنین جدا شدن لاملا از سطح اپی تلیالی فیلامنت مشاهده شد که بیشترین ضایعات، در وزن ۵ گرم و کمترین آن در وزن ۱۵ گرم، در مواجه با شوری ۱۳ ppt مشاهده شد. بیشتر این تغییرات مربوط به چسبندگی در لاملا ها بود. در مطالعه‌ای که سلطان کریمی (۲) بر روی هیبرید ماهی قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد در مواجه با شوری ۱۲ و ۱۸ ppt انجام داد، تغییرات ساختاری از جمله چسبندگی لاملا و پارگی در لاملا را مشاهده نمود. در مطالعات سایر محققین روی گونه‌های مختلف ماهیان، به اینگونه ضایعات در بافت آبششی، پس از انتقال ماهی به شوری بالاتر اشاره نشده است (۸، ۱۹، ۲۳، ۳۰، ۴۲ و ۴۶). تفاوت نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین می‌تواند به دلیل تفاوت گونه‌ای و خصوصیات متفاوت ترکیبات یونی آب خزر نسبت به سایر آبها و همچنین انتقال مستقیم ماهیها از آب شیرین به آب لب شور خزر می‌باشد.

مطالعات ایمونو هیستوشیمی نیز بیانگر حضور سلولهای کلراید در بخشهای مختلف از جمله لاملا و فیلامنت بود. در انتقال بچه ماهیان به آب لب شور خزر در تمامی اوزان تغییری در جایگاه سلول های کلراید حاصل نشد. در مطالعه سایر محققین نیز حضور سلول های کلراید در بخش لاملا و فیلامنت اشاره شده است (۱۶، ۱۹، ۳۰، ۳۸ و ۴۰). همچنین این محققین بیان کردند که سلولهای کلراید بخش لاملایی آبشش در سازگاری ماهی با آب شیرین نقش دارند و در مواجه با آب شور و لب شور از تعداد آنها کاسته می شود. کاهش تعداد سلولهای کلراید لاملایی در مواجه با آب لب شور خزر در دو وزن ۱۵ و ۲۵ گرم، با آنچه در این مطالعات بیان شده هم سو می باشد.

در انتقال بچه ماهیان به آب لب شور، تعداد کل سلولهای کلراید در $1mm^2$ از مقطع آبشش، در وزن ۵ گرم، افزایش و در ۲۵ گرم کاهش معنی‌داری داشت و در وزن ۱۵ گرم تغییری مشاهده نشد.

در وزن ۵ گرم با وجود افزایش تعداد سلول های کلراید در مقطع آبششی، در درصد سطح اشغالی توسط آنها، تغییری حاصل نشد. زیرا که اندازه سلولهای کلراید در مواجه با آب لب شور به علت پلاسمولیز سلولی ناشی از استرس انتقال، کاسته شد. در حالیکه در مطالعات سایر محققین افزایش تعداد سلولها همراه با افزایش اندازه سلول بوده و این امر در اپی تلیوم فیلامنت روی می‌دهد و سلول‌های کلراید لاملایی در مواجه با آب لب شور کم می‌شوند و بیان شده که افزایش اندازه و تعداد سلولهای کلراید پس از انتقال به آب دریا، نشان دهنده افزایش در محتوای پمپ Na^+K^+-ATPase سلولهای کلراید است. این سلولها که در روی فیلامنت قرار دارند جایگاه ترشح نمک می‌باشند (۲۷، ۲۹ و ۳۷). در نتیجه می‌توان بیان کرد که در وزن ۵ گرم، نوعی بی نظمی و اختلال در تکثیر و ازدیاد سلولهای کلراید در این وزن مشاهده می‌شود و علت آن را می‌توان عدم گسترش و تکامل مکانیسم‌های تنظیم اسمزی دانست اما در انتقال بچه ماهیان وزن ۱۵ گرم به آب لب شور خزر، تعداد سلولهای کلراید فیلامنتی افزایش معنی‌دار و اندازه و تعداد سلول های کلراید لاملایی کاهش معنی‌داری را نشان دادند. این امر علاوه بر توصیف نقش متفاوت این سلول ها در محیط های مختلف همسو با نتایج سایر محققین می باشد که سلول های کلراید در گونه های مختلف و در شرایط شوری مختلف با توجه به نیاز یونی موجود در محیط جدید، در اندازه و تعداد آنها تغییر حاصل گردید (۱۴، ۲۶، ۳۱، ۳۴، ۳۸، ۴۲ و ۴۶). Foskett و همکاران (۲۴) بیان کردند، که مقدار ترشح نمک در آب دریا با اندازه سلولهای کلراید ارتباط دارد. زیرا نیروی محرک جهت خروج و ترشح توسط سلولهای کلراید در ماهیان سازگار با آب دریا، شیب الکتروشیمیایی سدیم است که به وسیله Na^+K^+ATPase پایدار می‌شود و فعالیت ایمنیایی قوی Na^+K^+ATPase در سلولهای کلراید برانشی و سلولهای حجیم شده، یکی از عملکردهای بسیار مهم در سازگاری موفقیت آمیز با آب دریا است. این امر در بچه

آزاد ماهیان خزر با توجه به شوری آب خزر که حدود ppt۱۳ است و دارای ترکیبات یونی متفاوتی نسبت به آبهای دیگر است، دیده نشد. در این مطالعه در تمامی وزن ها، اندازه سلول های کلراید لاملایی در مواجه با آب لب شور کاسته شده و اندازه سلولهای کلراید فیلامنتی بدون تغییر مانده است و اندازه کل سلول‌های کلراید در وزن ۱۵ و ۲۵ گرم ثابت و در ۵ گرم کاهش یافته است. در تحقیقاتی که Lima و Kulz (۳۳)، بر روی ماهی *Fundulus heteroclitus* و Fujio و Shikano (۴۶) بر روی *Poecilia reticulate* و Van der Heijden (۸) روی *O.mossambicus* در مواجه با شوری دریا انجام دادند بیان کردند، که اندازه سلولهای کلراید افزایش می یابد. همچنین در مطالعه اثر شوری روی *Alosa sapiidissima* بیان داشتند که پس از مواجه این ماهی با آب دریا، سلولهای کلراید آبششی نه تنها از نظر اندازه بزرگ‌تر شده‌اند بلکه شکل آنها نسبت به زمانی که در آب شیرین هستند پهن‌تر شده است (۳۵).

در وزن ۲۵ گرم تعداد و درصد سطح اشغالی توسط سلولهای کلراید لاملایی در مواجه با آب لب شور خزر کم شد. کاهش تعداد سلولهای کلراید لاملایی در وزن ۲۵ گرم و عدم افزایش در تعداد سلولهای کلراید فیلامنتی منجر به کاهش در تعداد کل سلول‌های کلراید در مقطع آبششی گردید. مطابق نتایج Fraklin (۲۰)، ماهی با تعداد کم سلول کلراید، در بالانس یونی ناموفق بوده و این در حالی است که یک ماهی با تعداد سلول بیشتر قادر به سازگاری خوب با آب شور (۳۵ گرم در لیتر) خواهد بود. افزایش سلولهای کلراید به همراه افزایش فعالیت $Na^+K^+ATPase$ می‌باشد و کاهش تعداد سلولهای کلراید در این وزن می تواند در دراز مدت منجر به عدم تطابق با محیط و کاهش توان مقابله با استرس شوری گشته و نمی‌تواند جوابگوی نیازهای یونی ماهی باشد. ماندن ماهی در آب شیرین تا این وزن (۲۵ گرم) را می‌توان یک دلیل مهم در کاهش توانایی ماهی دانست (۳، ۹ و ۴۴).

در نتیجه می‌توان بیان کرد، علت اینکه میزان مرگ و میر و تغییرات ساختاری در بافت آبشش در بچه ماهیان ۵ گرمی، بیش از سایر اوزان بود، این است که این بچه ماهیان هنوز به مرحله اسمولت نرسیده و توانایی مقابله با استرس شوری محیط جدید را ندارند، در نتیجه متحمل تغییرات شدید شده که از جمله آن پلاسمولیز سلولهای کلراید بوده که این کاهش اندازه به همراه کاهش محتوای پمپ $Na^+K^+ATPase$ نتوانسته جوابگوی نیاز یونی این وزن باشد. کاهش مرگ و میر در اوزان بالاتر را می توان به قابلیت و توانایی اسمزی در بچه ماهیان هم سن با وزن بیشتر نسبت داد، و بیان کرد که وزن اهمیت بیشتری نسبت به سن در تنظیم اسمزی دارد (۶ و ۳۹) و تغییراتی که در تعداد سلولهای کلراید در بخش های مختلف آبشش (لاملا و فیلامنت) در وزن ۱۵ گرم روی داد موید این مطلب است که این وزن در بالانس یونی موفق بوده است و توانایی تنظیم اسمزی آن بیش از سایر وزن هاست. البته در وزن ۲۵ گرم، مطالعه ایمونو هیستوشیمی بیانگر نوعی نقص در تنظیم اسمزی در این بچه ماهیان می باشد که می‌تواند در دراز مدت منجر به تلفات در این بچه ماهیان با این وزن گردد و علت آن این است که این بچه ماهیان حتی پس از رسیدن به مرحله اسمولت در آب شیرین بوده و در نتیجه توانایی و قابلیت تنظیم اسمزی در جهت آب شیرین تقویت شده است. پس به طور کلی می توان بیان کرد که در ماهیان هم سن با اوزان متفاوت، افزایش وزن تا حد خاصی می‌تواند منجر به افزایش توانایی اسمزی که نتیجه آن تغییرات تعداد و اندازه سلولهای کلراید بخشهای مختلف آبشش (لاملا و فیلامنت) می باشد و در اوزان کمتر یا بیشتر این الگو مشاهده نمی‌شود.

منابع

۱. خدابنده، ص.، و تقی زاده، ز.، ۱۳۸۵. مکان یابی پمپ Na^+,K^+-ATPase و سلولهای یونوسیت در آبشش گربه ماهی (*Silurus glanis*) به روش ایمونوهیستوشیمی، فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره۱، صفحات ۴۵-۵۲.

۲. رحیمی، خ.، کلباسی، م.، خدابنده، ص.، فروزنده، م.، و سلطان کریمی، س.، ۱۳۹۰. سازگاری ماهیان هیبرید (*Oncorhynchus mykiss* × *Salmo trutta caspius*) و تریپلوئید در انتقال مستقیم به شوری های متفاوت آب. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۴، شماره ۱، صفحات ۱۲۹-۱۴۲.

۳. ستاری، م.، ۱۳۸۱. ماهی شناسی (تشریح و فیزیولوژی). انتشارات نقش مهر، صفحات ۳۰۹-۳۳۲

۴. صیاد بورانی، م.، ابطحی، ب.، بهمنی، م.، کرایوشکینا، ل.، یوسفی، ا.، و دژندیان، س.، ۱۳۸۹. فعالیت غده تیروئید بچه ماهیان آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) نسبت به تغییرات شوری محیط، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۳، شماره ۶، صفحات ۶۷-۷۵

۵. کازانچف، ا. ان.، ۱۳۷۱. ماهیان دریای خزر و حوزه آبریزآن، مترجم: شریعتی ا، وزارت فرهنگ وارشاد اسلامی. ص ۶۴.

۶. مسافر، س.، خدابنده، ص.، و خوشنود، ز.، ۱۳۸۷. مکان‌یابی و بررسی اثر شوری بر نحوه پراکنش سلولهای غنی از میتوکندری در توبول‌های کلیوی بچه تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره۴، صفحات ۲۸۱-۲۸۷.

7. Avella, M., Berhaut, V., and Bornancin, M., 1993, Salinity tolerance of two tropical fishes, *Orcheromis aureus* and *O.niloticus*, Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. J Fish Biol. 42, PP: 243-254.

8. Berge, A. I., Berg, A., Fyhn, H. J., Barnung, T., Hansen, T., and Stefansson, S. O. 1995, Development of salinity tolerance in underyearling smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared under different photoperiods. Can J Fish Aquat Sci. 52, PP: 243–251.

9. Boeuf, G., Laserre, P., and Harache, Y., 1978, Osmotic adaptation of *Oncorhynchus kisutch* Walbaum, II: plasma osmotic and ionic variations and gill Na^+K^+-ATPase of yerling Coho salmon transferred to sea water. Aquaculture. 15, 35–52.

10. Cataldi, E., Ciccotti, E., Di Marco, P., Di Santo, O., Bronzi, P., and Catudella, S., 1995, Acclimation trails of juvenile Italian sturgeon to different salinities. Morpho-physiological descriptors. J Fish. Biol. 47, PP: 609-618.

11. Cioni, C., De Merich, D., Cataldi, E., and Cataudella, S., 1991. Fine structure of chloride cells in freshwater and seawater-adapted *Oreochromis niloticus* and *Oreochromis mossambicus*. J Fish Biol. 39, PP: 197-209.

12. Conte, F. P., Wagner, H. H., Fessler, S., and Gnose, C., 1996, Development of osmotic and ionic regulation in juvenile coho salmon. Comp Biochem Physiol. 18, PP: 1-15.

13. Donham, T. R., Morin, D., and Tjeerdema, R. S., 2006, Salinity effects on activity and expression of glutathione S-transferases in white sturgeon and Chinook salmon. Ecotoxic Envir Safe. 63, PP: 293-298.

14. Evans, D. H., Piermarini, P. M., and Choe, K. P., 2005, The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol Rev. 85, PP: 97-177.

15. Foskett, J. K., Logsdon, C. D., Turner, T., Machen, T. E. and Bern, H. A., 1981, Differentiation of the choloride extrusion mechanism during seawater adaptation of a teleost fish, the cichlid *Sarotherodon mossambicus*. J. Exp Biol. 93, PP: 209-224.

16. Franklin, G. E., 1990, Surface ultrastructural changes in the gills of sockeye salmon (Teleostei: *Oncorhynchus nerka*) during seawater transfer: Comparison of successful and unsuccessful seawater adaptation. J Morph. 206, PP: 13-23.

17. Guner, Y., Ozdem, O., Cagirang, H., Altunk, M., and Kizak, V., 2005, Effects of salinity on the osmoregulatory function of the gills in Nile tilapia. Turk J Vet Ani Sci. 20, PP: 1259-1260.

18. Hickman, C. P., 1959, The osmoregulatory role of the thyroid gland in the starvy flounder, *Olatichthyes stellatus*. Can J Zool, 37, PP: 997-1060.

19. Hoar, W. S., 1988, The physiology of smolting salmonids: in fish physiology, Edt: Hoar & Randall: Vol.xl, partB, The physiology of developing fish. Academjic press. Inc.

20. Iwata, M., Hasegawa, S., and Hirano, T., 1982. Decreased seawater adaptability of Chum salmon (*O. keta*) fry following prolonged rearing in freshwater. Can J Fish Aqu Sci. 39, 509-514.

21. Khodabandeh, S., Khoshnood, Z., and Mosafer, S., 2009, Immunolocalization of Na^+,K^+-ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. Aqu Res. 40, PP: 329-336.

22. Khodabandeh, S., Shahriari, M., and Abtahi, B., 2009, Changes in chloride cells abundance Na^+,K^+-ATPase immunolocalization and activity in gills of Golden grey Mullet, *Liza aurata*, fry during adaptation to different salinities. Yakhteh Med J. 11, 49-54.

23. Laiz-Carrion, R., Guerreiro, P. M., Fuentes, J., Canario, A. V. M., Del Rio, M. P. M., and Mancera, J. M., 2005, Branchial osmoregulatory response to salinity in the Gilthead sea bream, *Sparus auratus.* J Exp zool. 303, PP: 563-576.

24. Laurent, P., Dunel, E. S., Chevalier, C., and Lignon, J., 1994, Gill epithelial cell kinetics in a freshwater teleost, *Oncorhynchus mykiss*, during adaptation to ion-poor water and hormonal treatments. Fish Physiol Biochem. 13, PP: 353-370.

25. Lee, T. H, Hwang, P. P, Shieh, Y. E., and Lin, C. H., 2000, The relationship between 'deep-hole' mitochondria-rich cells and salinity adaptation in the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. Fish Physiol Biochem. 23, PP: 133–140.

26. Lima, R. N., Kulz, D. 2004, Laster Scanning cytometry and tissue microarray analysis of salinity effects on killifish chloride cells. J Exp Biol. 207, PP: 1729-1739.

27. Lin, Y. M., Chen, C. N., and Lee, T. H., 2003, The expression of gill Na^+,K^+-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and freshwater. Comp Biochem Physiol. 135, PP: 489-497.

28. Madsen, S. S., and Naamansenm, E. T., 1989, Plasma ionic regulation and gill Na^+,K^+-ATPase changes during rapid transfer to sea water of yearling rainbow trout, *Salmo gairdneri*: time course and seasonal variation. J Fish Biol. 34, PP: 829–840.

29. Maetz, J., 1974, Aspects of adaptation to hypo-osmotic and hyper-osmotic environments. In: Malins DC, Sargent JR, editors. Biochemical and biophysical perspectives in marine biology. New York: Academic Press. PP: 1–167.

30. Marshall, W. S., and Bryson, S. E., 1998, Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: an inclusive model of a multifunctional cell. Comp Biochem Physiol. 119, PP: 97–106.

31. Marshall, W. S., 2002, Na^+, Cl^-, Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. J Exp Zool. 293, PP: 264–283.

32. McCormick, S. D., and Saunders, R. L., 1987, Preparatory physiological adaptation for marine life of salmonids. Osmoregulation, growth, and metabolism. Am Fish Soci Symp. 1, PP: 211-229.

33. McCormick, S. D., 1995, Hormonal control of gill Na^+,K^+-ATPase and chloride cell function. In: Wood CM, Shuttlewoth TJ, editors. Fish physiology. Vol. 14. San Diego, CA: Academic Press, PP: 285–315.

34. Nordile, F. G., Szelistowski, W. A., and Nordile, W. C., 1982, Ontogenesis of osmotic regulation in salmonid fishes. Nature. 161, PP: 1218-1219.

35. Parry, G., 1960, The development of salinity tolerance in the salmon (*S.salar*) and some related species. J Exp Biol. 37, PP: 411-427.

36. Perry, S. F., 1997, The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. An Rev Physiol. 59, PP: 325–347.

37. Pisam, M., and Rambourg, A., 1991, Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. Int Rev Cell Molecular Biol. 130, PP: 191-232.

38. Plaut, I., 1998, Comparsion of salinity tolerance and osmoregulation in two closely related species of blennies from different habitats. Fish physiol Biochem. 19, PP: 181-188

39. Salman, N. A., and Eday, F. B., 1987, Response of choloride cell number and gill Na^+,K^+-ATPase activity of freshwater trout (*Salmo gairneri*) to salt feeding. Aquaculture. 61, PP: 41-48.

40. Sassai, S., Kaneko, T., Hasegawa, S., Tsukamoto, K., 1998, Morphological alteration in two types of gill choloride cells in Japanese eel (*Anguilla japonica*) during catadromous migration. Can J Zool. 76, PP: 1480-1487.

41. Shikano, T., and Fujio, Y., 1998, Immunolocalization of Na^+,K^+-ATPase in the branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and fresh water acclimation. Exp Biol. 201, PP: 3031-3040.

42. Skamoto, T., Uchida, K., and Yolota, S., 2001, Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cellduring adaptation of

teleost fishes to diffrent salinities. Zool Sci. 18, PP: 1163-1174.

43. Tipsmark, C. K., Madsen, S. S., Seidelin, M., Christensen, A. S., Cutler, C. P., and Cramb, G., 2002, Dynamics of $Na^+K^+2Cl^-$ cotransporter and Na^+,K^+-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). J Exp Zool. 293, PP: 106–118.

44. Tse, W. K. F., and Wong, C. K. C., 2006, Characterization of ion channel and transporter mRNA expressions in isolated gill choloride and pavement cells of seawater acclimating eels. Biochem Biophysic Res Com . 346, PP: 1181-1190.

45. Uchida, K., Kaneko, K., Yamauchi, K., and Hirano, T., 1996, Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filament & lamella and changes in Na^+,K^{+-}ATPase activity during seawater adaption in chum salmon fry J Exp Zool. 276, PP: 193-200.

46. Van der Heijden, A. J. H., Verbost, P. M., Eygensteyn, J., Wendelaar Bonga, S. E., and Flik, G., 1997, Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to freshwater or sea water: Quantification by confocal laser scanning microscopy. J Exp Biol. 200, PP: 55-64.

47. Varsamos, S., 2002, Tolerance rage and osmoregulation in hypersaline conditions in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). J Mar Biol. 82, PP: 1047-1048.

48. Wagner, H. H., 1974, Seawater adaption independent of photoperiod in steelhead trout. Can J Zool. 52, PP: 553-564.

49. Zadunaisky, J. S., 1984, The chloride cells: the active transport of chloride and the paracellular pathway. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. Fish physiology. Vol. XB. San Diego, CA: Academic Press. PP: 275–343.

50. Zydlewki, J., and McCormick, S. D., 1997, The loss of hyperosmoregulatory ability in migrating juvenile American shad, *Alosa sapidissima*. Can J Fish Aqua Sci. 54:23, 77-2387.

Relationship between weight and osmoregulation ability in *Salmo trutta caspius* fries, after introduced to brackish water (13ppt)

Rajabi H. and Khodabandeh S.

Marine Biology Dept., Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of Iran

Abstract

Fish age and weight, are important factors in osmoltification and adaptation to sea water. In this study, mortality rate, gill morphological and chloride cell changes were examined in different weights (5, 15, 25 g) but same age in *Salmo trutta caspius* after introduced to Caspian Sea water for 10 days. Gill histology was observed through light microscopy using Hematoxylin-Eosin staining and immunolocalization was performed by using mouse monoclonal antibody ($IgG\alpha_5$) raised against Na^+K^+ATPase α-subunit. Immuno micrographs were analyzed by using Image Tools Software. Mortality rate was 25%, 8% and 0% in 5, 15 and 25g weights, respectively after were transferred to 13ppt salinity and some structural damages were observed in gill structure. Chloride cell number in 5g weight, were significantly increased but sectional area were decreased, and in 15g weight, were showed no significant difference in chloride cell number, while in 25g weight were decreased. With regard to the present results, In the same age fishes, fish with 5g weight is not able to have osmoregulation but 15g weight it has better compatibility with the salinity and after acclimated to freshwater until 25g weight, considering the pass of osmultification level. It is probable that the fish became compatible with the fresh water environment and did not lose its osmoregulation ability in saline water in the long term.

Key words: *Salmo trutta caspius*, weight, mortality rate, chloride cells