

## بررسی فراوانی و پراکنش سلول‌های کلراید آبشش بچه‌ماهیان سفید در مواجهه با شوری آب دریای خزر

محمد صیاد بورانی\*<sup>۱</sup>، محدثه احمد نژاد<sup>۱</sup>، حسن مقصودیه کهن<sup>۱</sup>، سهراب دژندیان<sup>۱</sup>، منصور شریفیان<sup>۲</sup>

۱- پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی کشور، بندر انزلی، ایران، صندوق پستی: ۶۶

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۹-۱۴۹۶۵

تاریخ دریافت: ۱۸ آذر ۱۳۹۲

تاریخ پذیرش: ۲۷ فروردین ۱۳۹۳

### چکیده

این تحقیق به منظور بررسی توسعه سلول‌های کلراید در بافت آبشش گروه‌های مختلف وزنی بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii*) در ایستگاه تحقیقاتی تغذیه و غذای زنده آبزیان واقع در غازیان بندرانزلی انجام شد. بچه‌ماهیان با میانگین وزنی ۰/۵، ۱ و ۲/۵ گرمی به صورت تصادفی انتخاب شدند و در ۳ گروه آب دریای خزر با شوری ۱۱ در هزار، آب ۷ در هزار (شرایط مصبی) و آب شیرین (با سه تکرار در هر گروه) در مدت ۱۰ روز، قرار گرفتند. جهت بررسی ساختار میکروسکوپی بافت آبشش در تیمارهای مختلف، از نمونه‌های بافتی به‌وسیله روش بافت‌شناسی کلاسیک و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین لام تهیه شد. بررسی فراوانی و محل آنزیم  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase و تعیین موقعیت سلول‌های کلراید با روش ایمونوهیستوشیمی به انجام رسید. در تصاویر بافت‌شناسی، سلول‌های کلراید در ناحیه پایه تیغه‌های ثانویه، روی تیغه‌ها و بین آن‌ها به‌وضوح دیده شدند. نتایج شمارش سلول‌های کلراید در آبشش بچه‌ماهیان سفید نشان داد که در هر میلی‌متر مربع از سطح بافت آبششی ماهیان ۰/۵، ۱ و ۲/۵ گرمی به ترتیب ۹۰۰۰، ۱۰۰۰۰-۹۰۰۰ و ۱۲۰۶۰-۱۰۰۷۰ سلول کلراید وجود دارد. در نتیجه مطابق با تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد بچه‌ماهیان ۰/۵ گرمی دارای قابلیت سازگاری با آب نواحی مصبی و آب دریای خزر را نداشته و کاملاً سازگاری به آب شیرین دارد. بر اساس مطالعات، به نظر می‌رسد بچه‌ماهیان ۱ تا ۳ گرمی قابلیت تحمل و سازگاری با نواحی مصبی و نواحی از دریا با شوری ۷ تا ۸ در هزار دارند که افزایش وزن تأثیر به‌مراتب بهتری را خواهد داشت یعنی ترجیحاً وزن ۲/۵ تا ۳ گرم جهت این کار مناسب‌تر می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** ماهی سفید، *Rutilus frisii*، تنظیم‌اسمزی، شوری، دریای خزر.

## مقدمه

ماهی سفید با نام علمی *Rutilus frisii*، یک ماهی استخوانی نیمه مهاجر رود کوچ بوده که به زندگی در آب لب شور دریای خزر و تالاب‌های اطراف آن سازگار شده است. سالیانه به‌طور متوسط بیش از ۱۲ هزار تن از انواع ماهیان استخوانی از سواحل ایرانی دریای خزر استحصال می‌شود که ماهی سفید بیش از ۵۰ درصد صید را به خود اختصاص می‌دهد و از این طریق در اقتصاد مردم شهرهای ساحلی استان گیلان و مازندران و گلستان نقش بسزایی را ایفا می‌کند. ادامه روند صید بی‌رویه سبب گردید که کل استحصال این ماهی در فصول بهره‌برداری سال‌های ۵۹-۱۳۵۸ و ۶۰-۱۳۵۹ به کمتر از ۱۰۰ تن در سال برسد (غنی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۰). ولی از دهه ۵۰ با اجرای عملیات تکثیر مصنوعی، با تولید و رهاسازی بچه‌ماهیان توسط سازمان شیلات ایران صید این ماهی روند بهتری را طی نمود. به‌طوری‌که در سال ۱۳۹۰، میزان صید ماهی سفید حدود ۱۱ هزار تن و میزان رهاسازی حدود ۲۷۰ میلیون عدد بوده است (صیاد بورانی و همکاران، ۱۳۹۲). بر اساس تحقیقات صورت پذیرفته، ضریب بازگشت ماهی سفید (مربوط به نسل ۱۳۷۰) ۸/۴ درصد محاسبه شده که نسبت به نسل سال‌های ۱۳۶۵ و ۱۳۶۶ (حدوداً ۱۶ درصد) کاهش نشان می‌دهد (صیاد بورانی و همکاران، ۱۳۷۹). البته این میزان در ماهیان سفید نسل ۱۳۷۳ به ۷/۳ درصد رسیده است (غنی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۰)، و این در حالی است که دامنه وزنی بیشتر بچه ماهیان سفید رها سازی شده بین ۰/۶ تا ۱ گرم بود. لذا سعی بر آن است که درصد ضریب بقاء افزایش یابد، یکی از راه‌های افزایش ضریب بقاء بچه‌ماهیان مطالعات شاخص‌های فیزیولوژیک و عوامل محیطی

می‌باشد که در بین شاخص‌های فیزیولوژیکی، تنظیم‌اسمزی از نقش و اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد (کرایوشکینا، ۱۳۷۸). تنظیم‌اسمزی، مکانیسم حفظ هموستازی مایعات درونی بدن و مسئول حفظ و کنترل اسمولاریته پلاسما می‌باشد (Jurd, 2003). اندام‌های دخیل شامل آبشش، پوست، کلیه و دستگاه گوارش می‌باشد (Eldon, 2003). از این میان آبشش مهم‌ترین جایگاه تبادل یونی و تنظیم‌اسمزی بین بدن و محیط بشمار می‌رود (Jurd, 2003). در اپی‌تلیوم آبششی سلول‌های کلراید مهم‌ترین جایگاه تبادلات یونی هستند (Wood and Marshall, 1994).

ماهیان مهاجر رود رو پس از مهاجرت به آب شیرین هایپراسمیتیک و در آب دریا هایپواسمیتیک هستند. شروع رشد این ماهیان ابتدا در آب شیرین و سیستم اسمزی آنان در این محیط شکل می‌گیرد (کرایوشکینا، ۱۳۷۸، صیادبورانی و همکاران، ۱۳۸۶). Thomson و Sargent (۱۹۷۷)، با انتقال مارماهیان زرد و نقره‌ای به محیط شورتر افزایشی را در تعداد و حجم سلول‌های کلراید آبششی مشاهده کردند که این افزایش منعکس کننده سازگاری ماهی با محیط شورتر است.

Cioni و همکاران (۱۹۹۱) دریافتند که سطح سلول‌های کلراید ماهیان سازگار شده به آب شور بزرگ‌تر از سطح سلول‌های کلراید ماهیان سازگار شده به آب شیرین است.

Fontaine و همکاران (۱۹۹۵)، نقره‌ای شدن بدن و سلول‌های غنی از میتوکندری (سلول‌های کلراید) مارماهیان اروپایی را مطالعه کرده و دریافت که سلول‌های کلراید مارماهی نقره‌ای زیاده‌تر، بزرگ‌تر و تراکم میتوکندری بیشتر از سلول‌های کلراید مارماهی زرد بوده و بر این اساس نتیجه گرفتند که مرحله نقره‌ای

ایستگاه تحقیقاتی تغذیه و غذای زنده آبزیان واقع در غازیان بندرانزلی انتقال داده شدند. آب مورد نیاز برای این تحقیق در ۳ سطح شوری: آب شیرین (شاهد)، شوری ۷ در هزار و آب دریای خزر با شوری ۱۱ در هزار برای مدت ۱۰ روزه انجام گردید.

برای تطابق بچه ماهیان حدود یک ماه این ماهی‌ها در حوضچه‌های گرد (ونیرو) با چرخش آب و هوادهی نگهداری شدند. در مرحله بعد جهت انجام عملیات تیمارداری به وان‌های ۱۰۰ لیتری انتقال یافتند. جهت به حداقل رساندن پارامترهای پلاسما، ۲۴ ساعت قبل از انتقال به وان‌های ۱۰۰ لیتری، بچه‌ماهیان تحت شرایط گرسنگی نگه داشته شدند (Madsen and Naamansen, 1989).

در ضمن این وان‌های ۱۰۰ لیتری به صورت طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی که با مطالعات McCormik و Naiman (۱۹۸۴) همخوانی دارد چیده شده بودند. داخل هر یک از وان‌های ۱۰۰ لیتری به اندازه ۸۰ لیتر از آب مورد نیاز (آب شیرین، ۷ در هزار و ۱۱ در هزار) پر گردید.

۲۰ درصد آب موجود در هر یک از وان‌ها هر روزه تعویض می‌شدند تا از رسوبات مواد غذایی و فضولات ماهی‌ها جلوگیری شود (Avella et al., 1990). تراکم بچه ماهیان در داخل هر وان ۰/۵ گرم در لیتر در نظر گرفته شد. غذادهی نیز روزی یک‌بار با غذای کنسانتره SFK (غذای مربوط به ماهی سفید) به میزان ۲ درصد وزن بدن به بچه‌ماهیان داده شد. شوری آب حوضچه‌ها هر ۲۴ ساعت یکبار به وسیله دستگاه شوری‌سنج کنترل می‌شد (ASTM, 1989).

همچنین زیست‌سنجی بچه ماهیان یعنی طول با دقت ۱ میلی‌متر و وزن با دقت ۰/۱ گرم انجام گرفت. جهت مطالعات بافتی در فاصله‌های زمانی مختلف، سه عدد ماهی از شوری‌های مختلف برداشته و پس از

شدن در مارماهیان مشابه مرحله تبدیل بچه‌ماهیان پار (رودخانه‌زی) به بچه‌ماهیان اسمولت (رهسپار شونده به دریا) در آزاد ماهیان است.

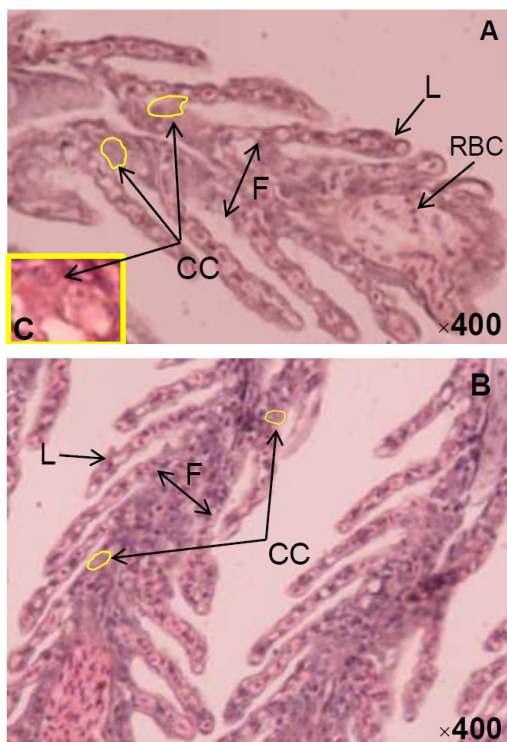
در این راستا اثر شوری آب با تاکید بر شاخص‌های رشد در بچه‌ماهی سفید یک گرمی مورد بررسی قرار گرفت (امیری و همکاران، ۱۳۸۷). همچنین تأثیر وزن بر قابلیت تنظیم اسمزی در بچه‌ماهیان آزاد دریای خزر توسط صیاد بورانی و همکاران (۱۳۸۴) مطالعه شده است. لذا اطلاع از چگونگی انجام عمل مذکور در ماهی و زمان تشکیل و تکمیل اندام‌های تنظیم‌کننده اسمزی می‌تواند تعیین‌کننده باشد. در این راستا و با توجه به تولید بچه‌ماهیان در مراکز تکثیر مصنوعی کشور به نظر می‌رسد آگاهی از چگونگی تنظیم اسمزی و بررسی فراوانی و پراکنش سلول‌های کلراید آبششی بچه‌ماهیان این گونه که یکی از اندام‌های اصلی دخیل در تبدلات یونی بوده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

مکان‌های مورد پژوهش شامل ایستگاه تحقیقاتی تغذیه و غذای زنده آبزیان واقع در غازیان بندر انزلی، آزمایشگاه فیزیولوژی پژوهشکده آب‌های داخلی کشور (بندرانزلی)، آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی شهرستان نور و آزمایشگاه فیزیولوژی موسسه تحقیقات تاسماهیان کشور بوده و این تحقیق در سال ۱۳۹۰ لغایت ۱۳۹۱ انجام گرفت. نمونه‌های مورد بررسی از جمعیت بچه‌ماهی سفید دریای خزر با نام علمی *Rutilus frisii* حاصل تولید مرکز بازسازی ذخایر ماهیان گرمابی شهید انصاری رشت بود که در اوزان ۰/۵، ۱ و ۲/۵ گرمی به صورت تصادفی از نمونه‌های این مجتمع برداشت شد و به

است (شکل ۱). همان طوری که در شکل های ۲ و ۳ مشاهده می شود سلول های کلراید آبشش در پایه تیغه های ثانویه و گاهی اوقات روی تیغه و در نواحی بین تیغه ای قرار گرفته اند و این سلول ها با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین شفاف تر و با روش ایمونو دارای خاصیت فلورسانسی و سبز درخشان می باشند. تعداد زیادی گلبول های قرمز خون در داخل بافت مشاهده می شود.

در روش ایمونو هیستوشیمی، آنتی بادی IgG<sub>s</sub> روی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  قرار گرفته و با حضور آنتی بادی نوع دوم (FITC)، این آنزیم در نور فلورسنت به صورت زرد مایل به سبز نشان می دهد.



شکل ۱: A: تصویر بافت شناسی با رنگ آمیزی ائوزین - هماتوکسیلین از بافت آبشش بچه ماهی سفید (سه گرم) سازگار شده با آب شیرین - سلول های کلراید روی فیلامنت در ناحیه بین لاملا مشخص اند.

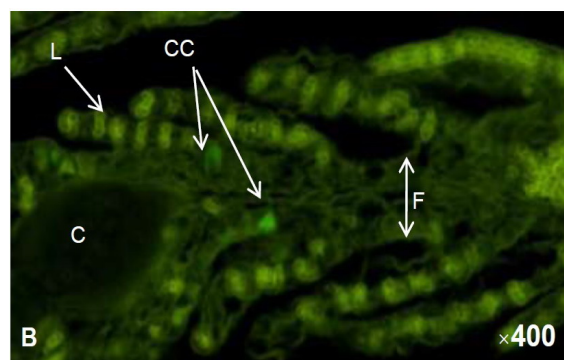
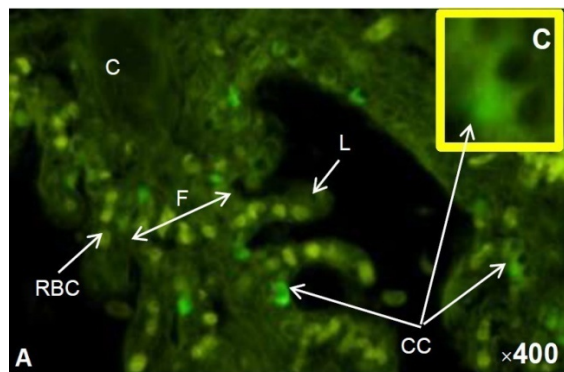
بیومتری، باله های آن را قطع کرده و در داخل فیکساتور بوئن قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت نمونه ها از بوئن خارج و در داخل الکل ۷۰ درجه قرار داده شد (پوستی و صدیق مرودستی، ۱۳۷۸). سپس مقطعی از کمان دوم آبششی جهت تهیه لام از ماهی مورد نظر جدا گردید. برای تشخیص بهتر سلول های کلراید آبشش از روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین استفاده گردید (کرایوشکینا، ۱۳۷۸). تعداد و مساحت یاخته های کلراید توسط برنامه Image tool (version 2) اندازه گیری شد (Pelis and McCormick, 2001).

برای بررسی فراوانی و پراکنش سلول های کلراید از روش ایمونو هیستوشیمی استفاده گردید. ایمونوکالیزه آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  با استفاده از آنتی بادی IgG<sub>s</sub> و میکروسکوپ نوری فلورسانس انجام گرفت (رجبی و همکاران، ۱۳۹۰).

داده های زیست سنجی با کمک نرم افزار SPSS18 و روش های عمومی آمار توصیفی مورد پردازش و میانگین گیری قرار گرفت. با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه با سطح اطمینان ۹۵٪ مورد بررسی قرار گرفت و در جداسازی گروه های همگن بر حسب کلاسه های وزنی و شوری و مدت زمان قرار گیری از آزمون توکی استفاده شد.

## نتایج

بر اساس مطالعات بافت شناسی، آبشش بچه ماهیان سفید از ۴ جفت کمان آبششی در هر طرف سر تشکیل شده است. بافت آبشش شامل رشته های آبششی (Filament)، سلول های سنگفرشی، سلول های پیلار، سلول های کلراید، تیغه آبششی (Lamella)، گلبول قرمز خون (Red Blood Cell) و غضروف (Cartilage)



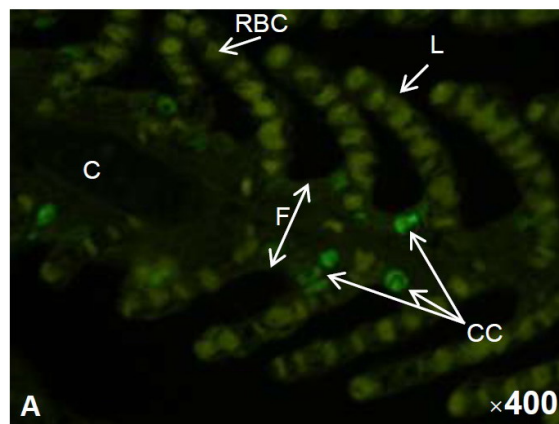
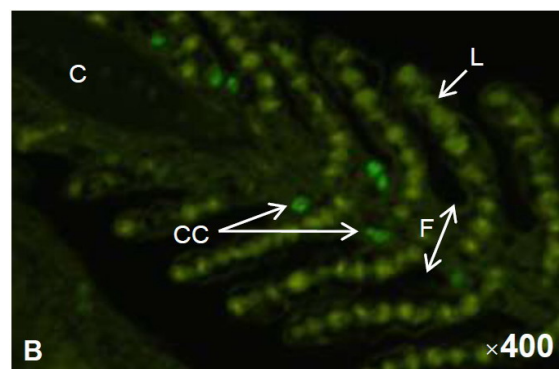
شکل ۳: A: تصویر مکان‌یابی ایمنیایی آنزیم  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase بافت آبشش بچه‌ماهی سفید ۱ گرمی سازگار شده با آب شیرین، با روش ایمونوهیستوشیمی  
شکل B: تصویر مکان‌یابی ایمنیایی آنزیم  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase بافت آبشش بچه‌ماهی سفید ۱ گرمی ۲۴۰ ساعت پس از ورود به آب دریای خزر، با روش ایمونوهیستوشیمی  
شکل C: سلول کلراید فیلامنتی واجد ایمونوفلورسانس علامت‌های اختصاری:

C: غضروف (Cartilage)، CC: سلول کلراید (Chloride cell)، F: رشته آبششی (Filament)، L: تیغه آبششی (Lamella)، RBC: گلبول قرمز خون (Red Blood Cell)

در ماهیان ۰/۵ و ۱ گرمی، بین دو تیمار آب شیرین و آب دریای خزر از نظر محیط سلول کلراید آبشش بچه‌ماهیان سفید اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ). محیط سلول‌های کلراید آبشش ماهیان ۲/۵ گرمی بین دو تیمار آب شیرین و آب دریای خزر دارای اختلاف معنی‌دار آماری است ( $P < 0.05$ ) که حاکی از رشد و تکامل این سلول‌ها در

B: تصویر بافت‌شناسی با رنگ آمیزی اتوزین - هماتوکسیلین از بافت آبشش بچه‌ماهی سفید (نیم گرم) ۲۴۰ ساعت پس از ورود به آب دریای خزر  
C: تصویر بزرگ شده از سلول کلراید فیلامنتی علامت‌های اختصاری:

C: غضروف (Cartilage)، CC: سلول کلراید (Chloride cell)، F: رشته آبششی (Filament)، L: تیغه آبششی (Lamella)، RBC: گلبول قرمز خون (Red Blood Cell)



شکل ۲: A: تصویر مکان‌یابی ایمنیایی آنزیم  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase بافت آبشش بچه‌ماهی سفید ۰/۵ گرمی سازگار شده با آب شیرین، با روش ایمونوهیستوشیمی  
B: تصویر مکان‌یابی ایمنیایی آنزیم  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase بافت آبشش بچه‌ماهی سفید ۰/۵ گرمی ۲۴۰ ساعت پس از ورود به آب دریای خزر، با روش ایمونوهیستوشیمی  
علامت‌های اختصاری:

C: غضروف (Cartilage)، CC: سلول کلراید (Chloride cell)، F: رشته آبششی (Filament)، L: تیغه آبششی (Lamella)، RBC: گلبول قرمز خون (Red Blood Cell)

جدول ۲: تعداد سلول‌های کلراید (میکرومترمربع) در بچه‌ماهیان سفید در تیمارهای ترکیبی

تعداد سلول‌های کلراید	تیمار
$9/13 \pm 3/49^a$	آب شیرین - ۰/۵ گرم
$9/33 \pm 3/97^a$	آب شیرین - ۱ گرم
$10/07 \pm 4/59^a$	آب شیرین - ۲/۵ گرم
$9/04 \pm 4/42^a$	آب دریای خزر - ۰/۵ گرم
$10/59 \pm 4/6^a$	آب دریای خزر - ۱ گرم
$12/06 \pm 5/05^b$	آب دریای خزر - ۲/۵ گرم

ارقام دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی دار می‌باشند

( $P > 0/05$ )

با توجه به آزمون آنالیز واریانس دو عامله مشخص گردید که شوری آب و وزن ماهیان هر دو اثر متقابلی بر روی تعداد سلول‌های کلراید دارند ( $P < 0/05$ ). بر اساس آزمون توکی اختلاف بین گروه‌های فوق‌الذکر مشخص گردیدند (جدول ۲).

### بحث

یکی از راه‌های افزایش ضریب بقای بچه‌ماهیان بررسی وضعیت فیزیولوژیک می‌باشد. در میان عوامل فیزیولوژیک، تنظیم اسمزی از نقش و اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعه تنظیم اسمزی می‌تواند زمان مناسب مهاجرت ماهی از رودخانه به دریا و در حقیقت اندازه مناسب رهاسازی یا پرورش در محیط‌های دریایی را مشخص نماید (Laird and Needham, 1988) از این طریق بر میزان بازگشت ماهیان مولد بیافزاید.

در این تحقیق پاسخ‌های فیزیولوژیک بچه‌ماهیان سفید به افزایش شوری محیط در ۳ گروه وزنی ۰/۵، ۱ و ۲/۵ گرمی که هر گروه به‌واسطه همبستگی مستقیم وزن و طول معرف اندازه مشخصی نیز می‌باشد، مطالعه

گروه ۲/۵ گرمی برای مواجهه با شوری می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱: مقادیر مساحت و محیط سلول‌های کلراید آبشش بچه‌ماهیان سفید در تیمارهای ترکیبی پس از ۲۴۰ ساعت قرارگیری

تیمار	مساحت سلول کلراید (میکرومترمربع)	محیط سلول کلراید (میکرومترمکعب)
آب شیرین - ۰/۵ گرم	$35/6 \pm 10/39^a$	$23/08 \pm 3/42^a$
آب شیرین - ۱ گرم	$41/53 \pm 10/12^b$	$23/97 \pm 2/88^a$
آب شیرین - ۲/۵ گرم	$44/95 \pm 11/3^b$	$29/16 \pm 4/42^b$
آب دریای خزر - ۰/۵ گرم	$36/73 \pm 10/93^a$	$23/14 \pm 3/63^a$
آب دریای خزر - ۱ گرم	$41/54 \pm 10/37^b$	$24/11 \pm 3/11^a$
آب دریای خزر - ۲/۵ گرم	$47/95 \pm 12/92^c$	$29/9 \pm 5/13^b$

ارقام دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی دار می‌باشند

( $P > 0/05$ )

با توجه به آزمون آنالیز واریانس دو عامله مشخص گردید که شوری آب و وزن ماهیان هر دو اثر متقابلی بر روی مساحت سلول کلراید دارند ( $P < 0/05$ ). و بر اساس آزمون توکی اختلاف بین گروه‌های فوق‌الذکر مشخص گردید.

با توجه به آزمون آنالیز واریانس دو عامله مشخص گردید که شوری آب و وزن ماهیان هر دو اثر متقابلی بر روی محیط سلول کلراید ندارند ( $P > 0/05$ ).

نتایج شمارش سلول‌های کلراید در آبشش بچه‌ماهیان سفید هم سن و با اوزان متفاوت، نشان داد که تعداد آن‌ها در میکرو متر مربع از سطح مقطع بافت آبششی، با انتقال ماهی ۰/۵ گرم از آب شیرین به آب دریای خزر کاهش یافته، در بچه‌ماهیان ۱ گرمی تفاوت مشاهده نشد ولی در ماهیان ۲/۵ گرمی افزایش معنی دار بوده است.

شد. پاسخ‌های بررسی شده شامل تغییرات بافتی آبشش، فراوانی و مکان یابی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  بود که هر یک نشان دهنده عملکرد یک یا چند دستگاه بدن در مقابله با شوری است.

سلول‌های کلراید آبشش ماهیان دارای نقش اساسی در تنظیم یونی آن‌ها هستند. این سلول در ماهیان آب شیرین بزرگ‌تر ولی تعدادش کمتر و در محیط آب دریا کوچک‌تر ولی با تعداد بسیار بیشتر دیده می‌شوند. پس از انتقال به محیط آب دریا، از حالت نوع آب‌شیرین به سلول‌های کلراید نوع آب‌دریا تغییر شکل می‌دهند، بطوری که از وظیفه جذب یون به وظیفه ترشح یون تغییر حالت می‌دهند (Hiroi et al, 1999).

در تصاویر بافت‌شناسی، سلول‌های کلراید در ناحیه پایه تیغه‌های ثانویه، روی تیغه‌ها و بین آن‌ها بوضوح دیده شدند. نتایج سایر محققین روی گونه‌های مختلف ماهیان و در شوری‌های متفاوت نیز بیانگر حضور سلول‌های کلراید هم در بخش تیغه‌ای و هم در بخش رشته‌های آبششی بوده است (خوشنود و همکاران، ۱۳۸۷؛ خدابنده و تقی‌زاده، ۱۳۸۵؛ رجبی و همکاران، ۱۳۹۰).

سلول‌های کلراید با استفاده از آنتی‌بادی  $\text{IgG}_{\alpha 5}$  مکان‌یابی شدند. بخش قاعده‌ای-جانبی این سلول‌ها، دارای ایمونوفلورسانس قوی است که نشان‌دهنده حضور آنزیم  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  در این بخش می‌باشد (Shikano and Fujio, 1998; Khodabandeh et al., 2009a).

در تحقیق حاضر، سلول‌های کلراید با روش ایمونو هیستوشیمی به صورت لامپ‌های روشنی نمایان شده و شناسایی، شمارش و اندازه دقیق آن‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد.

همان‌طور که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود سلول‌های کلراید، بیشتر در ناحیه پایه تیغه‌ها و ناحیه رشته‌ای قرار گرفته‌اند. براساس یافته‌های سایر محققین، سلول‌هایی که در ناحیه تیغه قرار گرفته‌اند نقش تنظیم اسمزی را بیشتر در آب شیرین برعهده داشته و جایگاه جذب یونی هستند و سلول‌هایی که در ناحیه رشته قرار دارند بیشتر در تنظیم اسمزی در آب شور نقش داشته و جایگاه ترشح یون می‌باشند و این امر وابسته به فعالیت آنزیم  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$  به همراه حضور کوترانسپورتر NKCC و کانال دفع یونی CFTR می‌باشد (رجبی و همکاران، ۱۳۹۰؛ Shikano and Fujio, 1998).

بررسی تعداد و تغییرات سلول‌های کلراید در بین متغیرهای ثانویه در این تحقیق، کاهش تعداد سلول‌ها پس از ۱۰ روز در تیمار آب دریای خزر برای ماهیان ۰/۵ گرمی، افزایش آن در ماهیان ۱ و ۲/۵ گرمی در آب ۷ در هزار و دریای خزر را نشان داد. نتایج شمارش سلول‌های کلراید در آبشش بچه‌ماهیان سفید نشان داد که در هر میلی‌متر مربع از سطح بافت آبششی ماهیان ۰/۵، ۱ و ۲/۵ گرمی بترتیب ۹۰۰۰، ۱۰۰۰۰-۹۰۰۰ و ۱۲۰۶۰-۱۰۰۷۰ سلول کلراید وجود دارد. طبق یافته‌های Maetz (۱۹۷۴) در برخی ماهیان استخوانی تعداد سلول‌های کلراید نسبتاً سریع افزایش یافته و نتیجه آن را طی ۳ روز اول سازگاری به آب دریا می‌توان دید.

بر اساس مطالعات انجام شده در مار ماهی ۵۰۰ گرمی (*Anguila japonica*) ۱۰۰۶ سلول کلراید (Wong and Chan, 2001)، در آبشش‌باس دریایی ۲۴۰ گرمی (*Dicentrarchus labrax*) ۶۲۵۰ سلول کلراید (Varsamos, 2002)، در آبشش تیلایپای

شدن برای مهاجرت به دریا به همراه افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز آبششی باشد. عطائی مهر و همکاران (۱۳۸۹) بیان نمودند که امکان اظهار نظر صریح و قاطع در خصوص وزن و شوری مناسب رهاسازی بچه ماهی سفید از منظر نحوه تنظیم فشار اسمزی وجود ندارد و مطالعات جامع تری نیاز می‌باشد.

در نتیجه مطابق با تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد بچه ماهیان ۰/۵ گرمی دارای قابلیت سازگاری با آب نواحی مصبی و آب‌دریای خزر را نداشته و کاملاً سازگاری به آب شیرین دارد. براساس مطالعات، به نظر می‌رسد بچه ماهیان ۱ تا ۳ گرمی قابلیت تحمل و سازگاری با نواحی مصبی و نواحی از دریا با شوری ۷ تا ۸ در هزار دارند که افزایش وزن تأثیر به‌مراتب بهتری را خواهد داشت یعنی ترجیحاً وزن ۲/۵ تا ۳ گرم جهت این کار مناسب‌تر می‌باشد. عطائی مهر و همکاران در سال ۱۳۸۹ گزارش دادند که امکان اظهار نظر صریح و قاطع در خصوص وزن و شوری مناسب رهاسازی بچه‌ماهی سفید از منظر نحوه تنظیم فشار اسمزی وجود ندارد.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

### منابع

- امیری، آ.، صیادبورانی، م.، مرادی، م.، پورغلامی، آ.، ۱۳۸۷. اثر شوری‌های مختلف بر روی رشد و ماندگاری بچه‌ماهی سفید انگشت قد. مجله علمی شیلات ایران. ۱۷(۱)، ۲۳ - ۲۹.

موزامبیک ۶۵ گرمی ۶۲۳۳ سلول کلراید (Vander Heijden *et al.*, 1997) وجود داشته است.

اندازه سلول‌های کلراید (سطح سلول‌های کلراید) پس از قرارگیری بچه ماهیان ۰/۵ گرمی در محیط‌های با شوری‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری با زمان صفر نشان نداد. در ماهیان ۱ گرمی نیز این تفاوت معنی‌دار نبود ولی سطح سلول‌های کلراید در آبشش بچه ماهیان ۱ گرمی نسبت به بچه ماهیان ۰/۵ گرمی بیشتر بود. در بچه ماهیان ۲/۵ گرمی نیز سطح سلول‌ها افزایش یافت و سطح سلول‌های کلراید نسبت به دو گروه وزنی قبل افزایش داشت. در تحقیقات مختلف، قابلیت تنظیم اسمزی با افزایش اندازه بدن ماهی افزایش می‌یابد (Evans *et al.*, 2005). اما در مورد ماهیان مهاجر و نیمه‌مهاجر این قابلیت تا وزن خاصی اتفاق می‌افتد و در گونه‌های مختلف متفاوت است (Robert, 2000).

Laurent و Hebebi (۱۹۸۹) بیان نمودند که تعداد و اندازه سلول‌های کلراید بین لاملاسی در هنگام سازگاری ماهیان یوری‌هالینی افزایش می‌یابد.

براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های شوری و تکامل بافت‌های درگیر سازگاری ماهی با شرایط جدید مانند آبشش در این تحقیق و نیز به‌منظور کاهش هزینه‌های بسیار هنگفت تولید و پرورش بدون افزایش مرگ و میر بچه ماهی، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود: بچه ماهیان ۱ و ۲/۵ گرم (ترجیحاً ۲/۵ گرم) قابلیت تنظیم اسمزی با آب لب شور ۷ تا ۸ در هزار را داشته و به نظر می‌رسد این اندازه جهت مهاجرت به دریا مناسب باشد. به‌طوری‌که ماهیان ۰/۵ گرمی فاقد این توانایی بوده‌اند.

رجبی و همکاران (۱۳۹۰) بیان نمودند که افزایش سلول‌های کلراید با افزایش وزن، شاید به جهت آماده

۲. پوستی، آ.، صدیق مرودستی، ع.، ۱۳۷۸. اطلس بافت شناسی ماهی (اشکال طبیعی و آسیب شناسی). انتشارات دانشگاه تهران، ۳۲۸ صفحه.
۳. خدابنده، ص.، تقی‌زاده، ز.، ۱۳۸۵. مکان‌یابی آنزیم  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase و سلول‌های یونوسیت در آبشش گربه ماهی به روش ایمونو هیستوشیمی. فصلنامه پزشکی یاخته، ۸(۱)، ۴۵ - ۵۲.
۴. خوشنود، ز.، خدابنده، ص.، مسافر، س.، ۱۳۸۷. مکان‌یابی آنزیم  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase و سلول‌های کلراید آبششی به روش ایمونو هیستوشیمی در بچه‌تاسماهی ایرانی. مجله علمی شیلات ایران، ۱۷(۴)، ۱۷-۲۶.
۵. رجبی، ح.، خدابنده، ص.، فلاح، س.، امیری مقدم، ج.، ۱۳۹۰. تعیین الگوی پراکنش سلول‌های کلراید آبشش در بچه‌ماهیان دو تابستانه آزاد خزر سازگار به آب شیرین. مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۲)، ۴۹ - ۵۹.
۶. صیاد بورانی، م.، طلوعیم، عبدالملکی، ش.، پورغلامی مقدم، آ.، خداپرست، ح.، غنی‌نژاد، د.، حسینی، آ.، ۱۳۷۹. بررسی کمی و کیفی بچه‌ماهیان استخوانی رهاسازی شده در آب‌های استان گیلان. مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر، صفحات ۶-۵۰.
۷. صیاد بورانی، م.، ابطحی، ب.، بهمنی، م.، کاظمی، ر.، دژندیان، س.، دقیق روحی، ج.، امیری، آ.، ۱۳۸۴. تأثیر وزن بر قابلیت تنظیم اسمزی در بچه‌ماهیان آزاد دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۱۴(۴)، ۸۱ - ۹۶.
۸. صیاد بورانی، م.، ابطحی، ب.، بهمنی، م.، ۱۳۸۶. تعیین اندازه مناسب رهاسازی بچه‌ماهی آزاد دریای خزر از طریق ارزیابی قابلیت‌های تنظیم اسمزی. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۵۴ صفحه.
۹. صیاد بورانی، م.، احمدنژاد، م.، مقصودیه کهن، ح.، دژندیان، س.، ۱۳۹۲. گزارش تعیین اندازه مناسب رهاسازی بچه‌ماهی سفید از طریق ارزیابی قابلیت‌های
- تنظیم اسمزی. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۳۹ صفحه.
۱۰. عطائی مهر، ب.، مجازی امیری، ب.، میرواقفی، ع.، نظامی، ش.، ریاضی، غ.، ۱۳۸۹. اثر شوری‌های مختلف بر میزان املاح، فشار اسمزی، آب بافت بدن، سلول‌های کلراید آبششی و درصد تلفات بچه‌ماهی سفید. مجله علمی شیلات ایران، ۱۹(۲)، ۱۱۵-۱۳۰.
۱۱. غنی‌نژاد، د.، مقیم، م.، صیاد بورانی، م.، عبدالملکی، ش.، ۱۳۸۰. ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۸۰-۷۹. مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر، بندر انزلی، ۹۸ صفحه.
۱۲. کرایوشکینا، ل.، ۱۳۷۸. بررسی سیستم اسمزی ماهیان. گرد آوری دانش خوش اصل، ع. مرادی، م. مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر، ۸۳ صفحه.
13. ASTM., 1989. American standard methods for examination of water and waste water. American public health association, Washington. 2005.
14. Avella, M., Young, G., Prunet, P., Schreek, C.B., 1990. Plasma prolactin and cortisol concentration during salinity challenges of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. Elsevier Science publishers B.V. Amsterdam. Aquaculture, 359-370.
15. Cioni, C., Merich, D.De., Cataldi, E., Cataudella, S., 1991. Fine structure of chloride cells in freshwater and saltwater adapted *Oreochromis mossambicus*. Journal of Fish Biology, 39,197-209.
16. Eldon, J.B., 2003. Regulation of renal and lower gastrointestinal function: role in fluid and electrolyte balance. Comparative Biochemistry and Physiology, 136, 499-505.
17. Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acide-base regulation and excretion of nitrogenous waste. Physiological Review, 85, 97-177.
18. Fontaine, Y.A., Pisma, M., LeMoal, C., Rambourg, A., 1995. Silvering and gill mitochondria- rich cells in the eel *Anguilla anguilla*, Cell & Tissue Research, 281(3), 465-471.
19. Hiroi, J., McCormick, S.D., Kaneko, R.O., Kaneko, T., 2005. Functional classification of

- cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 124(2), 134-143.
28. Robert, R.S., 2000. *Encyclopedia of aquaculture*. 880 p.
  29. Shikano, T., Fujio, Y., 1998. Immunolocalization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 201, 3031-3040.
  30. Thomson, A.J., Sargent, J.R. 1977. Changes in the levels of chloride cells & Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-dependent ATPase in the gills of yellow & silver eels adapting to sea water. *Journal of Experimental Zoology*, 200, 33-40.
  31. Van der Heijden, A.J.H., Verboost, P.M., Eygensteyn, J., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1997. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to freshwater or seawater. Quantification by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Biology*, 200, 55-64.
  32. Varsamos, S., 2002. Tolerance rage and osmoregulation in hypersaline conditions in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Marine Biology*, 82,1047-1048.
  33. Wong, C.K., Chan, D.K., 2001. Effects of cortisol on chloride cells in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Endocrinology*, 168, 185-192.
  34. Wood, C.M., Marshall, W.S., 1994. Ion balance, Acid-base regulation and chloride cell function in the common killifish, *Fundulus heteroclitus* a euryhaline estuarine teleosts. *Estuaries*, 17, 34-52.
- mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> cotransporter and CFTR anion channel. *The Journal of Experimental Biology*, 208, 2023-2036.
  20. Jurd, R.D., 2000. *Instant notes in animal biology*. Biological Science Publications, 140-145.
  21. Khodabandeh, S., Shahriari, M., Abtahi, B., 2009a. Changes in chloride cells abundance Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase immunolocalization and activity in gills of golden grey Mullet, *Liza aurata*, fry during adaptation to different salinities. *Yakhteh Medical Journal*, 11, 49-54.
  22. Laird, L.M., Needham, T., 1988. *Salmon and trout farming*. Ellis Horwood Limited, 87-116.
  23. Laurent, P., Hebebi, N., 1989. Gill morphology and fish osmoregulation. *Canadian Journal of Zoology*. 67, 3055-3063.
  24. Madsen, S.S., Naamansen, E.T., 1989. Plasma ionic regulation and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase changes during rapid transfer to seawater of yearling rainbow trout, *salmo gaideri*: Time course and seasonal variation. *Journal of fish Biology*, 34(6), 829-840.
  25. Maetz, J., 1974. Fish gills: mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 262, 209-249.
  26. McCormik, S.D., Naiman, R.J., 1984. Osmoregulation in the bruce trout, *Salvelinus fontinalis*. 2. Effect of size, age and photoperiod on seawater survival and ionic regulation. *Comparative Biochemistry and physiology-A*, 79a (1), 17-28.
  27. Pelis, R., McCormick, S.D., 2001. Effects of growth hormone and cortisol on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- 2Cl<sup>-</sup>