

# مطالعه اثرات شوری های مختلف بر فراوانی و مساحت سلول های کلرایدر آبشش

## بچه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)

محمد رضا پورخواجه<sup>(۱)</sup>، رحیم عبدی\*<sup>(۱)</sup>، حسین ذوالقرنین<sup>(۱)</sup>، همایون حسین زاده صحافی<sup>(۲)</sup>،

حسن مروتی<sup>(۳)</sup>

\* abdir@kmsu.ac.ir

۱- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر،

خرمشهر، صندوق پستی: ۶۶۹

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش: تابستان ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۲

### چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی توانایی تنظیم اسمزی ماهی هامور بدلیل تحمل شوری های بالا و پایین، توسط سلول های غنی از میتوکندری آبشش انجام شد. برای این منظور پس از انتقال ماهیان از آب با شوری ۴۰ ppt که متوسط شوری آب خلیج فارس می باشد به تیمارهای ۱۰ ppt، ۲۰ ppt و ۶۰ ppt تغییر در تعداد و مساحت سلول های کلراید در بین تیمارهای مختلف طی دوره دو ماهه سازگاری مشاهده گردید. نمونه برداری از ماهیان در ۸ مرحله یعنی در لحظه انتقال، ساعت ۱۲، روز ۱، روز ۳، روز ۷، روز ۱۴، روز ۳۰ و روز ۶۰ بصورت همزمان و ۳ ماهی از هر تانک انجام گرفت. برای مشاهدات هیستومورفولوژی و ایمونوهیستوشیمی پس از تهیه نمونه های ۵ میلی متری به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن فیکس شده سپس برای آبگیری نمونه ها از سری افزایشی اتانول استفاده گردید. پس از شفاف سازی توسط گزبل در مرحله بعدی توسط پارافین مذاب پارافینه شدند. سپس از بلوک های تهیه شده، برش هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و توسط رنگ هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. مطالعه تغییرات در تعداد و مساحت سلول های کلراید در سطح ۵٪ اطمینان در شوری های بالا و لب شور بسیار متفاوت بوده بطوریکه در ساعات اولیه انتقال تعداد و مساحت سلول های کلراید در آب های لب شور کمتر از آب با شوری بالا بود. اما از هفته دوم بعد از انتقال تا پایان دوره تعداد سلول های کلراید در تیمار ۶۰ ppt بیشتر از تیمار کنترل بوده و از روز هفتم تا پایان دوره مساحت سلول های کلراید در این شوری بیشتر از تیمار کنترل بود. با به توانایی بالای این ماهی در سازگاری و پاسخ به شوری های متفاوت محیط که با تغییرات بافت شناختی آبشش همراه می باشد می تواند مدل مناسبی برای بررسی مکانیسم های تنظیم اسمزی در شوری های متفاوت باشد.

**کلمات کلیدی:** بچه ماهی هامور معمولی، شوری، آبشش، سلول های کلراید

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

هامور ماهیان از خانواده Serranidae بوده و در آب های شور زیست می کنند. این ماهیان در اکثر کشور های جنوب شرق آسیا جزء ماهیان مهم پرورشی محسوب می شوند و به دلیل داشتن گوشت لذیذ و غنی، دارای ارزش اقتصادی بالایی هستند ( Evans, 1997; Laurent & Perry, 1990). هامور معمولی ساکن آب شور می باشد، بنابراین نسبت به محیط خود هیپواسموتیک است ( Perry, 2003; Lin & Sung, 1998). موجودات خشکی زی و آبی باید فشار اسمزی سلول هایشان را بوسیله تنظیم جریان یون ها و آب از غشای سلولی با صرف انرژی کنترل و ثابت نگه دارند (Alderdice, 1988). تنظیم اسمزی مکانیسم حفظ هومئوستازی مایعات درونی بدن است که مسئول کنترل اسمولالیته یا فشار اسمزی پلاسما می باشد (Katoh et al., 2004). ماهیان شور پسند ظرفیت تنظیم اسمزی تحت شرایط محیطی مختلف از آب شیرین تا آب بسیار شور را دارند. این ظرفیت فیزیولوژیکی عموماً با استفاده از سنجش فعالیت آنزیمی  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase، کمیت هورمون ها، الکترولیت ها، متابولیت ها، بیان ژن، مطالعه بافت ها مانند آبشش، کلیه و روده در ماهیان، مورد بررسی قرار می گیرد ( Boutet et al., 2006; Hirose et al., 2003). آبشش با تغییر دادن مساحت و تعداد سلولهای کلراید یا سلولهای غنی از میتوکندری یا سلولهای یونوسیت به عنوان مهمترین اندام دخیل در تنظیم یونی و اسمزی در تلتوستها نسبت به شوریهای مختلف قابل ذکر می باشد (Lee Lin & Sung, 2003; et al., 2006). با توجه به ارزش بسیار زیاد گونه مورد نظر نتایج حاصل از این تحقیق مسیر مطالعاتی تنظیم اسمزی با توجه به تغییرات حاصل در فعالیت پمپ سدیم پتاسیم ATPase و سلولهای کلراید مشخص نموده و اطلاعات جامع و کاملتری نسبت به تنظیم اسمزی ارائه می دهد. لذا می تواند پایه ای بر بررسی دیگر تغییرات حاصله در اثر شوری بوده و اساس معرفی یک گونه جدید قابل پرورش در منطقه باشد. این پژوهش ما را در امر

تعیین زمان دقیق معرفی گونه به استخرهای پرورشی یاری داده و به بهبود مدیریت نواحی ساحلی در حفظ گونه های بومی کمک شایانی خواهد کرد.

## مواد و روش ها

تعداد ۶۰۰ قطعه هامور با وزن حدود ۱ گرم از مرکز تحقیقات شیلات واحد بندر امام و ماهشهر تهیه شد، سپس ۴۸۰ قطعه از آنها که دارای پارامترهای بیولوژیک مشابه و به ظاهر سالم به ۱۶ تانک ۳۰۰ لیتری محتوی آب دریا (هر تانک ۳۰ قطعه ماهی) به مدت یک هفته برای سازش با شرایط جدید (سوله تحقیقاتی مورد نظر) انتقال داده شدند. پس از این دوره شوری های مختلف به شرح زیر در مورد تانک ها اعمال گردید. در این تحقیق از شوری ۱۰ ppt تا ۶۰ ppt که از حداکثر شوری در آبهای آزاد ایران بیشتر است استفاده شد. شوری خلیج فارس در بیشتر مناطق آن ۴۰ ppt می باشد و در نواحی محصور به حدود ۵۰ ppt نیز می رسد. لذا یک تیمار لب شور ۲۰ ppt، یک تیمار شاهد ۴۰ ppt، یک تیمار با شوری ۱۰ ppt، یک تیمار خیلی شور ۶۰ ppt در نظر گرفته شد. شوری ۱۰ ppt تا ۶۰ ppt از این جهت مورد استفاده قرار گرفت که این ماهی در مناطق ساحلی زندگی می کند در اثر بارندگی شدید و تبخیر زیاد شوری این مناطق دستخوش تغییرات شدیدی می شود که بر موجودات این مناطق تاثیر زیادی می گذارد. پس از آماده سازی تانک های مورد نظر محتوی هر غلظت، در طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکی شیمیایی آب از قبیل شوری، دما، pH با استفاده از رفرکتومتر نوری-Horiba U-10، ژاپن، ترمومتر دیجیتالی (Horiba U-10، ژاپن) و pH متر دیجیتالی (Horiba U-10، ژاپن) انجام می گرفت. نمونه برداری از ماهیان در ۸ مرحله (در لحظه انتقال، ساعت ۱۲، روز ۱، روز ۳، روز ۷، روز ۱۴، روز ۳۰ و پایان دوره پرورش پس از انتقال به تانک ها یعنی روز ۶۰ بصورت همزمان و ۳ ماهی از هر تانک (۱۲ ماهی از هر

## نتایج

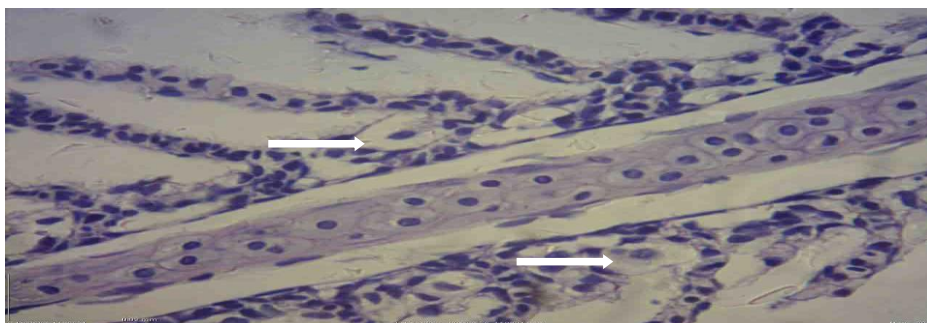
سلول‌های کلراید آبشش در پایه لاملا و فضای بین لاملایی وجود داشته، شناسائی آن با توجه به رنگ پذیری بیشتر این سلول‌ها نسبت به ائوزین در رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و اندازه بزرگ آنها مشخص گردید. همچنین جهت شناسایی محل دقیق سلول‌های مذکور از روش ایمونوهیستوشیمی (Wilson et al., 2002; Boutet et al., 2006) استفاده گردید (تصاویر ۱ و ۲). در مطالعه‌ی حاضر یک دسته از سلول‌های کلراید در بافت پوششی آبشش قابل تشخیص بودند. انتقال مستقیم ماهی هامور به تیمارهای مختلف شوری با تغییرات عمده‌ای در تعداد و مساحت سلول‌های کلراید همراه گردید. لیکن این تغییرات در طول دوره‌ی سازگاری یکسان نبوده و تحت تاثیر شوری و زمان، الگوی متفاوتی از تغییر مساحت و تعداد سلول‌های کلراید مشاهده گردید. با این وجود در کوتاه مدت شاید بتوان یک روند افزایشی در تعداد سلول‌های کلراید در تیمار ۶۰ ppt و یک روند کاهشی در تیمارهای ۱۰ ppt و ۲۰ ppt موثر از شدت شوری را وضع نمود. از طرفی در دراز مدت تغییر تعداد سلول‌های کلراید به صورت دو الگوی متمایز در شوری‌های پایین و بالاتر قابل تشخیص به نظر می‌رسید.

### نتایج حاصل از بررسی روند تغییر تعداد و مساحت

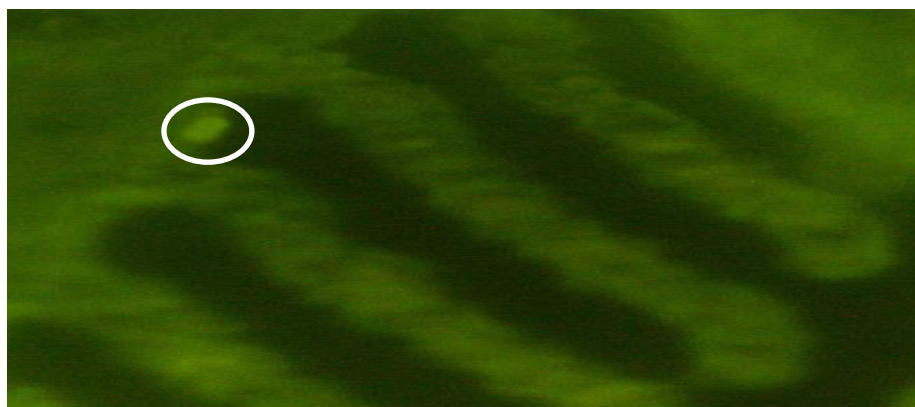
#### سلول‌های کلراید در تیمار ۱۰ ppt

نتایج حاصله براساس اطلاعات بدست آمده از نمودار و جدول ۱ نشان می‌دهد که نمونه‌های آبشش گروه‌های ۱ (لحظه انتقال) و ۲ (۱۲ ساعت پس از انتقال) و ۳ (روز ۱) در یک گروه و نمونه‌های بدست آمده از نمونه برداری‌های ۴ (روز ۳) و ۵ (روز ۷) و ۶ (روز ۱۴) و ۷ (روز ۳۰) و ۸ (روز ۶۰) در گروهی دیگر قرار می‌گیرند،  $(F=1.63, df=3, P \leq 0.05)$  (بارها بیانگر انحراف معیار از میانگین می‌باشد) (نمودار ۱).

تیمار) در هر بار انجام می‌گرفت. ماهیان پس از صید، بلافاصله (جهت کاهش اثرات عوامل استرس‌زا)، در داخل تشت‌های پلاستیکی محتوی آب همسان با تانک حاوی هر ماهی که دارای ماده بیهوش‌کننده گل میخک بود بیهوش می‌شدند. کمان آبششی دوم سمت چپ به قطعات کوچک تر (هرکدام حداقل شامل ۵ رشته آبششی (Gill filament) متصل به کمان (سپتوم) بریده شده، با قرار دادن به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن (شامل ۷۰ درصد اسیدپیکریک اشباع شده، ۲۵ درصد فرمالین تجاری و ۵ درصد اسیداستیک) تثبیت و برای نگهداری، در الکل ۷۰٪ قرار داده شد. و پس از انجام مراحل معمول بافت شناسی برشهایی با ضخامت ۶-۵ میکرون از بافت‌ها تهیه و رنگ آمیزی بروش هماتوکسیلین-ائوزین صورت گرفت. در نهایت از لام‌های میکروسکوپی تهیه شده فتومیکروگرافهای لازم تهیه و مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور سلول‌های کلراید در ۱۰ میدان میکروسکوپی حاصل از یک لام متعلق به یک آبشش و از هر نمونه ۳ لام تهیه گردیده بنابراین ۳۰ میدان میکروسکوپی برای آبشش هر ماهی شمارش گردید. جهت مطالعه مقاطع میکروسکوپی در این مرحله ساختار بافت شناسی قسمت‌های مختلف از نظر شمارش و مساحت سلول‌های کلراید بوسیله میکروسکوپ نوری مجهز به لنز داینولیت مورد مطالعه هیستولوژی و هیستومتری قرار گرفته و نتایج به دست آمده با استفاده از تصاویر میکروسکوپی تهیه شده ارائه شده و همچنین میانگین داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و پس از آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته که با استفاده از جدول و نمودار با استفاده از نرم افزار excel در ادامه ارائه شده اند. همچنین از لحاظ قرار گرفتن نمونه‌های مختلف از نظر تعداد و مساحت سلول‌های کلراید (بر حسب میکرومتر مربع) در یک گروه مجزا یا مشترک با حروف‌های a، b و c مشخص گردیده است (جدول ۱ و نمودارهای ۱ تا ۸).



تصویر ۱- در این تصویر سلولهای کلراید در نمونه شاهد مشخص گردیده است (بیگان ها) (H&E, X400).

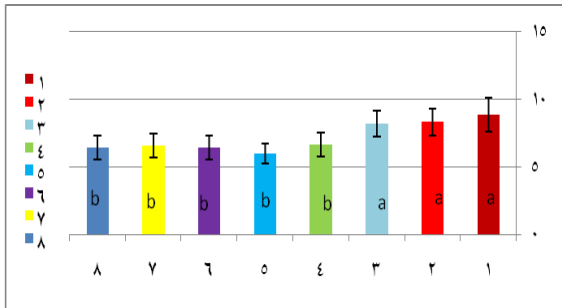


تصویر ۲- در این تصویر سلولهای کلراید در نمونه شاهد که به روش ایمنووهیستوشیمی مشخص گردیده است (دایره) (X400).

جدول ۱- Mean  $\pm$  SE که اعداد داخل هر کادر در ردیف بالا مربوط به تعداد و اعداد پایین مربوط به مساحت سلولهای کلراید (میکرو متر مربع) در ۸ مرحله برداری در شوری های مختلف می باشند.

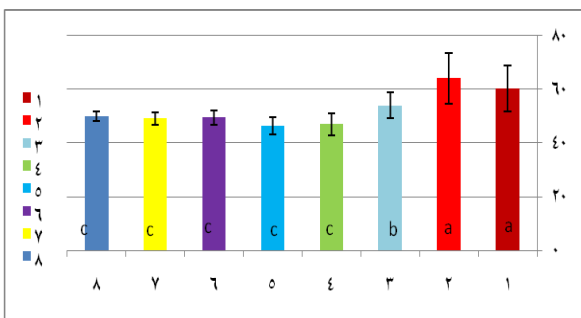
نمونه برداری	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	شوری
۱۰ ppt	۰/۶۰ $\pm$ ۹/۷۹	۰/۶۵ $\pm$ ۸/۷۶	۰/۹۷ $\pm$ ۹/۲۳	۰/۵۳ $\pm$ ۶/۹۷	۰/۵۲ $\pm$ ۵/۸۸	۰/۹۲ $\pm$ ۵/۷۳	۰/۶۴ $\pm$ ۵/۹۱	۰/۶۳ $\pm$ ۵/۷۳	
۲۰ ppt	۰/۵۲ $\pm$ ۶۰/۸۳	۰/۴۲ $\pm$ ۶۲/۸۵	۰/۵۴ $\pm$ ۵۲/۷۳	۰/۵۱ $\pm$ ۴۸/۴۳	۰/۴۲ $\pm$ ۴۷/۱۲	۰/۷۲ $\pm$ ۶۵/۸۶	۰/۱۲ $\pm$ ۳۸/۹۳	۰/۶۱ $\pm$ ۴۹/۵۵	
۴۰ ppt	۰/۳۹ $\pm$ ۹/۴۹	۰/۴۱ $\pm$ ۸/۴۵	۰/۲۲ $\pm$ ۸/۲۳	۰/۵۳ $\pm$ ۷/۴۱	۰/۵۲ $\pm$ ۶/۸۸	۰/۸۱ $\pm$ ۶/۷۳	۰/۶۳ $\pm$ ۷/۹۱	۰/۹۴ $\pm$ ۶/۷۳	
۶۰ ppt	۰/۴۱ $\pm$ ۶۰/۱۱۹	۰/۱۲ $\pm$ ۶۰/۴۴	۰/۸۲ $\pm$ ۶۱/۷۳	۰/۵۱ $\pm$ ۴۸/۴۳	۰/۴۲ $\pm$ ۴۷/۱۲	۰/۷۳ $\pm$ ۴۹/۸۳	۰/۳۸ $\pm$ ۴۹/۹۳	۰/۶۷ $\pm$ ۵۰/۵۵	
	۰/۶۲ $\pm$ ۸/۵۲	۰/۶۶ $\pm$ ۹/۸۶	۰/۱۷ $\pm$ ۹/۱۱	۰/۳۵ $\pm$ ۸/۲۲	۰/۹۲ $\pm$ ۸/۸۸	۰/۹۲ $\pm$ ۸/۷۳	۰/۶۰ $\pm$ ۸/۹۱	۰/۲۷ $\pm$ ۸/۷۳	
	۰/۱۲ $\pm$ ۶۰/۸۵	۰/۶۴ $\pm$ ۶۰/۲۵	۰/۲۲ $\pm$ ۵۹/۹۰	۰/۳۸ $\pm$ ۵۸/۴۳	۰/۱۲ $\pm$ ۵۷/۱۲	۰/۷۲ $\pm$ ۵۶/۸۶	۰/۲۵ $\pm$ ۵۵/۹۳	۰/۶۰ $\pm$ ۵۵/۳۱	
	۰/۱۵ $\pm$ ۸/۴۴	۰/۶۸ $\pm$ ۱۰/۸۶	۰/۶۸ $\pm$ ۹/۱۰	۰/۱۵ $\pm$ ۸/۹۴	۰/۵۷ $\pm$ ۸/۷۳	۰/۷۵ $\pm$ ۸/۸۸	۰/۴۱ $\pm$ ۸/۹۱	۰/۴۶ $\pm$ ۸/۹۵	
	۰/۵۴ $\pm$ ۶۰/۸۴	۰/۱۴ $\pm$ ۶۲/۲۵	۰/۶۷ $\pm$ ۶۰/۹۰	۰/۶۷ $\pm$ ۶۱/۴۳	۰/۳۵ $\pm$ ۶۰/۱۲	۰/۳۵ $\pm$ ۶۰/۸۶	۰/۳۹ $\pm$ ۶۱/۹۳	۰/۳۸ $\pm$ ۶۰/۳۱	

مراحل ۱ و ۲ و ۳ در یک گروه و نمونه های بدست آمده از نمونه برداری های مراحل ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ در گروهی دیگر قرار می گیرند ( $F=2.47$ ,  $df=5$ ,  $P \leq 0.05$ ) (بارها بیانگر انحراف معیار از میانگین می باشد) (نمودار ۳).

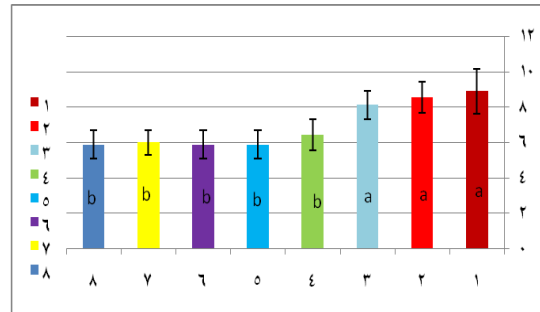


نمودار ۳- روند تغییرات در شوری ۲۰ppt که محور افقی تعداد دفعات نمونه برداری و محور عمودی مربوط به تعداد سلولهای کلراید می باشد.

همچنین از اطلاعات آماری بدست آمده از جدول ۱ و نمودار ۴ بر روی مساحت سلولهای کلراید چنین بر می آید که نمونه های بدست آمده از نمونه برداری های مراحل ۱ و ۲ با هم و نمونه های بدست آمده از نمونه برداری های مراحل ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ در گروهی دیگر اما نمونه های بدست آمده از نمونه برداری مرحله ۳ در گروهی مجزا قرار می گیرد ( $F=1.46$ ,  $df=3$ ,  $P \leq 0.05$ ) (بارها بیانگر انحراف معیار از میانگین می باشد) (نمودار ۴).

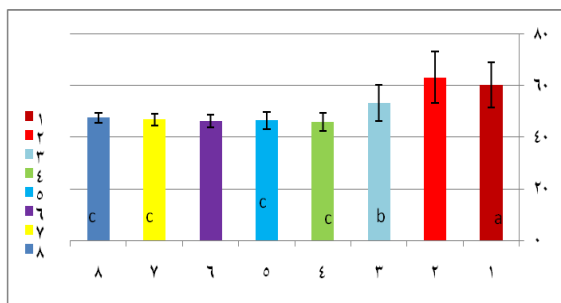


نمودار ۴- روند تغییرات در شوری ۲۰ppt که محور افقی تعداد دفعات نمونه برداری و محور عمودی مربوط به مساحت سلولهای کلراید (میکرومتر مربع) می باشد.



نمودار ۱- روند تغییرات در شوری ۱۰ppt که محور افقی تعداد دفعات نمونه برداری و محور عمودی مربوط به تعداد سلولهای کلراید می باشد.

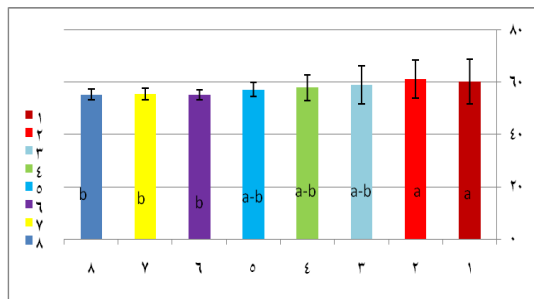
همچنین از اطلاعات آماری بدست آمده بر روی مساحت سلول های کلراید از جدول ۱ و نمودار ۲ چنین بر می آید که نمونه های بدست آمده از نمونه برداری های مراحل ۱ و ۲ با هم و نمونه های بدست آمده از نمونه برداری های مراحل ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ در گروهی دیگر اما نمونه های مرحله ۳ در گروهی مجزا قرار می گیرد ( $F=1.54$ ,  $df=3$ ,  $P \leq 0.05$ ) (بارها بیانگر انحراف معیار از میانگین می باشد) (نمودار ۲).



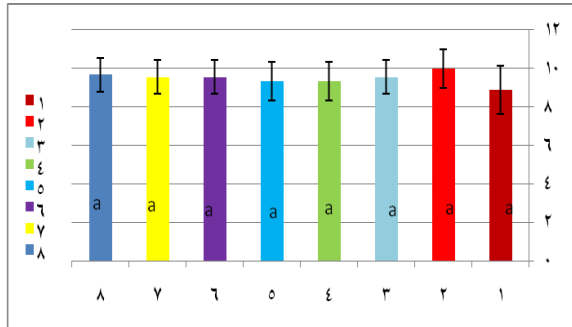
نمودار ۲- روند تغییرات در شوری ۱۰ppt که محور افقی تعداد دفعات نمونه برداری و محور عمودی مربوط به مساحت سلولهای کلراید (میکرومتر مربع) می باشد.  
نتایج حاصل از بررسی روند تغییر تعداد و مساحت سلولهای کلراید در تیمار ۲۰ppt

از اطلاعات آماری بدست آمده از جدول ۱ و نمودار ۳ بر روی تعداد سلولهای کلراید در شوری ۲۰ppt چنین بر می آید که نمونه های بدست آمده از نمونه برداری های

در مساحت در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $F=1.75$ ,  $df=3$ ,  $P\leq 0.05$ ) (بارها بیانگر انحراف معیار از میانگین می باشد). لذا تمامی نمونه های بدست آمده از این تیمار در یک گروه آماری قرار می گیرند (نمودار ۷).



نمودار ۶- روند تغییرات در شوری ۴۰ ppt که محور افقی تعداد دفعات نمونه برداری و محور عمودی مربوط به مساحت سلولهای (میکرومتر مربع) کلراید می باشد.

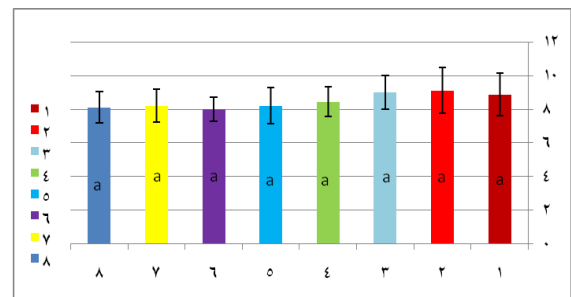


نمودار ۷- روند تغییرات در شوری ۶۰ ppt که محور افقی تعداد دفعات نمونه برداری و محور عمودی مربوط به تعداد سلولهای کلراید می باشد.

از اطلاعات آماری بدست آمده بر روی مساحت سلولهای کلراید در شوری ۶۰ ppt با توجه به جدول ۱ و نمودار ۸ چنین بر می آید که نمونه های بدست آمده از تمامی نمونه برداری ها در یک گروه قرار می گیرند به این معنا که در بین نمونه ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری

### نتایج حاصل از بررسی روند تغییر تعداد و مساحت سلولهای سلولهای کلراید در تیمار ۴۰ ppt

اگر چه کاهش اندکی در تعداد سلولهای کلراید بعد از نمونه برداری روز اول مشاهده شد ولی از لحاظ آماری با توجه به جدول ۱ و نمودار ۵ در بین نمونه ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری وجود نداشت. لذا تمامی نمونه های بدست آمده از این تیمار در یک گروه آماری قرار می گیرند ( $F=1.77$ ,  $df=5$ ,  $P\leq 0.05$ ) (بارها بیانگر انحراف معیار از میانگین می باشد) (نمودار ۵).



نمودار ۵- روند تغییرات در شوری ۴۰ ppt که محور افقی تعداد دفعات نمونه برداری و محور عمودی مربوط به تعداد سلولهای کلراید می باشد.

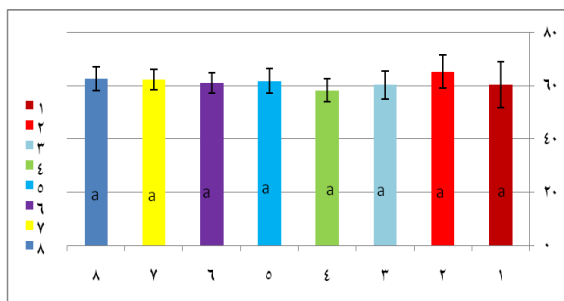
همچنین از اطلاعات آماری بدست آمده از جدول ۱ و نمودار ۶ بر روی مساحت سلولهای کلراید چنین بر می آید که نمونه های بدست آمده از نمونه برداری در مراحل ۱ و ۲ با نمونه های بدست آمده از نمونه برداری در مراحل ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ اختلاف معنی داری با هم دارند ( $F=1.86$ ,  $df=3$ ,  $P\leq 0.05$ ) ولی نمونه های بدست آمده از نمونه برداری در مراحل ۳ و ۴ و ۵ با هر دو گروه اختلاف معنی داری ندارند ( $F=1.73$ ,  $df=3$ ,  $P\leq 0.05$ ) (بارها بیانگر انحراف معیار از میانگین می باشد) (نمودار ۶).

### نتایج حاصل از بررسی روند تغییر تعداد و مساحت سلولهای کلراید در تیمار ۷۰ ppt

در این مرحله اگر چه کاهش اندکی در تعداد سلولهای کلراید بعد از نمونه برداری روز اول مشاهده شد ولی از لحاظ آماری با توجه به جدول ۱ و نمودار ۷ در بین نمونه ها

سازگاری ماهی شانک گیل هد با شوری بالاتر از آب دریا را گزارش کردند (Laize-Carrion *et al.*, 2005). در شوری‌های کمتر از آب دریا الگوی تغییرات در تعداد سلول‌های کلراید متفاوت بوده بطوریکه مساحت یونوسیت‌ها نیز در شوری ۲۰ ppt به تدریج کاهش یافته و در پایان دوره از تمامی تیمارها کمتر بود. یافته اخیر با مشاهدات Laize-Carrion و همکاران (۲۰۰۵) و Fielder و همکاران (۲۰۰۷) که نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند مطابقت داشت (Fielder *et al.*, 2007; Laize-Carrion *et al.*, 2005). به نظر می‌رسد بدلیل اختلاف کمتر در اسمولالیتی و غلظت یون‌ها بین محیط و مایعات بدن ماهی، در محیط ۲۰ ppt، نیاز به دفع فعال یون‌های اضافی، کاهش یافته باشد. لذا در یک پاسخ سازشی، با کاهش تعداد و مساحت سلول‌های غنی از میتوکندری، تعداد آنزیم‌ها و ناقل‌های یونی (که در غشای سلولی جای دارند) و در نتیجه، فعالیت این سلول‌ها کمتر می‌شود (Immsland, 2003). موحدی نیا در سال ۱۳۸۸ در شوری ۵ ppt در سازش با شرایط اسمزی کمتر از مایعات بدن هم نیاز به حضور فعال این سلول‌ها را گزارش کردند. همچنین از نظر مساحت نیز سلول‌های غنی از میتوکندری در شرایط ۶۰ ppt بطور معنی‌داری از گروه ۲۰ ppt بزرگتر بوده و میانگین مساحت در پایان دوره با گروه‌های کنترل یکسان می‌نمود. این نتایج اثبات می‌کند که علی‌رغم دخالت سلول‌های غنی از میتوکندری در دفع یون در محیط‌های هایپراسموتیک، وظیفه جذب یون‌ها در محیط‌های هایپواسموتیک نیز بر عهده‌ی این سلول‌ها است. در مطالعه انجام شده توسط قاضی لو در سال ۱۳۸۶ که با انتقال مستقیم ماهی زروک نا بالغ، از آب شیرین به آب شور انجام گرفت در مراحل مختلف سازگاری با تغییرات عمده در تعداد سلول‌های کلراید همراه بود (قاضی لو، ۱۳۸۶). در واقع شاید بتوان القاء پتانسیل سازگاری را در این گونه، در دوره‌های کوتاه مدت و میان مدت سازگاری متأثر از دو فاکتور اصلی زمان و شوری دانست. بررسی‌های انجام شده در مورد سایر ماهیان حاکی از

وجود نداشت ( $F=3$ ,  $df=1.67$ ,  $P \leq 0.05$ ) (بارها بیانگر انحراف معیار از میانگین می باشد) ( نمودار ۸).



نمودار ۸- روند تغییرات در شوری ۶۰ ppt که محور افقی تعداد دفعات نمونه برداری و محور عمودی مربوط به مساحت سلولهای کلراید (میکرومتر مربع) می باشد.

## بحث

نتایج حاصله از بررسی روند تغییرات در شوری‌های ۱۰ ppt و ۲۰ ppt چنین بر می‌آید که بین نمونه‌های بدست آمده در نمونه برداری مراحل ۱ و ۲ و ۳ با هم و نمونه‌های بدست آمده در نمونه برداری ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ با هم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی بین گروه اول و دوم اختلافی در سطح ۵٪ وجود داشت که نشان دهنده اختلاف شدید بین این دو گروه می‌باشد از سوی دیگر بعد از انتقال به تیمار ۱۰ ppt تا روز اول تغییرات چندانی در تعداد سلول‌های کلراید مشاهده نمی‌شد ولی از روز سوم به بعد تعداد این سلول‌ها در آبشش ماهی‌ها روند کاهشی یافته بود. همچنین در بررسی روند تغییرات در شوری ۴۰ ppt و ۶۰ ppt چنین بر می‌آید که بین نمونه‌های بدست آمده در نمونه برداری مراحل ۱ تا ۸ هیچ اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد سلول‌های کلراید وجود نداشت. موحدی نیا و همکاران (۱۳۸۸) با مطالعه بر روی ماهی شانک زرد بالهنشان دادند که تعداد سلول‌های یونوسیت‌ها در مواجهه‌ی ناگهانی با شوری ۶۰ ppt شروع به افزایش ناگهانی کرده درحالی‌که پس از ۲۴ ساعت، تعداد این سلول‌ها بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت (موحدی نیا، ۱۳۸۸). Laize-Carrion و همکاران (۲۰۰۵) نیز افزایش سلول‌های غنی از میتوکندری پس از

فیلامنتی در ماهیان ساکن آب شور میتواند استدلالی قطعی در تایید نظریه ی تکاملی فوق باشد ( Zydlewski & McCormick, 2001). در مطالعه انجام شده توسط محققین در ماهیان سازش یافته به آب شیرین و انتقال به آب شور حاکی از افزایش مساحت سلول های کلراید بود (Zydlewski & McCormick, 2005). مساحت سلول های غنی از میتوکندری در ماهی شانک زردباله نیز در پاسخ به شوری محیطی پس از ۷ روز افزایش معنی دار داشت. این مساحتی بزرگتر اگر چه تا پایان دوره همچنان وجود داشت ولی تفاوت معنی داری با نمونه های تیمار کنترل نشان نداد. این پاسخ یعنی افزایش مساحت و تعداد سلول غنی از میتوکندری بدلیل نیاز به انتقال یون بیشتر، مرتبط بوده و احتمالاً نشانه ی افزایش در پمپ ها و ناقلین یون می باشد. قابل تصور است که سلول های بزرگ تر می توانند تعداد پمپ بیشتری داشته و بنابراین می توان افزایش مساحت و تعداد را به افزایش فعالیت آنزیمی ارتباط داد (Wilson et al., 2002 و ۱۳۸۸).

## منابع

قاضی لو، ا.، ۱۳۸۶. مطالعه تغییر سلولهای کلراید اپیتلیوم آبششی در پاسخ به افزایش شوری در ماهی زروک. پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی بیولوژی جانوران دریا، دانشگاه علوم و فنون دریائی خرمشهر. ۷۵ صفحه.

موحدی نیا، ع.، ۱۳۸۸. مکانیسم های تنظیم اسمزی در ماهی شانک؛ مطالعه ی اکولوژیکی، بافت شناختی و فراساختاری آبشش. پایان نامه ی دکتری رشته ی بیولوژی جانوران دریا، دانشگاه علوم و فنون دریائی خرمشهر. ۱۴۵ صفحه.

Alderdice D.F., 1988. Osmotic and ionic regulation in the teleost eggs and larvae. In: Hoar A., and Randall D.J., (Eds.), Fish

حضور مکانیسمی مشابه و گاه متفاوت در گونه های مختلف ماهیان یوری هالین بوده است. بررسی تاثیر تغییرات شوری روی تغییرات مورفولوژیک سلولهای کلراید آبششی ماهی سرخو حاکمی از تفاوت تعداد سلولهای کلراید بوده به نحویکه انتقال مستقیم ماهیان از شوری ppt ۳۰ به شوری ppt ۴۵، با عدم تغییر در تعداد سلولهای کلراید همراه بوده لیکن انتقال مستقیم از شوری ppt ۳۰ به شوری ppt ۱۵ با کاهش تعداد سلولهای کلراید لاملائی همراه گردید (Fielder et al., 2007; Greco et al., 1995). نتایج مشابه در مورد شاه ماهی با انتقال مستقیم از آب شور به آب شیرین گزارش گردیده است (Lin & Zydlewski & McCormick, 2001 ; Sung, 2003). Uchida و همکاران با مطالعه ی فیزیولوژی آزاد ماهی چام سلولهای کلراید لاملائی را به عنوان واحد های اصلی جذب یون در شرایط هیپو اسموتیک و سلولهای کلراید فیلامنتی را به عنوان واحدهای دفع یون در شرایط هیپراسموتیک قلمداد کردند (Uchida et al., 1996). مطالعات بعدی Hirai و همکاران روی ماهی سوف ژاپنی با تایید نظریه فوق همراه گردید (Hiari et al., 1999). لیکن به نظر میرسد، فرضیه فوق تنها در مورد گونه های خاص که دارای سلولهای کلراید لاملائی هستند مصداق داشته باشد. در مطالعه حاضر با وجود اینکه تعداد سلولهای کلراید در ناحیه ی فیلامنتی و قاعده لاملائی ماهیان سازگار شده با آب شیرین و شور تفاوت معنی داری را نشان نداد لیکن بالا بودن تراکم سلولهای کلراید لاملائی در ماهیان سازگار شده با آب شیرین امری مشهود به نظر میرسد. در طول پروسه ی سازگاری سلولهای کلراید به طور عمده در موضع فیلامنتی قابل تشخیص بودند. میزان بازسازی سلولهای کلراید در ماهیان ساکن آب شیرین، در انواع آب ساکن شور و ماهیان سازگار شده با آب شور به ترتیب ۸٪، ۲۱٪ و ۲۸٪ برآورد گردید. لذا حضور یک چرخه ی کامل بازسازی سلولهای کلراید در ماهیان سازگار شده با محیط های مختلف امری بدیهی به نظر میرسد و بالا بودن میزان بازسازی در سلولهای کلراید

fish. Eggs and larvae, vol.11, Academic press, London, Pp. 163-251.

**Boutet I., Long C.L., and Bonhomme F., 2006.** A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*. Journal of Fish Biology, 57:593-599.

**Evans D.H., 1997.** The physiology of fishes. Boca Raton, CRC press, 519 P.

**Fielder D.S., Allan G.L., Pepperall D., and Pankhurst P.M., 2007.** The effects of changes in salinity on osmoregulation and chloride cell morphology of juvenile Australian snapper, *Pagrus auratus*. Aquaculture, 272:656-666.

**Greco A.M., Gilmour K.M., Fenwick J.C., and Perry S.F., 1995.** The effect of soft water acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout. Journal of Experimental Biology, 198: 2557-2567.

**Hiari N., Tagawa M., Kaneko T., Seikai T., and Tanaka M., 1999.** Distributional changes in branchial chloride cells during freshwater adaptation in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. Zoological Science, 16:43-49.

**Hirose S., Kaneko T., Naito N., and Takei Y., 2003.** Molecular biology of major components of chloride cells. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 136: 593-620.

**Imsland A.K., Gunnarsson S., Foss A., Stefansson S.O., 2003.** Gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

physiology. The physiology of developing ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* reared at different temperatures and salinities. Aquaculture, 218: 671-683.

**Katoh F., Hyodo S., and Kaneko T., 2004.** Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish adapted to a low ion environment. Journal of Experimental Biology, 206:793-803.

**Laize-Carrion R., Gaurreirop M., Fuentes J., Canario A.V.M. Martin del Rio M.P., and Mancera J.M., 2005.** Branchial osmoregulatory response to salinity in the Gilthead Sea Bream, *Sparus auratus*. Journal of Experimental Zoology, 303:563-570.

**Laurent P., and Perry S.F., 1990.** Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. Cell and Tissue Research, 259:429-442.

**Lin, H.C., and Sung W.T., 2003.** The distribution of mitochondria-rich cells in the gills of air-breathing fishes. Physiology Biochemistry. Zoology, 76:215-228.

**Lee K.M., Kaneko T., Katoh F., and Aida K., 2006.** Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in fugu *Takifuguru bripes* exposed to a hypo

- osmotic environment. *General and Comparative Endocrinology*, 149:285-293.
- Perry S.F., 1998.** Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119:9-16.
- Uchida K., Kaneko T., Yamauchi K., and Hirano T., 1996.** Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *Journal of Experimental Zoology*, 276: 193–200.
- Wilson J.M., Whiteley N.M., and Randal D.J., 2002.** In regulatory changes in gill epithelia of coho salmon during seawater acclimation. *Physiology Biochemistry Zoology*, 75:237- 240.
- Zydlewski G., and Mc Cormick S.D., 2001.** Developmental and environmental regulation of chloride cells in Young American Shad, *Alosa sapidissima*. *Journal of Experimental Zoology*, 290:73-87.

## Effects of different salinity on number and area of chloride cells in gill of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*)

Pourkhadje, M. R.<sup>(1)</sup>, Abdi, R.<sup>(1)\*</sup>, Zolgharnein, H.<sup>(1)</sup>, Hoseinzade Sahafi, H.<sup>(2)</sup>, Morovvati, H.<sup>(3)</sup>

abdir@kmsu.ac.ir

1- Department of Marine Biology, Khorramshahr University of Marine Science and Technology

2-Iranian Fisheries Research Organization

3- Department of histology, Shahid Chamran university of Ahvaz

**Key words:** Juvenile's grouper, Salinity, Gill, Chloride cell

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the ability of osmoregulation by mitochondria-rich cells in grouper fish with high tolerance of salinity variation levels. For this purpose, groupers were transferred from salt water with an average salinity of 40 ppt to the waters with 10 ppt, 20 ppt and 60 ppt rates of salinity. Changes in the number and area of chloride cells in the different treatments were observed during two months adjustment period. Experiment was carried out by sampling three fish from each tank within 8 phases at the moment of the transition, 12 hours, day 1, day 3, day 7, day 14, day 30 and day 60. Histomorphological and immunohistochemical observations were done after fixing in Bouin's solution for 24 hours. Samples were dehydrated with increasing series of ethanol, followed by paraffin, and cleared by xylene. Paraffin blocks were cut at 5 microns and stained by hematoxylin – eosin. Changes in the number and area of chloride cells in 5% level were very different at high and brackish salinity. So in the early hours of the transfer, number and area of chloride cells were low in the brackish water than to that in high salinity. From second week towards the end of period, number of chloride cells in 60 ppt was more than that in control treatment from seventh days towards the end of period, the area of chloride cells was more than that in control group. The high ability and adaptability of this species in response to different environmental salinities might be associated with changes in gill histological evaluation and model osmoregulation mechanisms at different salinities.

---

\*Corresponding author