Archive of SID

سازگاری ماهیان هیبرید (*Oncorhynchus mykiss*♀ × *Salmo trutta caspius*♂) تریپلوئید در انتقال مستقیم به شوریهای متفاوت آب

خسرو رحیمی[1]، محمدرضا کلباسی[1*]، صابر خدابنده[2]، مهدی فروزنده[3] و ساحل سلطان کریمی[1]

[1] نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات

[2] نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی، گروه بیولوژی دریا

[3] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ٨٧/٣/٢٥ تاریخ پذیرش: ٨٩/١/٢٥

چکیده

سازگاری ماهیان هیبرید تریپلوئید حاصل از آمیزش ماهی آزاد دریای خزر (نر) و قزل آلای رنگین کمان (ماده) در انتقال مستقیم به آب با شوریهای ٦، ١٢ و ١٨ در هزار مورد بررسی قرار گرفت. روند تغییرات اسمولالیته پلاسمای خون ، پراکنش و تعداد سلولهای کلراید و همچنین بیان ژن زیر واحد α_{1b} آنزیم Na^+-K^+-ATPase بافت آبشش با روشهای اسمومتری، بافت شناسی، ایمونوهیستوشیمی و بیان ژن بررسی گردید. نتایج حاصل پس از طی دوره ١٠ روزه سازگاری ماهیان با آب شور نشان داد که ماهیان هیبرید تریپلوئید در تیمار ٦ در هزار هیچ گونه تلفاتی نداشته ولی در تیمارهای١٢ و ١٨ در هزار میزان بقاء به ترتیب ٧٧ و ٦٠ درصد بود. به دنبال انتقال گونه مذکور به سطوح مختلف شوری تغییری در الگوی پراکنش سلولهای کلراید ایجاد نشد و سلولهای کلراید بر روی لاملا، پایه و بین لاملا پراکنش داشتند. در مطالعه بافت شناسی، برخی تغییرات ریخت شناسی خاص از جمله پیوستگی لاملا در نتیجه انتقال به شوری در ماهیان هیبرید مشاهده گردید. نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان داد، که بیشترین تعداد سلولهای کلراید لاملایی و بین لاملایی در تیمار ١٨ در هزار وجود دارد. تغییرات بیان ژن زیر واحد α_{1b} آنزیم Na^+-K^+-ATPase در ماهیان هیبرید روند منظمی را نشان نداد. با توجه به نتایج تحقیق به نظر می رسد ماهیان هیبرید توانایی لازم در مقابله با شوری و سازگاری با آن را ندارند.

واژه های کلیدی: هیبریداسیون، تریپلوئیدی، سلولهای کلراید، بیان ژن، ایمونوهیستوشیمی ، ماهی آزاد دریای خزر، ماهی قزل آلای رنگین کمان

*نویسنده مسئول، تلفن: ٠٩١١٢٢٠٤٣٣٦ پست الکترونیکی: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، یکی از ماهیان سردآبی می‌باشد که به منظور توسعه فعالیتهای شیلاتی و آبزی‌پروری به بسیاری از مناطق جهان، از جمله ایران معرفی شده است (٣). دو واریته اصلی از آن بنامهای قزل‌آلای مهاجر یا پولادسر (Steel head) و قزل‌آلای ساکن در آب شیرین (Kamloops) در آبهای مناطق وسیعی از جهان پراکنده هستند (٤٧) واریته آب شیرین در مقایسه با قزل‌آلای پولادسر از رشد کمتری خصوصاً در آبهای شور و لب شور برخوردار است و به ندرت به وزن حدود ٤/٥ کیلوگرم و یا بیشتر می رسد، در حالی‌که قزل‌آلای پولادسر پس از طی یک دوره سه ساله تغذیه در آب دریا عموما در اوزان ١٠-٧ کیلوگرم قابل برداشت خواهد بود (٤٧). ماهی آزاد دریای خزر*Salmo trutta caspius* که همانند سایر زیرگونه‌های قزل‌آلای قهوه‌ای از رشد نسبتاً کندی در

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه با قزل آلای رنگین کمان در مرحله پرورش در آب شیرین برخوردار است، با این وجود، همانند برخی دیگر از زیر گونه‌های مهاجر قزل‌آلای قهوه‌ای نظیر قزل آلای دریایی، دارای قابلیت رشد بسیار شگرفی در آبهای شور و لب شور می باشد؛ بنحوی که گزارشهایی از صید ماهیان حدود ۳۰ کیلوگرمی نیز وجود دارد.

تولید تریپلوییدی، هیبرید تریپلوییدی و ذخایر تک جنسی آزاد ماهیان در پرورش اقتصادی آنها بسیار مؤثر است. تریپلوئیدهای عقیم و هیبرید های تریپلوییدی، به ویژه ماده ها به بلوغ جنسی آناتومیک و فیزیولوژیک نمی رسند و لذا واجد رشد بیشتری خواهند گردید (٤). آمیخته گری یکی از تکنیکهای مهندسی ژنتیک می باشد که در آبزی پروری مورد استفاده قرار می گیرد و هدف از آن عمدتاً تولید نتاجی است که به طور کلی از مزیت بیشتری در مقایسه با انواع والد تحت شرایط خاص پرورشی برخوردار باشند (٤). مطالعات مختلف نشان داد، که القای تریپلوئیدی در آمیخته‌های بین گونه‌ای آزادماهیان، منجر به افزایش بازماندگی آنها تا حد قبولی می‌گردد (٤٦)دراین حالت، اطمینان کافی از عقیم بودن بچه ماهیان تولیدی به واسطه اثر متقابل آمیخته‌گری و تریپلوئیدی نیز وجود خواهد داشت (۱۹) همچنین، در مطالعات انجام شده توسط محققان، به اثر شوری بر روی نرخ رشد ماهیان اشاره شده است(۲۰،۱۱، ۲۹، ۳٦، ۵۲) از آنجا که تغییرات شوری از عوامل مهم تأثیر گذار بر بقاء، متابولیسم و پراکنش آبزیان می باشد، بنابراین بقای جانور در مراحل مختلف زندگی بستگی به توانایی تنظیم اسمزی آن آبزی دارد تا بدین وسیله بتواند بر استرس شوری غلبه کرده و به زندگی خود ادامه دهد. در شوری بیشتر از شوری ایزواسمتیک و در آب دریا ماهی با ورود دائمی یونها به بدن خود و از دست دادن آب به طریق اسمزی مواجه است بنابراین، این ماهیان با نوشیدن آب دریا با مشکل کم آبی مبارزه کرده و در عوض با مشکل تراکم یون مواجه می شود. برای حل این مشکل مکانیسمهای انتقال فعال در سلولهای کلراید آبشش، NaCl را به خارج دفع می کند و کلیه $So4^{-2}$ و Mg^{+2} و دیگر یونهای دو ظرفیتی را به خارج دفع می کند (۵). سلولهای کلراید، سلولهای انتقال دهنده یون در آبشش ماهیان هستند که نقش مهمی را در نگهداری توازن یونی بدن ایفاء می کنند (٤۲ و ٥٦) نقش این سلولها از جذب یون تا ترشح یون با توجه به شوری محیط تغییر می کند (۲٦). این سلولها سلولهایی بزرگ، تخم مرغی شکل، دارای حفره راسی بوده و غنی از میتوکندری می باشند (۲۱، ۲۷، ۲۸، ۵۰ و ۵۱). حرکات یونی در این سلولها به کمک آنزیمهای مختلفی انجام می شود که مهمترین آنها، آنزیم Na^{+}-K^{+}-ATPase می باشد (۵۵). Na^{+}-K^{+}-ATPase هترودایمری از اعضای خانواده ژنهای ATPase نوع p است که دو زیر واحد α و β دارد، این زیر واحد ها با یکدیگر برای پمپ فعال پتاسیم به داخل و سدیم به خارج سلول خلاف جهت شیب غلظت فعالیت می کنند (۲٤،۲۲،۱۳،۸) . در سال ۲۰۰۵ Mackie و همکاران (۳۵) با مطالعه خانواده های ماهی آزاد اقیانوس اطلس دریافتند که بیان mRNA زیر واحد α_{1b} پس از انتقال مستقیم به آب دریا افزایش یافت و این در حالی بود که بیان mRNA زیر واحد α_{1a} کاهش داشت. در تحقیق انجام شده توسط Bystriansky و همکاران (۲۰۰٦) بیان mRNA در ایزوفرمهای زیر واحد α (α_{1a} و α_{1b}) ژن Na^{+}-K^{+}-ATPase در سه گونه از آزاد ماهیان در طول سازگاری با آب شور مورد بررسی قرار گرفت. در هر سه گونه سطوح mRNA برای ایزوفرم های α_{1a} بلا فاصله بعد از انتقال به آب شور کاهش یافت در حالی که α_{1b} به طور معنی داری افزایش یافت (۷). در سال ۲۰۰٦، Singer و همکاران طی تحقیقی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را به طور تدریجی در معرض شوریهای ۱۱ در هزار به مدت ۱ روز، ۱۷ در هزار به مدت ۲ روز و در شوری ۲۳ در هزار به مدت ۲ روز قرار دادند، پس از یک دوره ۵ روزه زیر واحد Na^{+}-K^{+}-ATPase α آبشش یک افزایش موقتی در هنگام رویارویی با شوری نشان داد (٤۸).

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به بحث لزوم معرفی گونه های جدید به صنعت آبزی پروری ایران و تولید ماهیان هیبرید تریپلوئید (۱) در کشور و این موضوع که القای تریپلوئیدی و شوری هر دو عامل مؤثری جهت رشد ماهی به شمار می روند و از سوی دیگر ماهی آزاد دریای خزر، گونه ارزنده بومی از رشد کمی برخوردار است، در این تحقیق تلاش گردید تا با سازگار کردن ماهیان مورد مطالعه به شوریهای متفاوت و بررسی اثر توأم شوری و تریپلوئیدی از طریق بررسی تغییرات سلولهای کلراید و بیان ژن Na^+-K^+-ATPase گامی مؤثر در جهت امکان سنجی بهبود وضعیت اقتصادی و پرورشی این آبزی برداشته شود.

مواد و روشها

تهیه و سازگاری ماهیان مورد مطالعه: ماهیان مورد آزمایش شامل نسل تریپلوئید حاصل از آمیزش ماهی آزاد دریای خزر و قزل آلای رنگین کمان (با میانگین وزنی ۱۰/٦۳گرم) از کارگاه شهید باهنر کلاردشت (۱) با استفاده از کیسه های پلاستیکی شامل ۳۰ درصد آب ۷۰ درصد اکسیژن با تراکم ۳۰ عدد ماهی در هر کیسه به آزمایشگاه ماهیان سردابی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل و به مدت ۱٤روز در آب شیرین آداپته شدند. سپس برای هر تیمار تعداد ۳۰ عدد ماهی (۳ تکرار ۱۰ عددی) پس از بیومتری به تانک های ۱۰۰ لیتری حاوی آب با شوری های ٦، ۱۲ و ۱۸ در هزار و آب شیرین بعنوان شاهد منتقل شدند. شوری ها به طور مصنوعی مطابق ترکیب نمک دریای خزر ساخته شد (۲). غذادهی با استفاده از پلت های غذایی شرکت چینه و میزان تعویض روزانه آب ۲۰ درصد در نظر گرفته شد.

شرایط محیط آزمایش: طی دوره آزمایش، دوره نوری به صورت ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، میانگین pH، ۷/۸، میانگین میزان اکسیژن برابر ۸/۵ mg/L و محدوده دمایی ۱۱/٦–۱۰ درجه سانتی گراد بوده است.

جدول۱– ترادف پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

Target Sequence	Forward primer 5′-3′	Reverse primer 5′-3′	Gene Bank Acc. number
O.mykiss Na^+,K^+-ATPase α_{1b}	CTGCTACATCTCAACCAACAACATT Tm:67/8º GC : 40 %	ACCATCACAGTGTTCATTGGAT Tm: 66/8º GC: 43/5 %	AY319390
Salmo salar EF1α	GAGAACCATTGAGAAGTTCGAGAAG Tm:68/3º GC: 42/9 %	GCACCCAGGCATACTTGAAAG Tm: 67/1º GC: 53/2 %	AF321836

جدول۲– نتایج سنجش اسمولالیته در ماهیان مورد مطالعه و آب محیط آزمایش(mOsm/L)

	آب شیرین	آب ٦ppt	آب ۱۲ ppt	آب ۱۸ppt
اسمولالیته آب(mOsm/L)	۱۲	۱۹۵	۳٤۰	۳٤۹
اسمولالیته پلاسما در ماهیان هیبرید(mOsm/L)	298 d	۳۱۲c	329 b	۳۳۲a

www.SID.ir

Archive of SID

پس از طی دوره ده روزه آزمایش، ماهیان پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (۱۵۰ mg/L)، وزن کشی شده، طول کل، چگالی و استاندارد آنها اندازه گیری شد و در ادامه سریعاً از آنها خون گیری به عمل آمد، مقداری از خون به دست آمده برای سنجش اسمولالیته مورد استفاده قرار گرفت و همچنین جهت تعیین پلوییدی از آنها گسترش خونی تهیه شد. سپس آبشش آنها به منظور انجام آزمایشات بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی در محلول بوئن و جهت انجام آزمایشات مربوط به بیان ژن آنزیم Na^+-K^+-ATPase سریعاً در ازت مایع فیکس شد. نمونه ها بعد از فیکس شدن در محلول بوئن جهت آبگیری و نگهداری در اتانل ۷۰ درصد قرارداده شدند. پس از آن مراحل آب گیری نمونه ها، نگهداری در پارافین مایع و قالب گیری انجام شد و سپس با استفاده از میکروتوم برشهای ۳ میکرومتری از آنها تهیه گردید. برشها بر روی لامهای آلبومینه شده چسبانده شده، در آون با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شدند. برای مطالعه بافت شناسی نمونه ها بعد از پارافین زدایی و آب گیری با استفاده از هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری معمولی مطالعه و عکس برداری شدند (۲۷،۲۸،۳۸).

سنجش اسمولالیته: برای اندازه گیری فشار اسمزی از دستگاه اتوماتیک اسمومتر (osmometer) (مدل۱۳، Nr,9610003 co. Germany)، استفاده گردید. بدین ترتیب که با استفاده از میکروسمپلر نمونه های پلاسمای حاصل از خون ماهیان مورد آزمایش به میزان حداقل ۱۰۰ میکرولیتر جدا شده و به تیوپ های ۱.۵ سی سی انتقال داده شد و فشار اسمزی (mOsmol/L) اندازه گیری شد. قبل از اندازه گیری ، ابتدا دستگاه با آب مقطر روی عدد صفر و با محلول نمکی مخصوص روی عدد ۳۰۰ کالیبره شد. این دستگاه بر اساس نقطه انجماد عمل می کند.

جدول۳- نتایج بررسی سلولهای کلراید واقع در رو و پایه لاملای آبششی ماهیان هیبرید تریپلوئید *Oncorhynchus mykiss*♀ × *Salmo* ♂(*trutta caspius*) در سطوح مختلف شوری. اعداد ارائه شده بر اساس میانگین ± خطای استاندارد می باشند.

فاکتور های مورد سنجش	آب شیرین	آب۶‰	آب۱۲‰	آب۱۸‰
میانگین مساحت سطح مقطع برش خورده لاملا (μm^2) N= 150	۲٤٥/۳ ±۲٤/۲ a	۱٤٦/٥ ± ٥/۲۹ c	۱۷۹/٤ ±۱۲ /۸ b	۲۰۸/۹ ±۱۸/۳ ab
میانگین مساحت سطح مقطع برش خورده سلولهای کلراید روی لاملا (μm^2) N= 150	۳٥/۲ ±۲/۲ a	۳۳/۹۱ ±۱/۷ a	۳٦ ±۲/٤ a	۳۷/٦٤ ±۲/۹ a
میانگین مساحت سطح مقطع برش خورده سلولهای کلراید بین لاملایی (μm^2) N=150	٤۹/۳ ± ۲/۷ a	۳٥ ±۱/٤ c	٤۲/۳ ±۲/٥۲ b	۳۸/۹٥ ±۳/۳٤ bc
میانگین تعداد سلولهای کلراید لاملایی N= 150	٤/۱ ±۰/۳٤ a	۲ ±۰/۲۲ b	۱/۲٦ ±۰/۲۲ c	۳/٥۲ ±۰/۲۷ a
میانگین تعداد سلولهای کلراید بین و پایه لاملا N=150	۲/۳ ±۰/۱۱ c	۳/٤۷ ±۰/۱٦ A	۲/٦۹ ±۰/۱۳ b	۳/۳۹ ±۰/۱۳ a

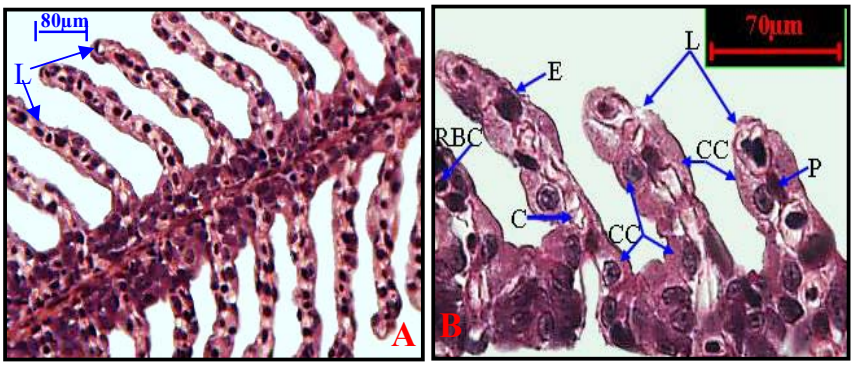
جدول٤- میزان بیان ژن زیر واحد α_{1b} آنزیم Na^+-K^+-ATPase نسبت به ژن کنترل داخلی EF1α در ماهی هیبریدتریپلوئید

گونه ماهی	آب شیرین	آب۶ ‰	آب ۱۲ ‰	آب۱۸ ‰
ماهی هیبریدتریپلوئید	٤/٥٤±۰/۲۳ bc	۳/٦۹±۰/۰٦ a	٤/۹۱±۰/۱۲ c	٤/۳٦±۰/۱٥ ab

www.SID.ir

Archive of SID

ایمونوهیستوشیمی: مشابه روش کار بافت شناسی از بافتها برش گیری شد ولی به منظور مطالعات ایمونوهیستوشیمی برشها بر روی لامهای پلی ال- لایزینه (Poly-L-Lysine) قرار گرفتند. لامها سپس توسط گزیلن پارافین زدایی شده و سپس توسط سری افزایشی الکل اتانول ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰) آب گیری شدند. پس از آن در محلول PBS (Phosphate Buffer Saline) به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شده سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول PBS+ NaCl+ Tween20 و نیز به مدت ۲۰ دقیقه در محلول PBS+ Regiler قرار داده شده و سپس دو مرتبه هر بار به مدت ۳ دقیقه در محلول PBS شستشو داده شدند. سپس محلول آنتی کور I (IgGα5) رقیق شده با محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) به صورت ۵۰۰ میکرولیتر آنتی کور I + ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) برای ۱۰ لام، هر لام ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. لامها سپس در محفظه مرطوب به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از آن لامها دو مرتبه هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط محلول PBS شستشو داده شدند. پس از آن توسط محلول آنتی کور I (FITC) رقیق شده با محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) به صورت ۷ میکرو لیتر آنتی کور II + ۹۹۳ میکرولیتر محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده)، برای ۱۰ لام، به هر لام ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. لامها سپس به مدت ۱ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد و در محفظه مرطوب نگهداری شدند. در نهایت پس از شستشوی لامها در محلول PBS دو مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه، لامها توسط چسب Mount Aqueous (Sigma) مونتاژ شده و توسط میکروسکوپ نوری فلورسنت Leica مورد مطالعه قرار گرفتند. لازم به ذکر است که یک سری از لامها که به عنوان لامهای شاهد انتخاب شدند به جای آنتی کور اول، محلول ۱۰برابر رقیق شده PBS+Regiler اضافه گردید (۳۲، ۲۹).



شکل ۱ – تصویر بافت شناسی از بافت آبشش ماهیان هیبرید تریپلوئید

B: تصویر یک فیلامنت شامل تعداد زیادی تیغه های ریز آبششی که به دو طرف آن چسبیده است (بزرگ نمایی ٤۰۰ A: تصویری با بزرگ نمایی1000 از یک لاملای آبششی، سلولهای کلراید، سنگفرشی، پیلار، خونی و مویرگ در تصویر نشان داده شده اند.اختصارات: RBC : گلبول قرمز، C: مویرگ ، : Pسلول پیلار، CC: سلول کلراید، E: بافت پوششی، F: فیلامنت، L : لاملا)

نمونه برداری جهت مطالعات مولکولی: تعداد ٦ عدد ماهی از هر تیمار (۲عدد ماهی از هر تکرار) برای انجام آزمایشات مولکولی ابتدا بیومتری شدند و پس از خون گیری از ماهیها، از آبشش آنها نمونه برداری شد. پس از نمونه برداری، نمونه های بافت آبشش آنها (کل آبشش) جهت جلوگیری از تجزیه RNA به سرعت در ازت مایع فیکس شد. RNA ی کل موجود در نمونه ها با استفاده از کیت کیاژن (Qiagene) استخراج شده و پس از بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

کمی و کیفی RNA ی استخراج شده با استفاده از ژل آگارز وUV اسپکتروفتومتری، توسط DNase تیمار شده و جهت ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. جهت ساختcDNA از کیت سیناژن استفاده گردید. PCR به صورت نیمه کمی (Semi Quantitative) انجام شد (۳۵). در این تحقیق، ژن EF1α به عنوان کنترل داخلی انتخاب شدند. ژن مورد بررسی، زیر واحد α_{1b} ژن آنزیم Na^{+}-K^{+} ATPase می باشد که توالی mRNAی این ژن در ماهی قزل آلای رنگین کمان *O.mykiss* در سایت اینترنتی ncbi ثبت گردیده است (٤۳) (جدول۱).

تجزیه و تحلیل آماری: داده ها با استفاده از نرم افزار سنجش آماری Spss (ver. 11/5) مقایسه و تحلیل آماری شد. ابتدا داده ها مورد سنجش تست نرمالیتی قرار گرفت. سپس داده های نرمال به وسیله آزمون One Way ANOVA در سطح اطمینان ۹۵ درصد و زیر واحد های مربوطه مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت. در مورد داده های غیر نرمال داده ها ابتدا توسط Kruskalvalis بررسی وجود یا عدم وجود تفاوت معنی دار انجام گرفت، سپس به منظور شناسایی این تفاوت از آزمون Mann whitny U استفاده گردید. سپس آزمونهای مربوط به چهار تیمار بیان ژن از طریق آزمون ANOVA مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

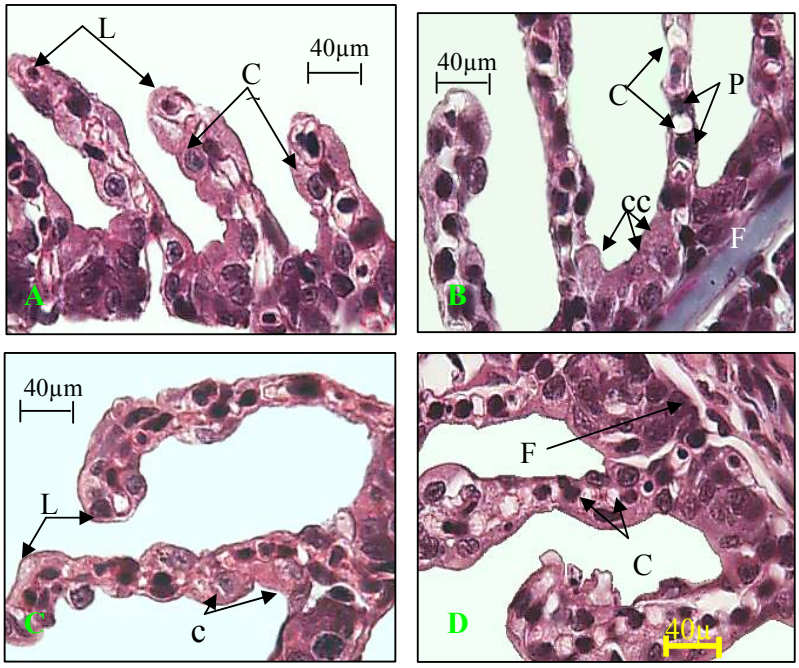
نرخ بقای ماهیان مورد مطالعه: ماهیان مورد مطالعه به مدت ١٤ روز با آب شیرین محیط آزمایش سازگار شدند و طی این مدت هیچ گونه تلفاتی در آنها مشاهده نشد، اما طی یک هفته نگهداری در آب شور تلفاتی به میزان ۲۳ درصد در تیمار۱۲ در هزار و ٤٠ درصد درتیمار ۱۸ در هزار مشاهده شد. ماهیان تیمارهای ۱۲ و ۱۸‰ عمدتاً در کف تانک بی حرکت می ماندند و علائم حیاتی بسیار ضعیفی داشته و تنها با خارج کردن آنها از تانک حرکت مختصری نشان می دادند، و گاهی در آنها حرکات چرخشی شدید نیز دیده شد.

سنجش اسمولالیته پلاسمای خون: نتایج سنجش اسمولالیته در جدول۲ آورده شده است. نتایج مذکور مؤید افزایش میزان اسمولالیتی آب از ۱۲ تا ۳٤٠ میلی اسمول در لیتر بود همچنین اسمولالیته پلاسمای ماهیان در تمام سطوح مورد آزمایش اختلاف معنی داری با یکدیگر نشان دادند.

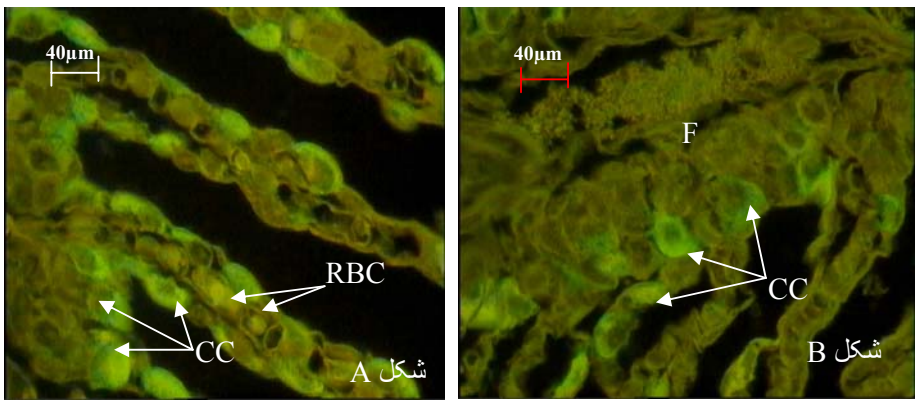
مطالعات بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی: نتایج مطالعات بافت شناسی نشان داد که در برش طولی هر رشته، یک محور مرکزی شامل رگهای خونی و همچنین دو ردیف لاملا مشاهده می شود (شکل۱A). تعداد زیادی سلولهای خونی در داخل رگها مشاهده می شوند. در قسمت داخلی کمان آبششی خار آبششی قرار گرفته است که کوتاه می باشند. رشته های آبششی توسط بافت پوششی ، پوشانده شده اند که بافت پوششی متشکل از سلولهای سنگ فرشی ، سلولهای پیلار و سلولهای کلراید می باشد (شکل 1B). سلولهای سنگ فرشی بیشترین تعداد سلول را در بافت پوششی به خود اختصاص می دهند، سلولهای پیلار کانالهای خونی را از هم جدا می کند در روش ایمونوهیستوشیمی، آنتی بادی $IgG\alpha_5$ با اتصال به آنزیم Na^{+}-K^{+}-ATPase و به واسطه داشتن خاصیت فلئورسانس موجب گردید تا سلولهای کلراید مورد مطالعه به سهولت مشاهده و از سلولهای دیگر (به ویژه سلولهای خونی که به رنگ زرد مشاهده می شوند) تفکیک گردند (شکلهای ۳A، ۳B). در این تحقیق سلولهای کلراید در روی لاملا و همچنین در منطقه بین و پایه لاملا مشاهده شدند. سلولهای کلراید اغلب به صورت چند تایی در پایه لاملا و معمولاً به صورت منفرد بر روی لاملا مشاهده شدند(شکلهای ۲A، ۲B، ۲C، ۲D). نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمی در جدول ۳ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- بافت آبشش هیبرید تریپلوئید ماهی آزاد دریای خزر و قزل آلای رنگین کمان در سطوح مختلف شوری (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین). بافت آبشش هیبرید تریپلوئید ماهی آزاد دریای خزر و قزل آلای رنگین کمان قرار گرفته در آب شیرین (A)، آب٦ در هزار (B)، آب۱۲ در هزار (C)، آب۱۸ در هزار (D) اختصارات: RBC : گلبول قرمز، C: مویرگ، P : سلول پیلار، CC: سلول کلراید، F : فیلامنت، L : لاملا



شکل۳ – تصویر ایمونوهیستوشیمی ازآبشش ماهی هیبرید تریپلوئید

شکل A: تصویر ایمونوهیستوشیمی از آبشش ماهی هیبرید تریپلوئید قرار گرفته در آب شیرین، بزرگ نمایی ٤۰۰.شکل B : تصویر ایمونوهیستوشیمی از آبشش ماهی هیبرید تریپلوئید قرار گرفته در آب ۱۸‰. CC: سلولهای کلراید، RBC: گلبولهای قرمز، F : فیلامنت.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی تغییرات بیان ژن زیر واحد α_{1b} آنزیم Na^+-K^+-ATPase: برآورد میزان نسبی بیان ژن زیر واحد α_{1b} آنزیم Na^+-K^+-ATPase (NKA) (نسبت به بیان ژن EF-1α) (شکل ٤) نشان داد که بیشترین میزان میانگین سطوح mRNAی آنزیم NKA در ماهیان تیمار ۱۲ در هزار وجود داشت. البته بیان ژن ماهیان تیمار ۱۲ در هزار نسبت به آب شیرین افزایش معنی دار نداشت (P>0/05). ماهیان تیمار ۱۸ در هزار با عدم تفاوت معنی داری نسبت به تیمار شاهد در رتبه سوم از نظر میزان نسبی بیان ژن NKA قرار داشتند. بررسی نسبی بیان ژن زیر واحد α_{1b} آنزیم NKA در تیمار ٦ در هزار در مقایسه با ماهیان تیمار آب شیرین نشان داد که تفاوت آماری بین ماهیان تیمار ٦ در هزار و آب شیرین در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار بود (P<0/05) (**جدول ٤**).

بحث

تحمل شوری گونه های مورد مطالعه: القاء تریپلوییدی در ماهیان به واسطه ایجاد تغییرات کروموزومی و همچنین تغییرات سلولی منجر به بروز پاره ای تغییرات فیزیولوژیکی می گردد. عملکرد ماهیان تریپلویید در مقابله با تغییرات محیطی متفاوت گزارش گردیده است. به عنوان مثال اظهار می شود که مرگ و میر ماهیان تریپلوئید در شرایط زیر حد نرمال مانند کاهش اکسیژن یا دمای بالا افزایش می یابد (۹، ۲۳، ٤۱). از سوی دیگر Taylor وهمکاران (۲۰۰۷) اظهار می نمایند که مقاومت ماهیان قزل آلای تریپلویید در انتقال به آب دریا در مقایسه با ماهیان دیپلویید یکسان بوده است (٤۹). در خصوص انتقال گونه مذکور به آب ٦ در هزار هیچ تلفاتی مشاهده نشد اما در انتقال به آب ۱۲ و ۱۸ در هزار بترتیب ۲۳ و ٤۰ درصد تلفات وجود داشت. در مورد عدم مقاومت ، می توان اظهار نمود که احتمالا ماهیان هیبرید تولید شده به لحاظ فیزیولوژیکی مقاومت خوبی در سازگاری به شوری نداشته و همچنین به واسطه القاء تریپلوئیدی در گونه مذکور، این عامل تشدید گردیده و منجر به عدم مقاومت شده باشد.

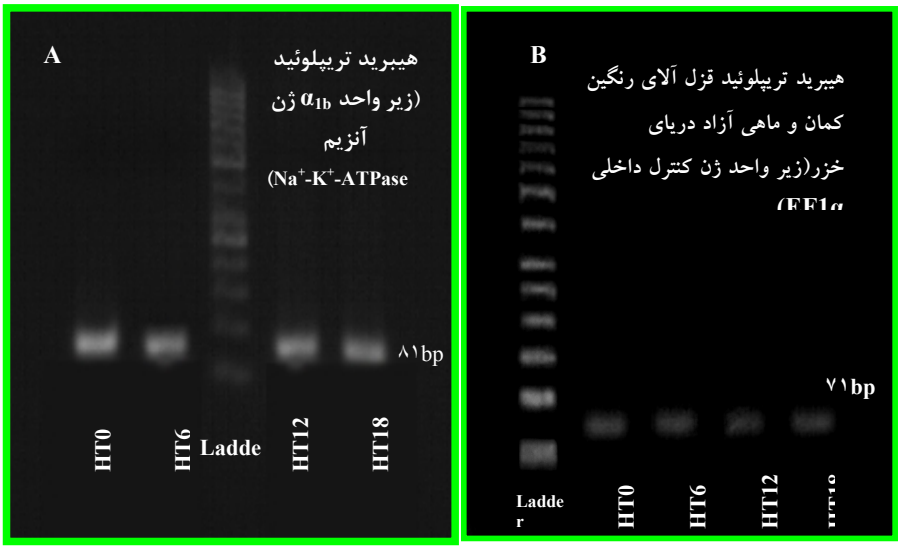
بررسی تغییرات بیان ژن زیر واحد α_{1b} آنزیم Na^+-K^+-ATPase: مطالعات Madsen و همکاران در سال ۱۹۹۵ بر روی قزل آلای قهوه ای نشان داد که سطوح ایزوفرمهای زیر واحد α, ژن Na^+-K^+-ATPase آبشش در اثر انتقال به شوری دچار تغییر می شود (۳۳). در تحقیقی که توسط (Mackie و همکاران، ۲۰۰۵) بر روی چندین خانواده از آزاد ماهیان انجام شد مشاهده گردید که میزان بیان ژن α_{1b} Na^+-K^+-ATPase آبششی در تیمار شوری بیش از تیمار آب شیرین بوده است و این روند افزایشی طی ۳۰ روز دوره آزمایش مشاهده شده است (۳۵). بیشتر مطالعاتی که در مورد سازگاری آزادماهیان آنادروم به آب شور بحث کرده اند، یک افزایش در فعالیت Na^+-K^+-ATPase آبششی را گزارش کردند (۱٤، ۱۵، ۳۷) که نشان دهنده سازگاری موفقیت آمیز آنها می باشد.

در سال ۲۰۰۳، Richard و همکاران بیان کردند در ماهی قزل آلای رنگین کمان در اثر انتقال به آب با شوری ۲۸ در هزار طی یک دوره ۳۰ روزه افزایش درزیر واحد α_{1b} آنزیم Na^+-K^+-ATPase نسبت به آب شیرین مشاهده گردید اما انتقال به شوری ٤۰ در هزار در ۵ روز اول پس از انتقال هیچ تأثیری بر روی بیان این زیر واحد نداشت (٤۳). در هیبریدها مشاهده شد که بیان ژن زیر واحد α_{1b} آنزیم Na^+-K^+-ATPase آبششی روند منظمی را طی نکرده، و ماهیان تیمار آب۱۲ در هزار بیشترین میزان بیان ژن زیر واحد α_{1b} را از خود نشان دادند. در حالی که در تیمار ٦ در هزار علی رغم افزایش میزان شوری یک روند کاهشی در میزان بیان ژن زیر واحد α_{1b} مشاهده می شود. احتمال می رود ماهیان تیمار ٦ در هزار با توجه به نیازشان در روزهای قبل از نمونه برداری میزان تولید زیر واحد α_{1b} خود را افزایش داده و اقدام به تولید آنزیم مربوطه کرده اند و بقای ۱۰۰ درصد ماهیان هیبرید تیمار ٦‰ می تواند

www.SID.ir

Archive of SID

تأیید کننده این امر باشد چنانچه در مطالعه Bystriansky و همکاران (٢٠٠٦)، ماهیان Archtic char در ١ روز پس از انتقال به شوری، ماهیان قزل آلای رنگین کمان ٢ روز پس از انتقال به شوری و آزاد اطلس ٤ روز پس از انتقال به شوری میزان بیان ایزوفرم α_{1b} را افزایش دادند (٧) . در تیمار ١٢ در هزار نیز این روند نرخ افزایشی داشت که با توجه به مشاهده تلفات ٢٣ درصدی در تیمار ١٢ در هزار شاید این افزایش اندکی دور از انتظار به نظر می رسید. با توجه به اینکه نمونه برداری در این تحقیق از ماهیانی بود که تا پایان دوره زنده مانده بودند و تمام ماهیان باقی مانده تیمار ١٢ در هزار وضعیت ظاهری خوبی داشتند به نظر می رسد که این بخش از ماهیهای باقیمانده توانسته بودند این توانایی را در خود ایجاد کرده و با این شوری خود را سازگار کنند. افزایش مشاهده شده در زیر واحد α_{1b} مشابه با سایر مطالعات است که در آن سطوح زیر واحد α Na^+-K^+-ATPase در شوری افزایش یافته است و در ماهی آزاد اطلس (٤٨، ١٠) و در قزل آلای قهوه ای (٥٣، ٣٤) نیز مشاهده شده است.



شکل ٤ – باندهای حاصل از واکنش PCR نیمه کمی نمونه های تیمارهای مختلف شوری در هیبرید تریپلوئید ماهی آزاد دریای خزر نر و قزل آلای رنگین کمان ماده.(A) باندهای قطعه تکثیر شده از زیر واحد α_{1b} ژن آنزیم Na^+-K^+-ATPase در تیمارهای مختلف شوری آب. (B): باندهای قطعه تکثیر شده از ژن کنترل داخلی EF1α

در تیمار ١٨ در هزار انتظار می رفت با افزایش شوری بیان ژن زیر واحد Na^+-K^+-ATPase α_{1b} آبششی افزایش یابد از سوی دیگر در این تحقیق با وجود ٤٠ درصد تلفات در هیبریدهای تیمار ١٨ در هزار، بقیه نمونه های باقی مانده از نظر ظاهری کاملاً بیمار به نظر می رسیدند، بنابراین می توان یکی از این عوامل عدم سازگاری با آب شور را عدم افزایش بیان ژن دانست از سوی دیگر تغییرات در مورفولوژی آبشش در طول انتقال به آب شور ممکن است الگوی بیان ژن Na^+-K^+-ATPase را تحت تأثیر قرار دهد. آبشش ماهی متشکل از سلولهای مختلفی است مانند سلولهای سنگفرشی و سلولهای غنی از میتوکندری (سلولهای کلراید)، که اخیراً دو گروه مشخص از سلولهای کلراید شناسایی شده اند (١٨، ١٦، ١٧) و شواهد مشخصی وجود دارد که این گروه سلولهای کلراید ممکن است در نقل و انتقال یون نقشهای متفاوتی داشته باشند و تغییراتی همچون ازدیاد سلولها در طول انتقال به شوری عامل

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات بیان ژن Na^+-K^+-ATPase باشد (۷). در سال۲۰۰۷ Taylor و همکاران در بررسی مقاومت قزل آلاهای تریپلوئید و دیپلوئید در انتقال مستقیم به سطوح شوری به این نتیجه دست یافتند که ماهیان قزل آلای رنگین کمان صرف نظر از پلوئیدی آن قادرند با آب شور (۳۵ در هزار) طی یک هفته سازگار شوند. آنها اثر پلی پلوئیدی را بر تنظیم اسمزی، استرس و پاسخهای ایمنی در قزل آلای بدون مهاجرت در طول سازگاری به آب شور مورد آزمایش قرار دادند. آنها قزل آلای دیپلوئید و تریپلوئید را مستقیماً به آب شور ۳۵ در هزار و بالعکس به آب شیرین منتقل کردند. میزان مرگ و میر کمتر از ۵ درصد بود. افزایش معنی دار در اسمولالیته پلاسما و فعالیت Na^+-K^+-ATPase آبشش مشاهده شد (۵۱).

بررسی پراکنش و تعداد سلولهای کلراید در بافت آبششی ماهیان تیمارهای مختلف: استفاده از آنتی کور IgGα جهت مکان یابی آنزیم Na^+-K^+-ATPase و در واقع سلولهای کلراید در بسیاری از آبزیان از جمله سخت پوستان (۲۷ ،۲۸ ،۲۹ ،۳۹) ، ماهی گوپی(۲۸) ، سالمون چام (۲۷)خامه ماهی (۲۵)،قزل آلای رنگین کمان (۵۵)، باس دریایی (۳۹، ٤٤) به عنوان روشی موفق گزارش شده است . نتایج تحقیق حاضر روی آبشش ماهیان هیبرید نیز نشان داد که این آنتی بادی باآنزیم Na^+-K^+-ATPase ایمونوفلوئورسانس قابل ملاحظه ای تولید کرده و قادر به شناسایی محل حضور آنزیم و به عبارتی محل حضور سلولهای یونوسیت می باشد.

سلولهای ایمونوفلورسنت در گونه مورد مطالعه هم بر روی لاملا و هم در منطقه بین و پایه لاملا پراکنش داشتند. بررسی روی ماهیان مختلف بیانگر آن است که سلولهای کلراید معمولاً روی لبه آوران رشته ها و در ناحیه قاعده لاملا فراوان ترند و روی بافت پوششی لاملا یافت نمی شوند (۱۲). در سال ۱۹۹٦،Witters و همکاران نشان دادند که در ماهی قزل آلای رنگین کمان، سلولهای کلراید به طور کلی در ناحیه بین لاملای آبششی قرار گرفته اند (۵۷). در ماهیان استنوهالین آب شیرین و در ماهی یوری هالین سازگار داده شده به آب شیرین حضور سلولهای یونوسیت روی تیغه های آبششی نیز گزارش شده است (۵۵، ٤۵). در بسیاری از ماهیان وجود سلولهای کلراید لاملایی در مواجهه با استرسهای مزمن گزارش شده است (۳۰، ۳۱) اما در مطالعه حاضر مشاهده سلولهای کلراید در تمامی تیمارها روی تیغه های آبششی به نقش تنظیم یونی این سلولها در محیطهای هیپو و هایپراسموتیک اشاره می کند.

افزایش تعداد سلولهای کلراید در محیط آب شیرین و همچنین آب ۱۸ در هزار به این علت می باشد که ماهی از محیط ایزواسمتیک فاصله گرفته، بنا بر این نیازش به تنظیم اسمزی افزایش می یابد و سلولهای کلراید خود را افزایش می دهند، در مطالعه Varsamose و همکاران در سال ۲۰۰۲ مشاهده شد که انتقال باس دریایی به آب شیرین یا به آب با شوری دو برابر آب دریا با افزایش تعداد سلولهای کلراید همراه بوده است. چنین افزایشی در بسیاری از گونه های یوری هالین از آب شیرین به آب شور رخ داده است(۵۵). تعداد سلولهای کلراید بین لاملایی نیز بیشترین تعداد را در تیمار ٦ و ۱۸ در هزار نشان داد و کمترین تعداد در تیمار آب شیرین مشاهده شد و مؤید این امر است که سلولهای کلراید بین لاملایی در قیاس با لاملایی در محیط آب شیرین نقش کمتری دارند (٥٤). در تیمار ۱۸ در هزار علی رغم اینکه بیشترین تعداد سلولهای کلراید لاملایی را دارند و همچنین سلولهای کلراید از مساحت سطح مقطعی بالایی برخوردارند اما مرگ ومیر در آنها نیز وجود دارد. با توجه به اینکه لاملاها مکانهایی برای تبادل اکسیژن و دی اکسیدکربن می باشند، ازدیاد سلولهای کلراید لاملایی ، منجر به کاهش نقش لاملا برای تنفس می شود و این امر مشابه حالتی است که در باس دریایی و در قزل آلای رنگین کمان مشاهده شده است (٤۰، ٦). در واقع انتقال یون و گاز به یکدیگر وابسته

www.SID.ir

Archive of SID

اند. ازدیاد سلولهای کلراید لاملایی ، مسیر های ارتباطی خون و آب را ضخیم تر می کند از این رو اثر منفی بر روی انتقال گاز های تنفسی دارد (٤٢). مبحث قابل توجه دیگر این است که شاید هیبرید ها در شوری بالا علی رغم افزایش تعداد و اندازه سلولهای کلراید، میزان آنزیمشان کم باشد و باعث کاهش توانایی تنظیم اسمزی آنها شود. نتایج تحقیق Shikano و Fujio در سال ۱۹۹۸ بر روی ماهی گوپی نشان داده است که در دوره سازگاری این ماهی به آب دریا و آب شیرین، نه تنها تعداد و اندازه سلولهای یونوسیت بلکه میزان حضور آنزیم در آبشش ماهی نیز برای عملکرد تنظیم یونی Na^+K^+-ATPase ضروری است (٤٩). به هر حال تکمیل مطالعه حاضر از طریق مطالعه بیان ژن آنزیم NKCC و همچنین بررسی بدشکلیهای احتمالی آبشش آنها از طریق مطالعه فراساختار ماهیان ، دلایل عدم توانایی این گونه در سازگاری به شوریهای بالارا بهتر قابل قضاوت می نماید.

در مجموع می توان اظهار نمود که ماهیان هیبرید توانایی لازم در مقابله با شوری و سازگاری با آن را نداشته چرا که این ماهیان هم در شوری ۱۲ در هزار و هم در شوری ۱۸ در هزار تلفات قابل توجهی داشتند. اما با توجه به تحقیقاتی که در زمینه توانایی رشد بیشتر این ماهیان نسبت به ماهی آزاد دریای خزر به عمل آمده است (درافشان, ۱۳۸۵), در صورتی که تولید انبوه آنها مد نظر قرار گیرد بهتر است در آب شیرین پرورش داده شوند و یا بر روی انتقال تدریجی یا پله ای آنها از آب شیرین به آب شور مطالعات تکمیلی به عمل آید(۱).

تشکر و قدردانی: از آزمایشگاه بیولوژی و شیلات دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس و همچنین آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی و دانشگاه تربیت مدرس، از مدیریت و پرسنل مرکز تکثیر ماهی آزاد شهید باهنر کلاردشت و همچنین از سرکار خانم دکتر رجب زاده و همچنین آقایان مهندس پریان و نادری به خاطر کمکهای بسیار سودمندشان تشکر وقدردانی می گردد.

منابع

۱- درافشان، س.، ۱۳۸۵. دستکاریهای کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* جهت پرورش نسل F1. رساله دکتری شیلات. دانشگاه تربیت مدرس.

۲- کاظمی، ر.، بهمنی، م.، ۱۳۷۷. گزارش سالیانه انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری. بخش فیزیولوژی و بیوشیمی.

۳- ۱۳۷۸.، ماهیان آبهای داخلی ایران. انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش ایران. عبدلی، ع. ا.، ۳۷۸ ص

4- Bartley, D.M., Rana, K., A.J. Immink., 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. Rev. Fish Biol. Fisher. 10: 325-337.

5- Beyenbach, K. B., 2004. Kidneys sans glumeruli. AJP -Renal, 286: 81- 827.

6- Bindon, S. D., Gilmour, K. M., Fenwick, J. C., Perry, S. F., 1994. The effect of brancial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol. 197: 47-63.

7- Bystriansky, J. S., Richards, J. G., Schulte, P. M., Ballantyne, J. S., 2006. Reciprocal expression of gill Na^+-K^+-ATPase α subunit isoforms α_{1a} and α_{1b} during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance. J. Exp. Biol. 209: 1848-1858.

8- Chow, D. C., Forte, J. G., 1995. Functional significance of the b-subunit for heterodimeric P-type ATPase. J. Exp. Biol. 198: 1–17

9- Cotter, D., O'Donovon, V., O'Maoileidigh, N., Rogan, G., Roche, N., Wilkins, N. P., 2000. An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon *(Salmo salar*) in minimizing the impact of escaped farmed salmon on wild populations. Aquaculture, 186- 61–75.

10- D'Cotta, H., Valotaire, C., Le Gac, F. and Prunet, P., 2000. Synthesis of gill Na^+-K^+-ATPase in Atlantic salmon smolts- differences in mRNA and protein levels. *Am. J. Physiol*. 278- 101-110.

www.SID.ir

Archive of SID

11- Dendrinos, P., Thorpe, J.P., 1985. Effects of reduced salinity on growth and body composition in the European bass *Dicentrarchus labrax* L. Aquaculture. 49, 333–358.

12- Evans, D. H., Piermarini, P. M. Choe, K. P., 2005. The Multifunctional Fish Dominant Gill-Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation and Excretion of Nitrogenous Waste. Physiol. Rev., 85- 97-177.

13- Ewart, H. S., Klip, A., 1995. Hormonal regulation of the $Na^{+}K^{+}$-ATPase- mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. Am. J. Physiol. 269- 295–311.

14- Finstad, B., Fleming, I. A., Mckinley, R. S., 2002. Sea water tolerance and gene expression in two strains of Atlantic Salmon smolts. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59- 125–135.

15- Folmar, L. C., Dickhoff, W. W., 1979. Plasma thyroxin and gill Na^{+}-K^{+}-ATPase changes during seawater acclimation of Coho salmon, *oncorhynchus kisutch*. Comp. Biochem. Physiol. 63A, 329-332.

16- Galvez, F., Reid, S. D., Hawkings, G., Goss, G. G., 2002. Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. Am. J. Physiol. 282-658-668.

17- Goss, G., Perry, S. Laurent, P. 1995. Ultra structural and morphometric studies on ion and acid- base transport processes in freshwater fish. in- Wood and Shuttleworth, eds. Cellular and molecular approaches to fish ions regulation. Academic Press, 257-284.

18- Goss, G. G., Adamia, S., Galvaz, F., 2001. Peanut lectin binds to a subpopulation of mitochondria-rich cells in the rainbow trout gill epithelium. Am,. J. Physiol. 281- 1718-1725.

19- Gray, A. K., Evans, M. A., G. H. Thorgaard., 1993. Viability and development of diploid and triploid salmonid hybrids. Aquaculture 112-125-142.

20- Gaumet, F., Boeuf, G., Severe, A., Le Roux, A., Mayer-Gostan, N., 1995. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. J. Fish Biol. 47- 865–876.

21- Guner, Y., Ozdem, O., Cagirang, H., Altunk, M., Kizak, V., 2005. Effects of salinity on the osmoregulatory functions of the gills in Nile Tilapia *(Oreochromis niloticus)*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 29- 1259-1266.

22- Horisberger, J. D., Lemas, V., Kraehenbuhl, J. P., Rossier, B. C., 1991. Structure-function relationship of $Na^{+}K^{+}$-ATPase. Ann. Rev. Physiol. 53- 565–584.

23- Hyndman, C. A., Kieffer, J. D., Benfey, T. J., 2003. Physiology and survival of triploid brook trout following exhaustive exercise in warm water. Aquaculture, 221, 629–643.

24- Jaunin, P., Jaisser, F., Beggah, A.T., Takyasu, K., Mangeat, P., Rossier,. C., Horisberger, J. D. Geering, K., 1993. Role of the transmembrane and extracytoplasmic domain of β subunits in subunit assembly, intracellular transport and functional expression of Na^{+},K^{+}-pumps. J. Cell. Biol. 123- 1751–1759.

25- Karnaky, K. J., Kinter, L. B., Kinter, W.B., Stirling, C. E., 1976. Teleost chloride cell. II. Autoradiographic localization of gill Na^{+},K^{+}-ATPase in Killfish *Fundulus heteroclitus*. J. Cell. Biol. 70- 157-177

26- Katoh, F., Kaneko, T., 2003. Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established 'time-differential double fluorescent staining' technique. J. Exp. Biol 206- 4113–4123.

27- Khodabandeh, S., Kutnik, M., Aujoulat, F., Charmatier, G., CharmantierDauky, M., 2005a. Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). lmmunolocalization of $Na^{+}K^{+}$-ATPase. Cell. Tissue. Res. 319- 153-16.

28- Khodabandeh, S., Charmantier, G., Blasco, c., Grousset, E., CharmantierDauky, M., 2005b. Ontogeny of the antennal glands in the cray fish Astacus leptodactylus (Crustacea. Decapoda)-Anatomical and cell differentiation. Cell Tissue Res, 319- 153-165.

29- Khodabandeh, S. 2006. Na^{+},K^{+}-ATPase in the gut of the Zygoptera lschnura elegans and Anisoptcra Libel/*lila Lydia* larvae (Odonata)-activity and immunocytochemical localization. J. Zoot. Studies. 45- 53-63.

30- Kuwaye, T. T., Okimoto, D. K., Shimoda, S. K., Howerton, R. D., Lin, H. R., Pang, P. K.T., Grau, E. G., 1993. Effect of 17α-methyltestosterone on the growth of the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, in fresh water and sea water. Aquaculture. 113, 137–152.

www.SID.ir

Archive of SID

31- Laurent, P., Perry, S. F., 1991- Environmental effects on fish gill morphology. Physiol. Zool. 64- 4-25

32- Lignot, J. H., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., 2001. Immunolocalization of Na^+,K^+-ATPase in the organs of the branchial cavity of the European Lobster *fJomarus gammarus* (Crustacea,

33- Madsen, S. S., Jensen, M. K., Nohr, J., Kristiansen, K., 1995. Expression of Na^+-K^+-ATPase in the brown trout *Salmo trutta*- in vivo modulation by hormones and seawater. *Am. J. Physiol.*269- 1339- 1345.

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

35- Mackie, P., Wright, P. A., Globe, B. D., Ballantyne, J. S., 2005. Osmoregulation and gene expression of Na^+-K^+-ATPase in families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. Can.J. Fish. Aqua. Sci. 62- 2661-2672.

36- McKay, L.R., Gjerde, B., 1985. The effect of salinity on growth of rainbow trout. Aquaculture. 49- 325–331.

37- McCormick, S. D., Saunders, R. L., 1987. Preparatory physiological adaptations for marine life in salmonids- Osmoregulation, growth and metabolism. Am. Fish. Soc. Symp. 1- 211–229.

38 - Mortoja, R., Mortoja-Pierson, M., 1967. Initiation aux techniques de I histologe animale. Masson et Cie, Paris, 345.

38- Nebel, C., NegreSadargues, G., Blasco, C., Chamantier, G., 2005. Morphofunctional ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Anat Embryol., 209- 193-206

39- Nenel, C., Romestand, B., Negro-Sadargues, G., Grousset, E., Aujoulat , F., Bacal, J., Bonhomme, F., Charmantier, G., 2005. Sifferential fresh water adaptation in juvenile sea-bass *Dicentrachus labrax*- involvement of gills and urinary system. J. Exp. Biol. 208- 3859-3871.

40- Ojolick, E. J., Cusack, R., Benfey, T. J., Kerr, S. R., 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. Aquaculture, 131, 177–187.

41- Perry, S. F., 1998. The chloride cell- structure and function in the gills of freshwater fishes. Annu. Rev. Physiol. 59, 325–347.

42- Richards, J. G., Semple, J. W., Bystriansky, J. S., Schulte, P. M., 2003. Na^+/K^+-ATPase alphaisoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. J. Exp. Biol. 206, 4475- 4486.

43- Roche, H., Chaar, K., Pe´re`s, G., 1989. The effect of a gradual decrease in salinity on the significant constituents of tissue in the sea bass *Dicentrarchus labrax* Pisces. Comp. Biochem. Physiol. 93A, 785–789.

44- Sakamoto, T., Uchida, K., Yokota, S., 2001. Regulation of the iontransporting mitochondrion rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. Zool. Sci. 18- 1163–1174.

45- Scheerer, P.D., G.H. Thorgaard., 1983. Increased survival in salmonid hybrids by induced triploidy. Can. J. Fish. Aquatic Sci. 40- 2040-2044.

46- Sedgwick, S.D., 1995. Trout farming handbook. Oxford, Fishing News Books/Blackwell Science, 164 p. 6th ed.

47- Singer, T. D., Raptis, S., Sathiyaa, R., Nichols, J. W., Playle, R. C., Vijayan, M. M., 2006. Tissue-specific modulation of glucocorticoid receptor expression in response to salinity acclimation in rainbow trout. Com. Bioche. . Physiol. Part B, 146- 271–278.

48- Shikano, T. and Fujio, Y., 1998a. Immunolocalization of Na^+/K^+-ATPase and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation in a euryhaline teleost, *Poecilia reticulata.J. Exp. Zool.* 281- 80 -89.

49- Shikano,T., Fujio, Y., 1998b. Relationships of salinity tolerance to immunolocalization of Na^+,K^+-ATPase in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation of the guppy, *Poecilia reticulate*. Zool. Sci. 15- 35-41

50- Taylor, J. F., Needham, M. P., North, B. P., Morgan, A., Thompson, K., Migaud, H., 2007. The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout, General. Comp. Endocrin. 152- 314–325.

51- Teskerezic, E., Teskerezic, Z., Tomec, M., Modrusan, Z., 1989. A comparison of growth performance of rainbow trout *Salmo gairdneri*.in fresh and brackish water in Yugoslavia. Aquaculture. 77-1–10.

52- Tipsmark, C. K., Madsen, S. S., Seidelin, M., Christensen, A. S., Cutler, C. P., Cramb, G., 2002. Dynamics of Na^+,K^+,$2Cl^-$ cotransporter

www.SID.ir

Archive of SID

and Na^+,K^+-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout and Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Exp Zool , 293- 106-118.

53- Uchida, K., Kaneko, T., Yamauchi, K., Hirano, T., 1996. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na^+,K^+-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. J Exp, Zool. 276- 193-200.

54- Varsamos, S., Diaz,,T. P., Charmantier, G., Flik, G., Blasco, C., Connes, R., 2002. Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to fresh water, seawater, and doubly concentrated seawater. J. Exp. Zool , 293- 12-26.

55- Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. Physiol.Rev. 77 - 591–625.

56- Witters, H., Berckmans, P., Vangenechten, C., 1996. Immunolocalization of Na^+-K^+-ATPase in the gill epithelium of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. Cell Tissue RES. 283-461-468.

The Study of Salinity Tolerance in Triploid Hybrid Fish (*Oncorhynchus mykiss*♀ × *Salmo trutta caspius*♂) In Direct Transferring to Different Salinity Level

Rahimi Kh.[1], Kalbassi M.R.[1], Khodabandeh S.[2], Frozandeh M.[3] and Soltankarimi S.[1]

[1] Fisheries Dept., Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of IRAN

[2] Marine Biology Dept., Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of IRAN

3 Biotechnology Dept., Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Adaptation of triploid hybrid fish (*Oncorhynchus mykiss* ♀ × *Salmo trutta caspius* ♂) studied in direct transportation to 6,12 and 18 ppt (salinity according to Caspian sea salinity). Osmolality of blood plasma, distribution and number of chloride cells as well as gene expression of Na^+-K^+-ATPase α_{1b} subunit has studied by osmometry, histology, imunohistochemistry and gene expression methods. 10 days after transition to different salinity levels no mortality was seen in 6 ppt, but in 12 ppt and 18 ppt survival rat was 77% and 60% respectively After fish transferring Chloride cell distribution pattern did not change and Chloride cells were distributed on filaments, between lamella and on lamella in all treatments. In histology studies some morphological changes such as lamella connection has seen. Immunohistochemistry studies showed that maximum number of lamellar and inter lamellar chloride cell are in 18 ppt. changes of Na^+-K^+-ATPase α_{1b} subunit gene expression didn't show regular trend. According to results seems that triploid hybrid fish don't have necessary ability for salinity tolerance.

Keywords: gene expression, imunohistochemistry, hybridizing, chloride cell, *Salmo trutta caspius*

www.SID.ir