

## مطالعه برخی پارامترهای تنظیم اسمزی در ماهیان قزل آلائی رنگین کمان تریپلوئید *Oncorhynchus mykiss* در سازگاری با سطوح متفاوت شوری آب

ساحل سلطان کریمی<sup>۱</sup>، محمدرضا کلباسی\*<sup>۲</sup>، صابر خدابنده<sup>۳</sup>، مهدی فروزنده<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۴- استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پذیرش: ۹۳/۷/۱۰

دریافت: ۹۳/۶/۳۰

\*نویسنده مسئول مقاله: [Kalbassi\\_m@modares.ac.ir](mailto:Kalbassi_m@modares.ac.ir)

### چکیده:

تغییرات مورفولوژی سلول‌های کلراید و بیان ژن زیرواحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  قزل‌آلائی تریپلوئید *Oncorhynchus mykiss* (میانگین وزن ۷۰/۶ گرم)، در انتقال مستقیم به شوری‌های ۶، ۱۲ و ۱۸ ppt مورد بررسی قرار گرفتند. تغییرات در فراوانی، الگوی پراکنش و سطح مقطع برش خورده سلول‌های کلراید آبتشش با استفاده از تکنیک بافت‌شناسی کلاسیک و مکان‌یابی  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  آبتشش با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی و استفاده از آنتی‌بادی  $\text{IgG}\alpha_5$  انجام شد. بیان ژن زیرواحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  با استفاده از تکنیک بیان ژن نیمه‌کمی مورد سنجش قرار گرفت. میزان بقا در طی دوره ۱۰ روزه آزمایش در تمام تیمارها صد درصد بود و ماهیان منتقل شده به سطوح مختلف شوری اسمولالیتیه پلاسما را در سطوح استاندارد حفظ کردند. الگوی پراکنش سلول‌های کلراید در تمام تیمارها مشابه و بر روی لاملا، پایه و بین لاملا بوده است. نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان دادند که بیشترین تعداد سلول‌های کلراید لاملائی و بین لاملائی در تیمار ۱۸ ppt وجود دارند. بیشترین مساحت سطح مقطع برش خورده سلول‌های کلراید در آب شیرین مشاهده شد. تغییرات بیان ژن زیرواحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  با افزایش شوری، روند افزایشی نشان داد. با توجه به نتایج تحقیق به‌نظر می‌رسد ماهی قزل‌آلائی تریپلوئید به‌خوبی خود را با شوری‌های اعمال شده در محیط آزمایش سازگار کرده و توانایی لازم در مقابله با شوری‌های بررسی شده را دارند و به‌نظر گونه مناسبی جهت پرورش در آب‌های لب‌شور می‌باشند.

**کلید واژگان:** تریپلوئیدی، سلول‌های کلراید، بیان ژن نیمه‌کمی، ایمونوهیستوشیمی، ماهی قزل‌آلائی رنگین‌کمان

$Mg^{+2}$  و دیگر یون‌های دو ظرفیتی را به خارج دفع می‌کند (Bartley et al., 2001).

اندام‌های تنظیم اسمزی شامل آبشش، روده و کلیه در ماهیان استخوانی یوری هالین در نگهداری هموستازی بدن نقش دارند و با توجه به شوری محیطی نقش‌های مختلفی دارند (Marshall, 2002). در میان این اندام‌ها آبشش‌ها مهمترین اندام خارجی برای تنظیم اسمزی در ماهی‌ها می‌باشند. در اپیتلیوم آبششی سلول‌های غنی از میتوکندری (سلول‌های کلراید) وجود دارند که از مکان‌های اصلی برای تبادل یون می‌باشند که در ماهی‌های سازگار شده با آب دریا ترشح یون و در ماهی‌های سازگار شده با آب شیرین کار جذب یون و توازن اسید و باز را به عهده دارند (Evans 1975).

سلول‌های کلراید، سلول‌های انتقال دهنده یون در آبشش ماهیان استخوانی هستند که نقش مهمی را در نگهداری توازن یونی بدن جانوران ایفا می‌کنند (Nebel و همکاران ۲۰۰۵، Varsamose و همکاران ۲۰۰۲) نقش این سلول‌ها از جذب یون تا ترشح یون با توجه به شوری محیط تغییر می‌کند (Katoh و همکاران، ۲۰۰۳). این سلول‌ها، سلول‌هایی بزرگ، تخم مرغی شکل، دارای حفره راسی بوده و غنی از میتوکندری می‌باشند (Evans و همکاران ۲۰۰۵، Kaneko و Katoh 2003، Khodabandeh و همکاران ۲۰۰۵، Seidlin، 1968 Rao، ۲۰۰۵ و همکاران ۲۰۰۰). حرکات یونی در این سلول‌ها به کمک آنزیم‌های مختلفی انجام می‌شود که مهمترین آن‌ها، آنزیم  $Na^{+}-K^{+}-ATPase$  می‌باشد (Uchida ۱۹۹۶).  $Na^{+}-K^{+}-ATPase$  هتروداایمری از اعضای خانواده ژن‌های  $ATPase$  نوع p است که دارای زیر واحدهای  $\alpha$  و  $\beta$  می‌باشد، زیر واحد  $\alpha$  و زیر واحدهای آن برای پمپ فعال پتاسیم به داخل و سدیم به خارج سلول خلاف جهت شیب غلظت فعالیت می‌کنند

مقدمه:

قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، یکی از ماهیان سردآبی می‌باشد که به منظور توسعه فعالیت‌های شیلاتی و آبی‌پروری به بسیاری از مناطق جهان، از جمله ایران معرفی شده است (Abdoli, 2000).

تولید موجودات تریپلوئید به‌ویژه در صنعت آبی‌پروری رو به افزایش است. ماهیان تریپلوئید به دلیل داشتن سه دسته کروموزوم عقیم می‌باشند. عقیم شدن از طریق تریپلوئیدی به دلیل جلوگیری از اثرات نامطلوب هورمونهای جنسی در زمان بلوغ بر روی کیفیت گوشت و همچنین جلوگیری از کاهش رشد، در آبی‌پروری بسیار مد نظر قرار می‌گیرند. از سوی دیگر قزل‌آلای رنگین‌کمان در آب‌های لب شور از رشد بیشتری در قیاس با آب شیرین برخوردار خواهد بود (Kalbassi et al., 2009).

ماهیان، قدیمی‌ترین و متنوع‌ترین گروه مهره‌داران هستند (Beyenbach 2004). مکانیسم‌های تنظیم اسمزی-یونی در ماهیان به طور چشم‌گیری رشد نموده و به آن‌ها امکان سکونت و بقا در آشیان‌های اکولوژیک، بالقوه بسیاری از آب‌های سرد و یخ زده دریاها و قطبی گرفته تا دریاچه‌های قلیایی استوا را داده است (Evans ۱۹۹۳). 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 کم‌آبی مبارزه کرده و در عوض با مشکل تراکم یون مواجه می‌شوند. برای حل این مشکل مکانیسم‌های انتقال فعال در سلول‌های کلراید آبشش،  $NaCl$  را به خارج دفع می‌کنند، کلیه نیز  $So4^{-2}$  و

درصد وزن بدن به طور روزانه و میزان تعویض روزانه آب ۲۰٪ در نظر گرفته شد.

#### شرایط محیط آزمایش:

طی دوره آزمایش، دوره نوری بصورت ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، میانگین pH ۷/۸، میانگین میزان اکسیژن محلول در آب برابر ۸/۵ mg/l و محدوده دمایی ۱۱/۶-۱۰°C بوده است.

پس از طی دوره ده روزه آزمایش، ماهیان پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (۱۵۰ mg/l)، وزن کشی شده، طول کل، چنگالی و استاندارد آن‌ها نیز اندازه‌گیری شد و در ادامه سریعاً جهت تعیین میزان پلوئیدی از آن‌ها خون‌گیری بعمل آمد و گسترش خونی تهیه گردید. سپس آبشش آن‌ها بمنظور انجام آزمایشات بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی در محلول بوئن و جهت انجام آزمایشات مربوط به بیان ژن آنزیم  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  سریعاً در ازت مایع فیکس شد. نمونه‌ها بعد از فیکس شدن در محلول بوئن جهت آبگیری و نگهداری در الکل اتانل ۷۰ درصد قرارداد شدند.

#### سنجش فشار اسمزی پلاسما:

برای اندازه‌گیری فشار اسمزی پلاسما از دستگاه اتوماتیک اسمومتر (مدل ۱۳، ۹۶۱۰۰۳، Nr. Germany, co) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما به تیوپ‌های ۱.۵ سی سی منتقل شد و سپس فشار اسمزی پلاسما (mosmol/L) توسط دستگاه اندازه‌گیری شد. قبل از اندازه‌گیری دستگاه با آب مقطر روی عدد صفر و با محلول نمکی مخصوص روی عدد ۳۰۰ کالیبره شد. دستگاه فوق بر اساس نقطه انجماد عمل نموده و هسته‌گذاری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود.

#### مطالعات بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی:

مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها جهت بافت‌شناسی کلاسیک طبق روش خدابنده و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. نمونه‌ها

(Chow و Forte، ۱۹۹۵، Evart و Klip، ۱۹۹۵، Gaunet و همکاران، ۱۹۹۵، Hyndman و همکاران، ۲۰۰۳). با توجه به بحث لزوم معرفی گونه‌های جدید به صنعت آبی‌پروری در کشور، کمبود منابع آب شیرین و همچنین لزوم توجه به عواملی از قبیل القای تریپلوئیدی و پرورش آبزیان در آبهای شور که عواملی موثر در جهت افزایش رشد ماهی به شمار می‌روند، در این تحقیق با سازگار نمودن گونه مورد مطالعه به شوری‌های متفاوت و بررسی اثر توام شوری و تریپلوئیدی از طریق بررسی تغییرات سلول‌های کلراید و بیان ژن  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  امکان بهبود وضعیت اقتصادی و پرورشی این آبی‌مورد ارزیابی قرار گرفت.

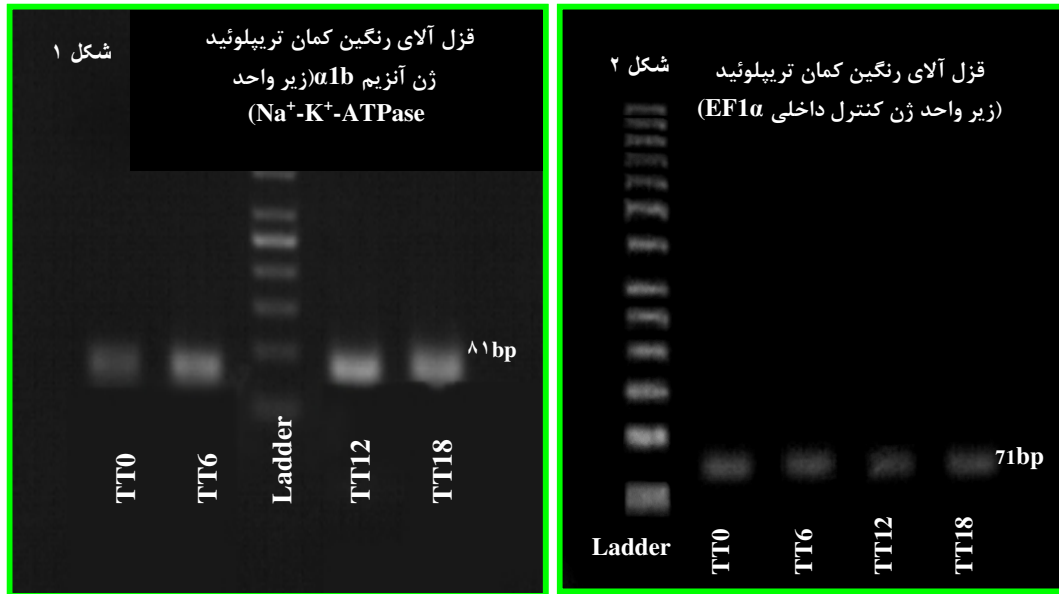
#### مواد و روش کار:

##### تهیه و سازگاری ماهیان مورد مطالعه:

ماهیان مورد آزمایش شامل قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوئید (با میانگین وزنی ۷۰/۶ گرم) از کارگاه شهید باهنر کلاردشت (دراشان، ۲۰۰۸) با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی ۳۰ لیتری شامل ۳۰ درصد آب ۷۰ درصد اکسیژن با تراکم ۱۵ عدد ماهی در هر کیسه به آزمایشگاه ماهیان سردآبی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل و بمدت ۱۴ روز در آب شیرین به شرایط آزمایشگاهی آداپت شدند. سپس برای هر تیمار تعداد ۳۰ عدد ماهی (۳ تکرار ۱۰ عددی) پس از بیومتری به تانک‌های ۱۰۰ لیتری حاوی آب با شوری‌های ۶، ۱۲ و ۱۸ در هزار و آب شیرین بعنوان شاهد منتقل شدند. شوری‌ها بطور مصنوعی مطابق ترکیب نمک دریای خزر ساخته شدند (Kazemi and Bahmani, 1999). غذادهی با استفاده از پلت‌های غذایی شرکت چینه در مدت دوره آزمایش و به میزان ۲

از ژل آگارز و UV اسپکتروفتومتری، توسط DNase تیمار شده و جهت ساخت cDNA مورد استفاده قرار ایمنو هیستوشیمی طبق روش khodabande و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد.

با میکروسکوپ نوری معمولی مطالعه و عکس برداری شدند. برای ایمنو هیستوشیمی مشابه روش کار بافت شناسی از بافت‌ها برش گیری شد اما برش‌ها بروی لام‌های پلی‌ال- لایزین (Poly-L-Lysine) قرار گرفتند. مطالعات



شکل ۱ باندهای حاصل از واکنش PCR نیمه کمی نمونه‌های تیمارهای مختلف شوری در قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوئید.

شکل ۲ باندهای قطعه تکثیر شده از زیر واحد  $\alpha_{1b}$  ژن آنزیم  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  در تیمارهای مختلف شوری آب..

گرفتند. جهت ساخت cDNA از کیت سیناژن استفاده گردید. PCR به صورت نیمه کمی (Semi Quantitative) انجام شد (Lin و همکاران، ۲۰۰۴). در این تحقیق، ژن  $\text{EF1}\alpha$  بعنوان کنترل داخلی انتخاب شدند. ژن مورد بررسی، زیر واحد  $\alpha_{1b}$  ژن آنزیم  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  می باشد که توالی RNA این ژن در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان *O. mykiss* در سایت NCBI ثبت گردیده است (جدول ۱) (Perry ۱۹۷۷).

نمونه برداری جهت مطالعات مولکولی:

تعداد ۶ عدد ماهی از هر تیمار (۲ عدد 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، نمونه‌های بافت آبشش آن‌ها (کل آبشش) جهت جلوگیری از تجزیه RNA بسرعت در ازت مایع فیکس شدند. RNA کل موجود در نمونه‌ها با استفاده از کیت کیاژن (Qiagen) استخراج شده و پس از بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده با استفاده

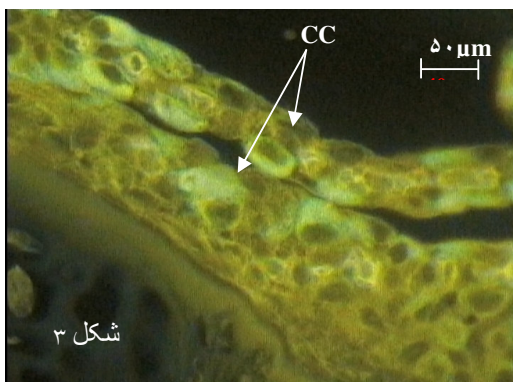
## نتایج:

### نرخ بقای ماهیان مورد مطالعه:

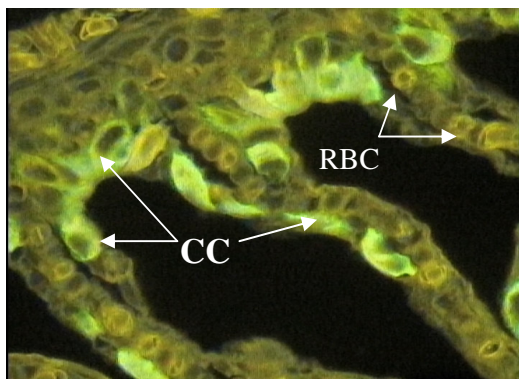
ماهیان قزل آلالی تریپلوئید در تمام تیمارها طی دوره ۱۴ روزه آداپته شد. با آب شیرین و همچنین دوره ۱۰ روزه انجام آزمایش هیچ گونه تلفاتی در آنها مشاهده نشد.

### مطالعات بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی:

نتایج مطالعات بافت شناسی نشان داد که در گونه مورد مطالعه، در هر سمت حفره دهانی ۴ جفت کمان آبششی قرار گرفته است، بر روی هر کمان آبششی، دو ردیف رشته ظریف آبششی قرار دارد و بر روی هر رشته آبششی تعدادی صفحات ظریف بنام تیغه‌های آبششی قرار دارد که عمود بر رشته‌های آبشش قرار دارند. در قسمت انتهایی رشته‌های آبشش لاملا مشاهده نمی شوند. در برش طولی هر رشته، یک محور مرکزی شامل رگ‌های خونی و همچنین دو ردیف لاملا مشاهده می شود (شکل ۴). تعداد زیادی سلولهای خونی در داخل رگ‌ها مشاهده می شوند. در قسمت داخلی کمان آبششی خار آبششی قرار گرفته که کوتاه می باشند. رشته‌های آبششی توسط بافت پوششی، پوشانده شده اند که بافت پوششی متشکل از سلولهای سنگ فرشی<sup>۱</sup>، سلولهای پیلار<sup>۲</sup> و سلولهای کلراید می باشد (شکل‌های ۵ و ۶). سلول‌های سنگفرشی بیشترین تعداد سلول را در بافت پوششی بخود اختصاص می دهند، سلول‌های پیلار کانال‌های خونی را از هم جدا می کنند.

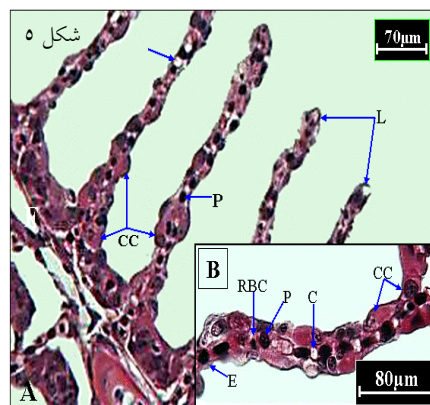
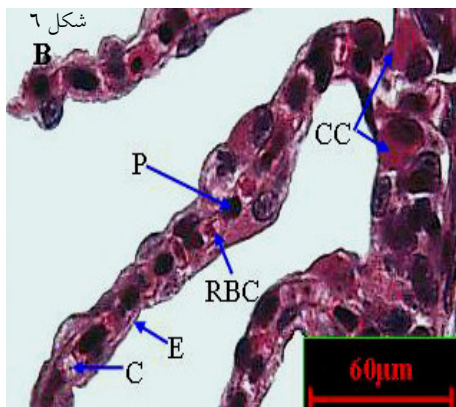


شکل ۳ تصویر ایمونوهیستوشیمی از آبشش ماهی قزل آلالی تریپلوئید قرار گرفته در آب شیرین. سلول های کلراید بر روی لاملا و فیلامنت قابل مشاهده می باشند.



شکل ۴ تصویری با بزرگنمایی ۴۰۰ از بافت آبشش ماهی قزل آلالی تریپلوئید قرار گرفته در شوری ppt ۱۸. سلول های کلراید در تصویر نشان داده شده اند. CC: سلول های کلراید، RBC: گلبول های قرمز، F: فیلامنت، L: لاملا

1. Pavment Cell  
2. Pillar Cell



شکل ۵: تصویری از بافت آبشش ماهی قزل آلی رنگین کمان تریپلوئید قرار گرفته در آب ۶٪ (بزرگنمایی ۴۰۰). B: قسمتی از لاملای آبشش ماهی قزل آلی رنگین کمان تریپلوئید قرار گرفته در آب ۶٪ (بزرگنمایی ۱۰۰۰). شکل ۶: تصویری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ از لاملای آبشش قزل آلی رنگین کمان تریپلوئید قرار گرفته در آب ۱۲٪، سلول های کلراید، سنگفرشی، پیلار، خونی و مویرگ در تصویر نشان داده شده اند.

اختصارات: RBC : گلبول قرمز، C: مویرگ، P: سلول پیلار، CC: سلول کلراید، E: بافت پوششی، F: فیلامنت، L: لاملا

شدند. سلولهای کلراید اغلب بصورت چند تایی در پایه لاملا و معمولا بصورت منفرد بر روی لاملا مشاهده شدند (شکل های ۳ و ۴) همچنین در بافت آبشش ماهیان تیمار ۱۸ در هزار پارگی لاملا مشاهده گردید (شکل ۳). اندازه و نحوه پراکنش سلول های کلراید با توجه به نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمی در جدول شماره ۱ آورده شده است.

در روش ایمونوهیستوشیمی، آنتی بادی  $IgG\alpha_5$  با اتصال به آنزیم  $Na^+-K^+-ATPase$  و بواسطه داشتن خاصیت فلئورسانس موجب گردید تا سلولهای کلراید مورد مطالعه بسهولت مشاهده و از سلولهای دیگر (بویژه سلولهای خونی که به رنگ زرد مشاهده می شوند) تفکیک گردند (شکل های ۳ و ۴) در این تحقیق سلولهای کلراید در روی لاملا و همچنین در منطقه بین و پایه لاملا مشاهده

جدول ۱ تغییرات سلول های کلراید واقع در رو و پایه لاملای آبششی ماهیان قزل آلی تریپلوئید در سطوح مختلف شوری، (Mean±SD). حروف متفاوت بیانگر معنی دار بودن و اختلاف میانگین ها است.

آب شیرین	آب ۶٪	آب ۱۲٪	آب ۱۸٪	شاخص های مورد سنجش
$a41/7 \pm 3/70.5$	$a38/6 \pm 1/9$	$b30/7 \pm 2/3$	$a36/6 \pm 3/2$	میانگین مساحت سطح مقطع برش خورده سلول های کلراید لاملا $N=150 (\mu m^2)$
$a38/91 \pm 2/0.1$	$ab36/5 \pm 2/8$	$b32/8 \pm 1/8$	$b34/2 \pm 2/3$	میانگین مساحت سطح مقطع برش خورده سلول های کلراید بین لاملا $N=150 (\mu m^2)$
$b5/47 \pm 0/3$	$a5/65 \pm 0/33$	$c3/69 \pm 0/15$	$a5/65 \pm 0/27$	میانگین تعداد سلول های کلراید روی لاملا $N=150$
$c2/69 \pm 0/11$	$a3/78 \pm 0/17$	$b3/13 \pm 0/13$	$a4/17 \pm 0/14$	میانگین تعداد سلول های کلراید بین و پایه لاملا $N=150$

نتایج مطالعات سنجش اسمزی: مطالعه و آب محیط آزمایش در جدول شماره ۲ آورده شده است. نتایج سنجش اسمولالیته پلاسمای خون ماهی‌های مورد

جدول ۲ تغییرات اسمولالیته پلاسمای خون ماهی قزل آلی رنگین کمان تریپلوئید در سطوح مختلف شوری آب.

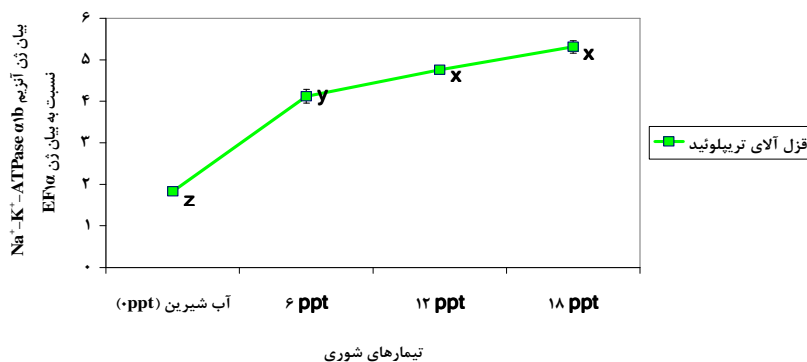
18 ppt	12 ppt	6 ppt	آب شیرین	میزان اسمولالیته (mOsm/L)
۳۵۰	۳۴۲	۱۹۵	۱۲	آب
۳۴۷	۳۳۳	۳۱۵	۲۹۰	پلاسمای خون قزل آلی تریپلوئید

ژن زیر واحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم NKA در گروه شاهد به طور معنی داری کمتر از دیگر تیمارهای شوری است ( $P < 0/001$ ). پس از گروه شاهد میانگین میزان نسبی بیان ژن زیر واحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم NKA به ترتیب در تیمارهای ۶، ۱۲ و ۱۸ ppt افزایش یافت (نمودار ۱) (تصویر 1A-1B).

بررسی تغییرات بیان ژن زیر واحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

برآورد میزان نسبی بیان ژن زیر واحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  (نسبت به بیان ژن EF-1 $\alpha$ ) در ماهیان قزل آلی تریپلوئید نشان داد که میانگین میزان نسبی بیان

قزل آلی تریپلوئید



نمودار ۱ - مقایسه میزان بیان ژن زیر واحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  نسبت به ژن کنترل داخلی EF1 $\alpha$  در ماهی قزل آلی رنگین کمان تریپلوئید قرار گرفته در سطوح مختلف شوری

## بحث

اگرچه القای تریپلوئیدی در ماهیان باعث کاهش عملکرد دستگاه ایمنی می شود (Cotter و همکاران ۲۰۰۰، Hulata ۲۰۰۱) هیچ تاثیری بر روی توانایی تحمل به شوری نداشته و ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید در انتقال مستقیم به شوری از مقاومت یکسانی برخوردارند (Dumas و همکاران ۱۹۹۵، Taylor و همکاران ۲۰۰۷). در تحقیق حاضر نیز انتقال ماهیان قزل‌آلای تریپلوئید به شوری‌های مختلف بازماندگی صد در صد داشته و هیچ گونه تلفاتی را به همراه نداشته است (Singer و همکاران ۲۰۰۶، Dumas و همکاران ۲۰۰۵).

با توجه به نزدیکی اسمولالیت پلاسمای خون ماهی و اسمولالیت آب در تیمارهای ۱۲ و ۱۸ در هزار به نظر می‌رسد این شوری‌ها برای نگهداری ماهی بسیار مناسب می‌باشند. مطالعات ابتدایی نشان دادند که مصرف انرژی در تنظیم اسمزی ماهیان استخوانی بسیار بالاست (Farmer و Beamish ۱۹۶۹؛ Rao ۱۹۶۸) و این محققان افزایش ۲۰-۳۰٪ متابولیسم را در آب شیرین و آب دریا در مقایسه با محیط ایزواسمتیک گزارش کرده‌اند، به طوری که هزینه تنظیم اسمزی در محیط ایزواسمتیک به صفر می‌رسد.

ایزوفرم‌های زیر واحد آلفا  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  آبشش در اثر انتقال به آب شور دچار تغییر می‌شود، Crombie و همکاران (۱۹۹۶)، این تغییرات را در آبشش ماهی کاد اطلس و Tipsmark و Madsen (۲۰۰۱) در قزل‌آلای قهوه‌ای مشاهده کردند (Crombie و Bell ۱۹۹۶، Sedgwick ۱۹۹۵) در طول انتقال به آب دریا بسیاری از ماهیان یوری‌هالین و آنادروم فعالیت  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  خود را افزایش می‌دهند تا فرآیند ترشح یون را بر خلاف شیب غلظت تسهیل کند (Madsen و همکاران ۱۹۹۵).

این افزایش در فعالیت  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  همراه با افزایش فعالیت زیر واحدهای  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  می‌باشد. به ویژه افزایش فعالیت زیر واحد آلفا در ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) (D'Cotta et al., 2000) قزل‌آلای جویباری (*Salmo trutta*) (Mackie و همکاران ۲۰۰۵، Roche و همکاران ۱۹۸۹) و مار ماهی اروپایی (Cutler et al., 1995) مشاهده شده است. در سال ۲۰۰۶ Bystriansky و همکاران بیان کردند که افزایش فعالیت  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  آبشش در آب شور به علت افزایش میزان زیر واحد  $\alpha_{1b}$  می‌باشد زیرا بیان زیر واحد  $\alpha_{1a}$  در آب شور کاهش می‌یابد (Bystriansky et al., 2006). افزایش بیان زیر واحد آلفا در سایر مطالعات (Mackie و همکاران ۲۰۰۵، Roche و همکاران ۱۹۸۹، Sedgwick 1995) به علت افزایش بیان ایزوفرم  $\alpha_{1b}$  بیان شده است و این امر پیشنهاد می‌کند که ایزوفرم  $\alpha_{1b}$  اختصاصاً ایزوفرم مرتبط با تنظیم  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  در سازگاری با آب شور آزاد ماهیان می‌باشد. در تحقیقی که توسط محققین بر روی چندین خانواده از آزاد ماهیان انجام شد مشاهده گردید که میزان بیان ژن زیر واحد  $\alpha_{1b}$  آنزیم  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  آبششی در تیمار شوری بیش از تیمار آب شیرین بوده است و این روند افزایشی طی دوره ۳۰ روزه آزمایش مشاهده شده است (Lin و همکاران 2004) زیر واحد  $\alpha$  آنزیم  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  نقش کاتالیزی داشته و در انتقال پتاسیم به داخل سلول و خروج سدیم از سلول به طرف پلازما نقش فعالی را ایفا می‌کند. وجود آنزیم  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  جهت تبدلات یونی و خصوصاً حفظ یون در آبزیان آب شیرین الزامی است ولی از آنجاییکه فعالیت کوترنسپورتر NKCC، واقع در بخش قاعده‌ای- جانبی سلول‌های کلراید برای فعالیت در جهت دفع یونهای اضافی در آبهای شور وابسته به میزان حضور و فعالیت  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  می‌باشد، لذا



کلراید لاملایی تعداد بالایی داشتند و این می تواند نشان از نقش کمتر سلول‌های کلراید بین لاملایی (فیلامتی) در آب شیرین باشد. بسیاری از محققان نیز معتقدند که سلول‌های کلراید روی لاملا فقط در محیط هیپواسمیتیک نقش دارند ( Jaunin و همکاران ۱۹۹۳، Kuwaye و همکاران ۱۹۹۳ ). همچنین Uchida و همکاران (۱۹۹۶). بیان کردند که نقش سلول‌های کلراید لاملایی در آب شور کمتر از آب شیرین می باشد. مساحت سطح مقطع سلول‌های کلراید لاملایی در چهار تیمار تفاوت معنی دار نشان ندادند اما مساحت سلول‌های کلراید بین لاملایی در آب شیرین به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بوده است ممکن است با توجه به اینکه ماهی در محیطی هیپواسمیتیک قرار گرفته و از طرفی کمترین تعداد سلول‌های کلراید بین لاملایی را دارد با افزایش اندازه تا حدودی توانسته تعادل اسمزی بدن را حفظ کند.

با توجه به نتایج حاصل از مطالعات بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی مشاهده شد که بیشترین تعداد سلول‌های کلراید لاملایی و بین لاملایی در آب ۶ و ۱۸ ppt وجود دارد و این روند افزایشی از آب شیرین به آب ۱۸ ppt به چشم می خورد به استثنای تیمار ۱۲ ppt که ماهی در محیط ایزواسمیتیک قرار گرفته و نیازش به تنظیم یونی کاهش یافته است، از سوی دیگر تعداد بالای سلول‌های کلراید در تیمار ۶ ppt مانند تیمار ۱۸ ppt ممکن است به این علت باشد که نوع سلول‌های کلراید در این دو شوری متفاوت بوده که برای درک بیشتر نیاز به مطالعات میکروسکوپ الکترونی دارد. از سوی دیگر افزایش تعداد سلول‌های کلراید در تیمار ۱۸ ppt که با افزایش اندازه سلول‌های کلراید نیز توأم بوده احتمالاً به همراه افزایش ناگهانی اسمولالیت پلازما دلیلی برای پارگی لاملا در بافت آبشش ماهیان تیمار ۱۸ بخش در هزار باشد.

افزایش کل  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  در آبهای شور بعنوان نشانه سازشی محسوب می گردد (Khodabandeh ۲۰۰۶). در بررسی حاضر نیز تغییرات بیان ژن  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha_{1b}$  آبشش ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان از آب شیرین تا آب ۱۸ ppt یک روند افزایشی مستقیم و خطی را طی کرده و در آب ۱۸ ppt به حداکثر خود رسیده است (نمودار ۱). بیشتر مطالعاتی که در مورد سازگاری آزاد ماهیان آنا دروم به آب شور بحث کرده اند، یک افزایش در فعالیت  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  آبششی را گزارش کردند ( Flik و Verboost ۱۹۹۳، Marshall ۲۰۰۲ ) که نشان دهنده سازگاری موفقیت آمیز آن‌ها می باشد.

نقش سلول‌های کلراید در ماهیان به طور گسترده مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است ( Evans و همکاران ۲۰۰۵، Madsen و همکاران ۱۹۹۵، Uchida و همکاران ۱۹۹۶، Van der Heijden و همکاران ۱۹۹۷) و در گونه‌های مختلف با توجه به شرایط اسمزی حاکم، فیلامتها یا لاملاها در تنظیم اسمزی نقش دارند ( Rao ۱۹۶۸). حضور سلول‌های کلراید در روی لاملاهای برخی ماهیان از جمله *Dicentrarchus labrax* ( Uchida و همکاران ۱۹۹۶ ) *Dasyatis* ( Evans ۲۰۰۵) و عدم حضور آن‌ها در برخی دیگر ( *Tetraodon nigroviridis* ) ( Lignot و همکاران ۲۰۰۱ )، *Oreochromis mossambicus* گزارش شده است ( Tipsmark و Madsen ۲۰۰۱). استفاده از آنتی کور  $\text{IgG}\alpha$  جهت مکان یابی سلول‌های کلراید در بسیاری از آبیان به عنوان روشی موفق گزارش شده است. ( Katoh و Kaneko ۲۰۰۳، Khodabandeh ۲۰۰۵ ، Khodabandeh و همکاران ۲۰۰۵ ، Khodabandeh ۲۰۰۶).

در مطالعه حاضر کمترین تعداد تیمار سلول‌های کلراید بین لاملایی در تیمار آب شیرین مشاهده شد و سلول‌های

(*Salvelinus alpinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 148: 332-338.

**Cleveland, B. M., M. and Weber, G. 2013.** Effects of triploidy on growth and protein degradation in skeletal muscle during recovery from feed deprivation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 166:128-137.

**Chow, D. C. and Forte, J. G. 1995.** Functional significance of the b-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *Journal of Experimental Biology*, 198: 1-17.

**Cotter, D., O'Donovan, V., O'Maoileidigh, N., Rogan, G., Roche, N. and 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.

**Cutler, C.P., Sanders, I. L., Hazon, N. and Cramb, G., 1995.** Primary sequence, tissue specificity and expression of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 subunit in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. B 111: 567-573.

**Crombie, H. J., Bell, M. V. and Tytler, P. 1996.** Inhibition of sodium plus- potassium-stimulated adenosine triphosphatase (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase) by protein kinase C activators in the gills of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 113: 765-772.

**Dorafshan S., Kalbassi M. R., Pourkazemi M., Amiri B. and Soltankarimi S. 2008.** Effects of triploidy on the Caspian salmon (*salmo trutta caspius*) haematology. *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*. 34 (3): 195-200

**D'Cotta, H., Valoaire, C., Le Gac, F. and Prunet, P., 2000.** Synthesis of gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic salmon smolt: differences in mRNA and protein levels. *American Journal Of Physiology*. 278: 101-110.

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

**Dumas, S., Audet, C., Blanc, J. M. and De la Nou E, J. 1995.** Seawater acclimation of diploid and triploid brook charr (*Salvelinus fontinalis*), diploid

جمع بندی نهایی حاصل از مطالعه تغییرات ریخت شناسی و فیزیولوژیک مشاهده شده در ماهیان قزل آلائی تریپلوئید بدنبال انتقال مستقیم آن‌ها به آب شور گویای این واقعیت است که این ماهیان به خوبی توان سازگاری با شوری‌های مختلف را داشته و با توجه به بازار پسندی قزل آلائی رنگین کمان و کمبود منابع آب شیرین در کشور، این گونه جهت پرورش در منابع آب‌های لب شور کشور مستعد می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

در پایان از کارشناسان محترم آزمایشگاههای بیولوژی و شیلات دانشکده علوم دریایی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین از مدیریت و پرسنل گرانقدر مرکز تکثیر ماهی آزاد شهید باهنر کلاردشت بخاطر کمک‌های بسیار سودمندشان تشکر و قدردانی می‌نمایم.

### منابع

- Abdoli, A. 2000.** Inland water fishes of Iran. Publications Museum of Nature and Wildlife of Iran. 378 p.
- Bartley, D. M., Rana. K. and Immink, A. J. 2001.** The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10: 325-337
- Beyenbach, K. B. 2004.** Kidneys sans glomeruli. *American Journal of Physiology*, 286: 81- 827.
- Bystriansky, J. S., Richards, J. G., Schulte, P. M. and Ballantyne, J. S., 2006.** Reciprocal expression of gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ subunit isoforms  $\alpha_{1a}$  and  $\alpha_{1b}$  during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 1848-1858.
- Bystriansky, J. S., Frick, N.T., Richards, J. G., Schulte, P. M. and Ballantyne, J. S. 2007.** Failure to up-regulate gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit isoform  $\alpha_{1b}$  may limit seawater tolerance of. Arctic char

- growth parameters, blood factors and proximate composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in underground brackish and freshwater. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(4):836-842.
- Hulata, G. 2001.** Genetic manipulation in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111: 155-173.
- 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.
- Jaunin, P., Jaisser, F., Beggah, A. T., Takyasu, K., Mangeat, P., Rossier, C., Horisberger, J. D. and Geering, K. 1993.** Role of the transmembrane and extra cytoplasmic domain of  $\beta$  subunits in subunit assembly, intracellular transport and functional expression of Na,K-pumps. *Journal of Cell Biology*, 123: 1751-1759.
- Kalbassi M., Dorafshan S., Pourkazemi M. and Amiri B. 2009.** Triploidy induction in the Caspian salmon (*salmo trutta caspius*) by heat shock. *Journal of Applied Ichthyology*, (25): 104-107
- Katoh, F. and Kaneko, T., 2003.** Short-term transformation and long-term replacement of bronchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established 'time-differential double fluorescent staining' technique. *Journal of Experimental Biology*. 206: 4113-4123.
- Kazemi, R. and Bahmani, M. 1999.** Annual Report of the International Sturgeon Research Institute. Department of Physiology and Biochemistry.
- Khodabandeh, S., Charmantier, G., Blasco, C., Grousset, E. and CharmantierDauky, M. 2005.** Ontogeny of the antennal glands in the Crayfish (*Astacus leptodactylus*) (Crustacea. Decapoda): Anatomical and cell differentiation. *Cell and Tissue Research*, 319: 153-165.
- Khodabandeh, S. 2006.**  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in the gut of the Zygoptera (*Ischnura elegans*) and Anisoptera (*Libellula lydia*) Lydia larvae (Odonata): activity and immunocytochemical localization. *Zoological Studies*, 45: 53-63.
- Khodabandeh, S., Mosafer, S., Khoshnood, Z. and Tolouei, M. 2007.** Salinity tolerance capacity Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), and their diploid and triploid hybrids. *Journal of Fish Biology*, 46: 302-316.
- Evans, D. H., 1975.** Ionic exchange mechanisms in fish gills. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 51: 491-495.
- Evans, D. H. 1993.** Osmotic and Ionic Regulation. *The Physiology of Fishes*. CRC Press. 315- 341.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M. and Choe, K. P. 2005.** The Multifunctional Fish Dominant Gill: Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, 85: 97-177
- Ewart, H. S. and Klip, A., 1995.** Hormonal regulation of the  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *American Journal of Physiology*, 269: C295-C311.
- Falahati, A. 2002.** Comparison of the development process gonads rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in freshwater and brackish. M.Sc. Thesis. School of Marine Science. Tarbiat Modares University. (Abstract in English)
- Farmer, G. J. and Beamish, F. W. H. 1969.** Oxygen consumption of *Tilapia nilotica* in relation to swimming speed and salinity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26: 2807-2821.
- Fish Stat Plus, 2006.** FAO Fisheries statistics.
- Flik, G. and Verbost, P. M. 1993.** Calcium Transport in Fish Gills and Intestine. *The Journal of Experimental Biology*. 184: 17-29.
- Folmar, L. C. and Dickhoff, W. W. 1979.** Plasma thyroxin and gill  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase changes during seawater acclimation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 63A: 329-332.
- 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. *Journal of Fish Biology*, 47: 865-876.
- Horisberger, J. D., Lemas, V., Kraehenbuhl, J. P. and Rossier, B. C., 1991.** Structure-function relationship of  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase. *Annual Review Physiology*, 53: 565-584
- Hosseinzadeh Sahafi, H., Masaeli, S., Alizadeh, M., Negarestan H. and Naji, T. 2013.** A study on

- Mortoja, R. and Mortoja Pierson, M. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale . *Masson et Cie, Paris*, 345p.
- Nebel, C., NegreSadargues, G., Blasco, C. and Chamantier, G. 2005.** Morphofunctional ontogeny of the urinary system of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Anatomy and embryology*, 209(3):193-206.
- Perry, S. F. 1997.** The chloride cell: structure and function in gills of freshwater fishes .*the Review Annual Physiology*. 59: 325-347
- Richards, J. G., Semple, J. W., Bystriansky, J. S. and Schulte, P. M. 2003.** Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer *Journal of Experimental Biology*, 206: 4475-4486.
- Roche, H., Chaar, K. and Peres, G. 1989.** The effect of a gradual decrease in salinity on the significant constituents of tissue in the sea bass *Dicentrarchus labrax* Pisces. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 93A: 785-789
- Rao, G. 1968.** Oxygen consumption of rainbow trout in relation to activity and salinity. *Canadian Journal of Zoology*, 46: 781-786.
- Seidelin, M., Madsen, S. S., Blenstrup, H. and Tipsmark, C. K. 2000.** Time-course changes in the expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills and pyloric caeca of brown trout (*Salmo trutta*) during acclimation to seawater. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73: 446-453.
- Shikano, T. and Fujio, Y., 1998a.** Immunolocalization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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*. *Journal of Experimental. Zoology*, 281: 80-89.
- Shikano, T. and Fujio, Y. 1998b.** Relationships of salinity tolerance to immunolocalization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Zoological Science*, 15: 35-41.
- Singer, T. D., Clements, K. M., Semple, J. W., Schulte, P. M., Bystriansky, J. S., Singer, T. D., Raptis, S., Sathiyaa, R., Nichols, J. W., Playle, R. C. and Vijayan, M. M. 2006.** Tissue-specific modulation of glucocorticoid receptor expression in response to salinity acclimation in rainbow trout. inn Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Fry. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and integrative Physiology*, 146(4): 93-94.
- Kuwaye, T. T., Okimoto, D. K., Shimoda, S. K., Howerton, R. D., Lin, H. R., Pang, P. K. T. and Grau, E. G., 1993.** Effect of 17a-methyltestosterone on the growth of the euryhaline tilapia, (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and sea water. *Aquaculture* 113, 137-152.
- Laurent, P., Dunel, E. S., Chevalier, C. and Lignon, J. 1994.** Gill epithelial cell kinetics in a freshwater teleost, *Oncorhynchus mykiss*, during adaptation to ion-poor water and hormonal treatments. *Fish Physiology and Biochemistry*, 13: 353-370.
- Lignot, J., H Charmantier Daures, M. and Charmantier, G. 2001.** Immunolocalization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the organs of the bronchial cavity of the European Lobster (*Homarus gammarus*) (Crustacea, Decapoda ). *Cell and Tissue Research*, 296: 417-426.
- Lin, C. H., Tsai, R. S. and Lee, T. H. 2004.** Expression and distribution of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the gill and kidney of the spotted green pufferfish, (*Tetraodon nigroviridis*) in response to salinity challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 138: 287-295.
- Mackie, P., Wright, P. A., Globe, B. D. and Ballantyne, J. S. 2005.** Osmoregulation and gene expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic sciences*, 62: 2661-2672
- Madsen, S. S., Jensen, M. K., Nohr, J. and Kristiansen, K. 1995.** Expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the brown trout (*Salmo trutta*): in vivo modulation by hormones and seawater. *American journal of Physiology*, 269, 1339- 1345.
- Marshall, W. S. 2002.** Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish Gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental zoology*, 293: 264-283
- McCormick, S. D. and Saunders, R. L. 1987.** Preparatory physiological adaptations for marine life in salmonids: Osmoregulation,. Growth and metabolism. *American Fisheries Society Symposium Series*, 1: 211-229.

*Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 146: 271-278.

**Sedgwick, S. D. 1995.** Trout Farming Handbook. Fifth Ed. Fishing News Books, Alden Press, Oxford.

**Taylor, J. F., Needham, M. P., North, B. P., Morgan, A., Thompson, K. and 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 and Comparative Endocrinology*, 152: 314-325.

**Tipsmark, C. K. and Madsen, S. S. 2001.** Rapid modulation of  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity in osmoregulatory tissues of a salmonid fish. *Journal of Experimental Biology*, 204: 701-709.

**Uchida, K., Kaneko, T., Yamauchi, K., Hirano, T., 1996.** Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *Journal of Experimental Zoology*, 276: 193-200.

**Van der Heijden, A. J. H., Verboost, P. M., Eygensteyn, J., Li, J., Wendelelaar Bonga, S. E. and 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.

**Varsamos, S., Diaz, T. P., Charmantier, G., Flik, G., Blasco, C. and Connes, R. 2002.** Bronchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to fresh water, seawater, and doubly concentrated seawater. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 12-26.

**Varsamos S, Nebel C. and Charmantier G. 2005.** Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish A review, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141: 401-429.

**Wendelaar Bonga, S. E. 1997.** The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.



## Study of some Osmoregulation Parameters in Triploid Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Adaptation to Different Salinities

Sahel Soltankarimi<sup>1</sup>, Mohammad Reza Kalbassi<sup>2\*</sup>, Saber Khodabandeh<sup>3</sup>, Mehdi Forozandeh<sup>4</sup>

1- M.Sc. Graduated Student, Department of fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

2- Prof., Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

3- Associated Prof., Marin biology Department, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor Iran

4- Prof., Department of Medicine Genetics, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 21.9.214

Accepted: 2.10.2014

Corresponding author: Kalbassi\_m@modares.ac.ir

### Abstract:

Morphological changes of the chloride cells and the  $\alpha_{1b}$  subunit gene expression of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in triploid rainbow trout (70.6 g average weight) were studied upon direct transferring to 6, 12 and 18 ppt salinities. Changes in abundance, distribution pattern, and the sectioned area of the chloride cells was studied through classic histology and  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  localization was performed through immunofluorescence light microscopy using a mouse monoclonal antibody IgG $\alpha_5$ . Gene expression of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$   $\alpha_{1b}$  subunit was studied by semi-quantitative gene expression methods. No mortality occurred among the fish in all salinities during the 10-days experimental period and treated fish kept their plasma osmolality at standard physiologic levels. All the fish also showed similar distribution pattern in their chloride cells that were distributed on filaments, between and over lamella. Histological studies confirmed some abnormal morphological changes such as lamella interruption. Immunohistochemical studies showed the highest number of the chloride cells on lamella and between lamella in 18 ppt and the maximum sectional area of the chloride cells in freshwater. Gene expression of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$   $\alpha_{1b}$  subunit had direct correlation with increasing trend of salinity. In conclusions, triploid rainbow trout was found to be adaptable to the various experimented salinities and could be recommended for rearing in brackish water.

**Keywords:** Triploidy, Chloride cell, Semi quantitative Gene expression, Immunohistochemistry, *Oncorhynchus mykiss*