

مقاله پژوهشی

## تغییرات یونوسیت‌های پوست لارو سوف سفید دریای خزر (*Sander lucioperca*) در مواجهه با شوری‌های مختلف

محدثه احمدنژاد<sup>۱\*</sup>، شهربانو عریان<sup>۲</sup>، محمود بهمنی<sup>۳</sup>، محمد صیاد بورانی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: مرداد ۹۹

تاریخ پذیرش: مهر ۹۹

### چکیده

هدف از مطالعه حاضر، تعیین توانایی تنظیم اسمزی لاروهای سوف سفید در دو مرحله قبل (a) و بعد از جذب کیسه زرده (b) بود. دو گروه لاروی به مدت ۹۶ ساعت، در معرض آب شیرین (شوری کمتر از نیم در هزار)، شرایط مصبی (شوری ۷ در هزار) و آب دریای خزر (شوری ۱۲ در هزار) قرار گرفتند. درصد بقای لاروها، تعداد و اندازه یونوسیت‌های پوست و درصد سطح آن‌ها با استفاده از بافت‌شناسی کلاسیک همراه با رنگ‌آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین و ایمونوهیستوشیمی از طریق مکان‌یابی آنزیم  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase مورد بررسی قرار گرفت. میزان بقا در آب شیرین، برای هر دو گروه ۹۷ درصد بود. ۸۶ درصد از لاروهای گروه a در شوری ۷ در هزار زنده ماندند. در حالی که در شوری ۱۲ در هزار نرخ بقای آن‌ها صفر شد. ۹۷ درصد از لاروهای گروه b در شوری ۷ در هزار و ۲۰ درصد از آن‌ها در شوری ۱۲ در هزار زنده ماندند. اندازه سلول‌های کلراید پوست در مواجهه با شوری تغییر نکرده. در انتهای آزمون، تعداد و درصد سطح سلول‌های کلراید موجود در پوست در گروه a در شوری ۷ و در گروه b در شوری ۱۲ در هزار به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که در لارو سوف سفید دریای خزر، با افزایش رشد، نمو و تکامل بدن، عملکرد سلول‌های کلراید پوست در تنظیم اسمزی افزایش یافت و توانست در زنده ماندن لاروها در مواجهه با شوری به گونه‌ای عمل کند که میزان بقا در مرحله پس از جذب کیسه زرده در مواجهه با شوری بیشتر از مرحله قبل از جذب کیسه زرده باشد.

### واژگان کلیدی: دریای خزر، سوف سفید، تنظیم اسمزی، ایمونوهیستوشیمی، سدیم-پتاسیم ATPase

۱- استادیار پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران.

۲- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۳- استاد موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۴- دانشیار پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران.

\* نویسنده مسئول: [m\\_ahmadnezhad@yahoo.com](mailto:m_ahmadnezhad@yahoo.com)

## مقدمه

مطالعاتی که در مورد توزیع و تراکم یونوسیت‌ها در نقاط مختلف پوست بدن لارو در ماهی آنچوی (*Engraulis mordax*)، ماهی *Ayu* (*Plecoglossus altivelis*)، فلاندر دریایی *Kareius bicoloratus*، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، شگ ماهی (*Clupea harengus*)، تیلاپپای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*)، کفشک‌ماهی *Paralichthys olivaceus*، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)، سیم دریایی بزرگ سر (*Sparus aurata*)، ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، *Alburnus tarichi* و سوف سفید (*Sander lucioperca*) صورت پذیرفته است، پوست به عنوان جایگاه اصلی تنظیم اسمزی در مراحل اولیه رشد و نمو ماهی عنوان شده است و پراکنش یونوسیت‌ها عمدتاً بر روی تنه، کیسه زرده، سر و باله‌ها ذکر شده است. مشخص شده است که تنوع در مکان حضور، تراکم و پراکنش سلول‌های یاد شده می‌تواند بین گونه‌های مختلف ماهی‌ها متفاوت باشد (احمدنژاد و همکاران، ۱۳۹۳؛ Hwang et al., 1989؛ O'Connell, 1981

تغییرات شوری آب یکی از شاخص‌های کلیدی موثر بر بقا، متابولیسم و پراکنش ماهی‌ها است. ماهیان استخوانی بالغ توسط اندام‌های مختلف از جمله پوست، روده، حفره‌های آبششی و اندام‌های ادراری، طی فرایندی به نام تنظیم اسمزی، یون و آب بدن خود را تنظیم می‌کند. اما در مراحل اولیه رشد و نمو، پوست علاوه بر ایفای نقش‌های فیزیولوژیکی دیگر از جمله، حفاظت، تنفس و ترشح، جایگاه اصلی تنظیم اسمزی است و این وظیفه را به کمک سلول‌های کلراید غنی از میتوکندری و پمپ سدیم، پتاسیم یا ATPase ( $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ : NKA) یا همان یونوسیت‌ها انجام می‌دهد (Varsamos et al., 2005). مکان‌یابی آنزیم NKA به وسیله آنتی‌بادی‌ها در مطالعات ایمونوهیستوشیمی به عنوان شاخصی برای شناسایی یونوسیت‌ها به کار می‌رود (Hirose et al., 2003; Kaneko and Hiroi, 2008; Khodabandeh et al., 2006; Lignot et al., 2001; Nebel et al., 2005).

برای اولین بار، حضور یونوسیت‌های پوستی در لارو کفشک‌ماهی *Pleuronectes platessa* (Shelbourne, 1957) و پس از آن در بدن لارو ساردین (*Sardinops caerulea* Lasker and Threadgold, 1968) گزارش شد. در

مهاجرت می‌کند و بچه ماهیان پس از مدتی از رودخانه به دریا می‌روند (عبدلی، ۱۳۷۸). این گونه جزء ماهیان استنوهالین (Stenohaline) است. به این معنی که نسبت به تغییرات شوری محیط دامنه تحمل محدودی دارد (Craig, 2000). صید بی‌رویه این ماهی در دهه‌های اول و دوم سده اخیر از یک سو و از بین رفتن محل‌های تخم‌ریزی آن در سواحل ایرانی دریای خزر به دلیل آلودگی‌های ناشی از دستکاری‌های انسانی در رودخانه‌ها سبب شد تا ذخایر آن به شدت کاهش یابد. از این رو، سال‌ها است که برای بازسازی ذخایر این گونه مهم، تکثیر نیمه مصنوعی و رهاسازی بچه‌ماهیان آن به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر انجام می‌گیرد. اما با وجود حجم زیاد رهاسازی در سال‌های گذشته، میزان ذخایر و در نهایت میزان صید این ماهی افزایش نداشته است. به نظر می‌رسد آلودگی‌های شدید ناشی از فعالیت‌های انسانی در رودخانه‌ها یکی از عوامل مهم در کاهش نرخ بقای بچه ماهیان رهاسازی شده باشد. یکی از راه‌های افزایش درصد بقا و افزایش ضریب بازگشت شیلاتی، رهاسازی مستقیم به نواحی مصبی (با شوری حدود ۷ در هزار) و یا سواحل دریای خزر (با شوری حدود ۱۲ در هزار) است. از طرفی، رها کردن بچه ماهیان در

Wales and Tytler, Ayson et al., 1994; Rambourgh, Hiroi et al., 1998; 1999; Van Der Heijden et al., 1999; Bodinier et al., 2010; Varsamos, 2001; Ghanizadeh Kazerouni and Oguz, 2018; Khodabandeh, 2011. در برخی از مطالعات نیز گزارش شده است که در هنگام مواجهه با افزایش شوری آب، اندازه و تعداد سلول‌های کلراید پوست در لارو ماهی تیلاپپای موزامبیک، باس دریایی، ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*) و مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) افزایش یافت (Van Der Heijden et al., 1999; Varsamos et al., 2001; Hiroi et al., 2005; Kaneko et al., 2008). تغییر در اندازه و تراکم یونوسیت‌های پوست به وظیفه تنظیم اسمزی و قابلیت سازگاری آن‌ها مربوط می‌شود (Varsamos et al., 2005).

ماهی سوف سفید (*Sander lucioperca*) از ماهیان با ارزش و مهم اقتصادی است که بومی آب‌های ایرانی دریای خزر و رودخانه‌های مرتبط به آن است. این گونه دو فرم ساکن در آب شیرین و مهاجر دارد. فرم مهاجر آن در مناطقی از دریا که دارای آب شیرین‌تر است، زندگی کرده، برای تخم‌ریزی به رودخانه‌ها و تالاب‌ها

## مواد و روش‌ها

### لارو ماهی و طراحی آزمایش

تخم‌های به دست آمده از تکثیر نیمه مصنوعی یک جفت مولد سوف سفید (*Sander lucioperca*) متعلق به نیمه جنوبی دریای خزر از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی دکتر یوسف‌پور سیاهکل تهیه و به ایستگاه تحقیقاتی تخصصی تغذیه و غذای زنده آبزیان (ساحل غازیان) وابسته به پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی کشور (بندر انزلی) منتقل شدند. تخم‌ها تحت شرایط کنترل شده در مخزن حاوی آب چاه جریان‌دار تصفیه و هوادهی شده جهت تفریح نگهداری شدند. تعداد ۱۸۰۰ لارو ۴ روزه (گروه لاروهای قبل از جذب کیسه زرده با طول  $5/6 \pm 0/2$  میلی‌متر و وزن  $0/0012 \pm 0/01$  گرم) و ۱۸۰۰ لارو ۷ روزه (گروه لاروهای پس از جذب کیسه زرده با طول  $6/2 \pm 0/3$  میلی‌متر و وزن  $0/0026 \pm 0/04$  گرم) به طور مستقیم و ناگهانی به سه محیط آب شیرین (شاهد، شوری کمتر از نیم در هزار)، آب با شوری شرایط مصبی (شوری ۷ در هزار) و آب دریای خزر (شوری ۱۲ در هزار) با سه تکرار (در مجموع ۱۸ آکواریوم ۱۰ لیتری) انتقال داده شدند. برای تیمار آب شیرین از آب چاه ایستگاه تحقیقاتی استفاده شد. آب دریای خزر با شوری

وزن‌های کم‌تر سبب کاهش هزینه‌های ناشی از نگهداری بچه ماهیان در کارگاه‌های تکثیر خواهد شد. بنابراین، پاسخ به این پرسش که «آیا لاروهای سوف سفید که هنوز در مراحل ابتدایی رشد و نمو هستند را می‌توان مستقیماً به نواحی مصبی و یا نواحی ساحلی دریای خزر رهاسازی کرد؟» سبب شکل‌گیری پژوهش حاضر شد.

آمادگی یک ماهی برای رهسپار شدن به محیط شور دریا مستلزم کسب توانایی تنظیم اسمزی برای مقابله با تغییرات آب و یون ناشی از این چالش است. مطالعه در مورد تنظیم اسمزی در مراحل مختلف زندگی ماهی به ویژه در مراحل ابتدایی لاروی از جمله مطالعاتی است که برای تصحیح فرایند رهاسازی به محیط‌های آب شیرین و یا شور ضروری است. وجود ابهاماتی مانند میزان تحمل شوری لاروهای سوف سفید و میزان دخالت یونوسیت‌های پوستی در سازگاری با شوری‌های مختلف سبب شد تا مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان تحمل شوری و بررسی موقعیت و تغییرات تعداد و اندازه یونوسیت‌های پوست در دو مرحله قبل و بعد از جذب کیسه زرده در مواجهه با سه محیط آب شیرین و شوری‌های ۷ در هزار (شرایط مصبی) و ۱۲ در هزار آب دریای خزر، انجام پذیرد.

منظور، در انتهای آزمایش، از هر تکرار تعداد ۳ لارو نمونه‌برداری و در محلول بوئن تثبیت شد. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از محلول بوئن خارج و در الکل ۷۰ درصد شستشو و نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها از مراحل آب‌گیری با درجات مختلف الکل، شفاف‌سازی، پارافینه شدن، قالب‌گیری، برش، رنگ‌آمیزی (هماتوکسیلین و ائوزین) و مونته‌کردن عبور داده شدند (Bancroft and Stevens, 1977). برش از ابتدا تا انتهای بدن هر لارو با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری و با ضخامت ۴ میکرون صورت گرفت. شمارش و اندازه‌گیری یونوسیت‌های پوست با استفاده از لام‌های بافت شناسی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و میکروسکوپ نوری (BEL, BIO2, ایتالیا) انجام گرفت (Khodabandeh et al., 2006).

#### مکان‌یابی آنزیم NKA

برای مکان‌یابی آنزیم NKA (نشانگر سلول‌های کلراید یا یونوسیت) به روش ایمونوهیستوشیمی و شناسایی یونوسیت‌های پوست، از آنتی‌بادی IgGa5 (Mouse Monoclonal Antibody Raised Against the  $\alpha$ -subunit of the Chicken  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, Developmental Studies, ATPase, Hybridoma Bank, آمریکا) و آنتی‌بادی

۱۲ در هزار از عمق حدود ۵۰ متری غرب دریای خزر واقع در بندر انزلی تامین شد. آب ۷ در هزار با مخلوط کردن آب شیرین چاه با آب دریا تهیه شد، به این طریق که آنقدر آب چاه به آب دریا افزوده می‌شد تا شوری اندازه‌گیری شده با شوری سنج (رفراکتومتر چشمی، ATAGO SUR-NE, Japan) مقدار ۷ در هزار را نشان می‌داد. تراکم ۲۰ لارو در لیتر (۲۰۰ لارو در هر تکرار) انتخاب شد (Hamza et al., 2008) و مدت آزمون مواجهه با شوری ۹۶ ساعت بود (Bodinier et al., 2010). لاروها تحت شرایط نور طبیعی قرار داشتند و شوری آب آکواریوم‌ها هر روز توسط دستگاه شوری‌سنج کنترل می‌شد. دما، اکسیژن و pH آب توسط دستگاه مولتی پارامتر (WTW، آلمان) در طی مدت آزمایش سنجش و ثبت می‌شد. میزان تلفات در فواصل زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت ثبت شد (Bodinier et al., 2010).

#### بافت‌شناسی

برای تعیین حضور و پراکنش یونوسیت‌های پوست در نقاط مختلف بدن لاروها از بافت‌شناسی کلاسیک با رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین و مکان‌یابی آنزیم NKA به روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. برای این

قطره آنتی‌بادی FITC (۱۵ میکرولیتر آنتی‌بادی در ۹۸۵ میکرولیتر محلول S4) روی آن‌ها اضافه شد و یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگهداری شدند. سپس لام‌ها ۲ بار در محلول S1 به مدت ۲ دقیقه آب‌کشی و با استفاده از مایع مونتاز، مونته شدند. برای پی بردن به درستی کارکرد این آنتی‌بادی، به تعدادی از لام‌ها آنتی‌بادی اول اضافه نشد، اما آنتی‌بادی دوم اضافه شد (لام‌های ایمونوهیستوشیمی شاهد). بنابراین، این لام‌ها نباید فلورسانسی نشان بدهند. کلیه لام‌ها بعد از قرار دادن لامل روی آن‌ها در جعبه‌های مخصوص چیده و برای حفظ خواص فلورسانسی در جای تاریک نگهداری شدند. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس (Nikon, TE 2000S، ژاپن) با فیلترهای ۴۵۰-۴۹۰ نانومتر مشاهده و از آن‌ها عکس‌برداری به عمل آمد (Khodabandeh et al., 2009a).

#### شمارش و اندازه‌گیری یونوسیت‌های پوست

شمارش یونوسیت‌های پوست در یک میلی‌متر مربع از سطح پوست در ۱۸ برش عرضی از ابتدا، وسط و انتهای بدن هر لارو انجام و درصد سطح یونوسیت‌های موجود در ۱ میلی‌متر مربع از مقطع پوست محاسبه شد.

Monoclonal Mouse Anti-) FITC fluorescein Antibody Jackson Immuno Research (آمریکا) استفاده شد. برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، برش‌ها بر روی لام‌های پلی-ال لیزین قرار گرفتند. سپس توسط گزیلول پارافین‌زدایی و در سری افزایشی الکل آب‌گیری شدند. آنگاه به ترتیب ۱۰ دقیقه در محلول S1 (محلول ۳ قرص PBS: Phosphate Buffer Saline، در ۱۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با pH ۷/۳)، ۱۰ دقیقه در محلول S2 (۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول S1 به همراه ۲/۱۸ گرم NaCl و ۴۰ میکرولیتر Tween 20 با pH ۷/۳) و ۲۰ دقیقه در محلول S3 (۱۵۰ میلی‌لیتر از محلول S1 و ۷۵۰ میلی‌گرم Regiler) قرار داده شدند. سپس لام‌ها به مدت ۱ دقیقه در محلول S1 آب‌کشی شدند و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب طوری قرار داده شدند که برش‌ها به طرف بالا باشند. بلافاصله روی هر لام ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی IgGα5 رقیق شده در محلول S4 (۵۰۰ میکرولیتر IgGα5 در ۵۰۰ میکرولیتر محلول S4 شامل ۲ میلی‌لیتر S3 و ۸ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه شد و لام‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس لام‌ها به مدت ۲ دقیقه در محلول S1 آب‌کشی و ۲-۳

مساحت حداقل ۱۰۰ سلول در هر لارو با استفاده از نرم‌افزار Image Tool نسخه دو اندازه‌گیری شد (Shikano and Fujio, 1999; Khodabandeh et al., 2009b).

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 13 انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه داده‌های نرمال از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA)، آزمون تی (T-test) و پس‌آزمون دانکن و برای داده‌های غیرنرمال از آزمون ناپارامتریک Kruskal-Wallis و آزمون Mann-Whitney U در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) استفاده شد. نمودارها نیز با نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 رسم شدند.

### نتایج

#### بازماندگی

تمام لاروهای سوف سفید در هر دو گروه قبل (۴ روزه) و پس از جذب کیسه زرده (۷ روزه) در بدو ورود به سه محیط آب شیرین، شوری ۷ در هزار و شوری دریای خزر (۱۲ در هزار) زنده ماندند. در گروه لاروهای قبل از جذب

کیسه زرده، میزان بازماندگی لاروها در آب شیرین تا ۹۶ ساعت بالای ۹۵ درصد بود. میزان بقا، ۲۴ ساعت پس از ورود به تیمار ۷ در هزار ( $17 \pm 0/0$ ) و آب دریای خزر ( $88 \pm 0/0$ ) درصد) به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). به طوری که کمترین میزان به تیمار آب دریای خزر تعلق داشت ( $P < 0/05$ ). لاروهای باقی مانده در تیمار آب دریای خزر ۴۸ ساعت پس از مواجهه با شوری همگی تلف شدند. درصد بقا در گروه شاهد و شوری ۷ در هزار از زمان ۲۴ تا ۹۶ ساعت تغییر معنی‌داری پیدا نکرد ( $P > 0/05$ ; شکل ۱- الف).

در گروه لاروهای پس از جذب کیسه زرده، ۲۴ ساعت پس از چالش با سه محیط آزمایش، درصد بقا در تیمار آب دریای خزر ( $96/6 \pm 0/3$ ) درصد) به طور معنی‌داری نسبت به دو گروه دیگر کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). از ابتدا تا انتهای دوره آزمایش، هر چند در دو گروه آب شیرین و آب ۷ در هزار تلفاتی بروز داد. ولی درصد بقا در بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0/05$ ) و تا پایان آزمون بالای ۹۵ درصد باقی ماند. اما در تیمار آب دریای خزر با گذشت زمان درصد بقا به طور معنی‌داری نسبت به دو گروه دیگر کاهش یافت ( $P < 0/05$ ), به طوری

که در پایان ۹۶ ساعت ( $20 \pm 5/8$  درصد) به کمترین میزان خود رسید (شکل ۱-ب).

#### بافت‌شناسی و مکان‌یابی یونوسیت‌های پوست به روش ایمونوهیستوشیمی

با روش بافت‌شناسی و مکان‌یابی آنزیم NKA به روش ایمونوهیستوشیمی، حضور یونوسیت‌های غنی از آنزیم NKA در پوست هر دو گروه لاروی به اثبات رسید. همچنین مشخص شد که در گروه لاروهای قبل از جذب کیسه زرده یونوسیت پوست در نواحی راس سر به ویژه مناطق نزدیک به چشم، جوانه باله، غشای دور تا دور کیسه زرده و از ابتدا تا انتهای پشت بدن پراکنده بودند. در گروه لاروهای پس از جذب کیسه زرده یونوسیت‌های ایمونوفلورسانس پوست در تمام نقاط بدن به ویژه در ناحیه شکمی و انتهای بدن حضور داشتند (شکل‌های ۲ و ۳).

#### شمارش و اندازه‌گیری یونوسیت‌های پوست

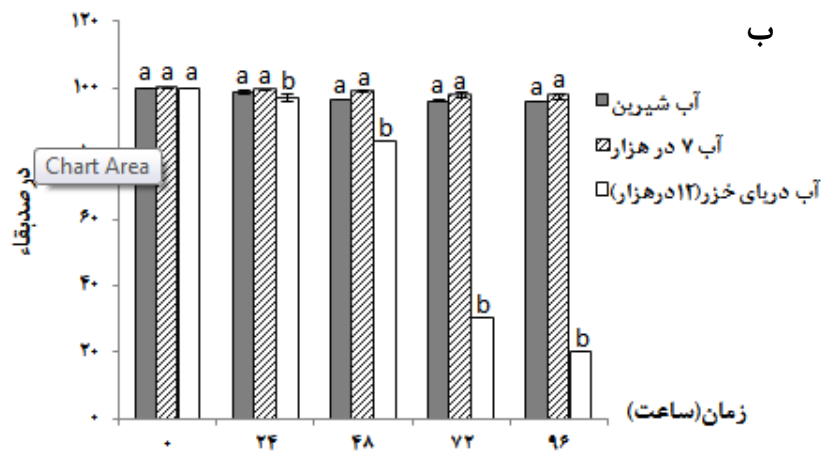
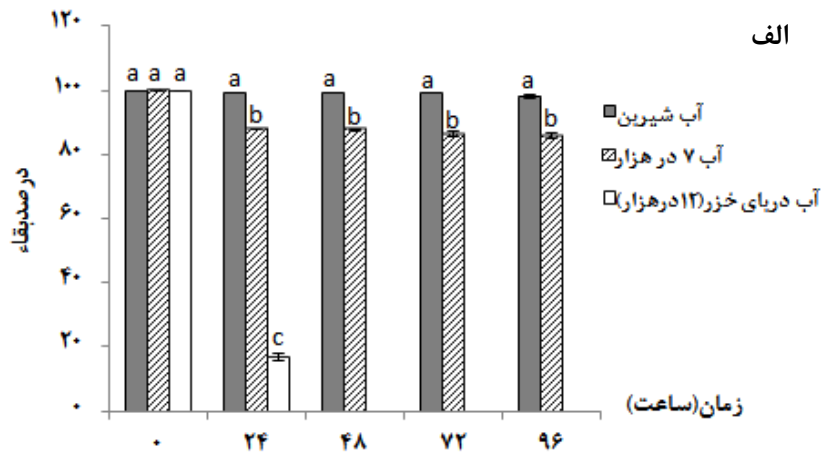
در گروه لاروهای قبل از جذب کیسه زرده، میانگین تعداد یونوسیت‌ها در ۱ میلی‌متر مربع از سطح پوست پس از ۹۶ ساعت تیمار در آب لب‌شور با شوری ۷ در هزار، به طور معنی‌داری به میزان  $70/79$  درصد بیشتر از لاروهای شاهد

(آب شیرین) بود ( $P < 0/05$ ). درصد سطح یونوسیت‌های موجود در ۱ میلی‌متر مربع از مقطع پوست لاروهای تیمار آب لب‌شور پس از ۹۶ ساعت مواجهه به طور معنی‌داری به میزان  $58/67$  درصد بیشتر از لاروهای شاهد بود ( $P < 0/05$ ). از لحاظ شاخص میانگین مساحت یونوسیت در مقطع عرضی پوست، بین لاروهای شاهد و تیمار با آب لب‌شور در زمان ۹۶ ساعت پس از شروع آزمون چالش شوری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ؛ جدول ۱).

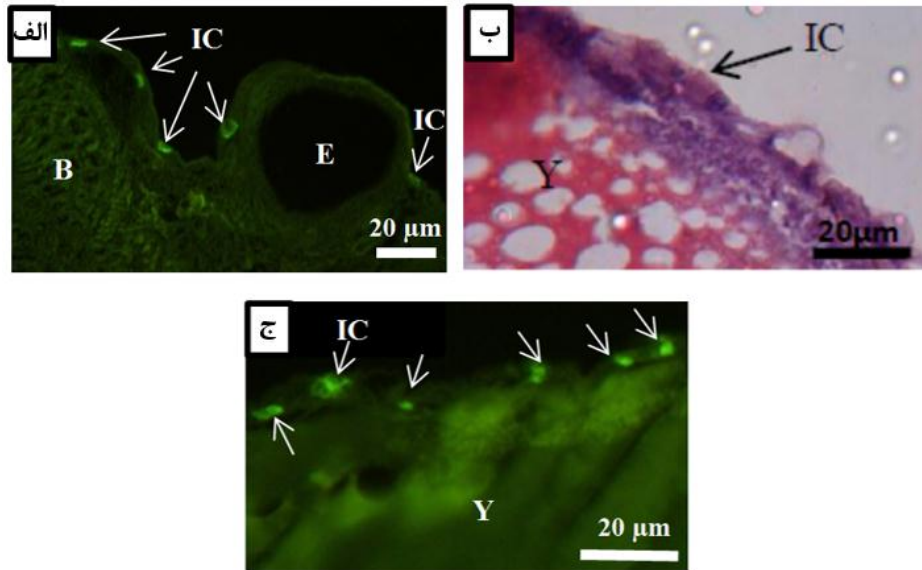
در گروه لاروهای پس از جذب کیسه زرده، میانگین تعداد یونوسیت‌ها در ۱ میلی‌متر مربع از سطح پوست در تیمار آب دریای خزر پس از ۹۶ ساعت مواجهه با شوری ۱۲ در هزار به طور معنی‌داری به میزان  $27/79$  درصد بیشتر از لاروهای گروه شاهد و به میزان  $49/43$  درصد بیشتر از لاروهای تیمار آب لب‌شور (۷ در هزار) بود ( $P < 0/05$ ). درصد سطح یونوسیت‌های موجود در ۱ میلی‌متر مربع از مقطع پوست لاروهای تیمار آب دریای خزر پس از ۹۶ ساعت مواجهه به طور معنی‌داری  $29/94$  ( $P < 0/05$ ) بیشتر از لاروهای شاهد و  $48/96$  درصد بالاتر از لاروهای گروه آب لب‌شور (۷ در هزار) بود ( $P < 0/05$ ). از لحاظ شاخص مساحت یونوسیت پوست بین سه تیمار اختلاف معنی‌داری



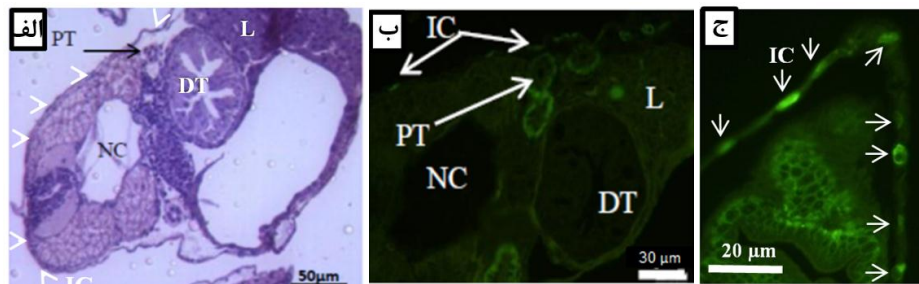
مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). با این حال، مساحت یونوسیت‌های پوست لاروهای دو تیمار آب لب‌شور (۷ در هزار) و آب دریای خزر کمتر از مساحت یونوسیت پوست لاروهای قرار گرفته در معرض آب شیرین بود (جدول ۲).



شکل ۱: مقایسه درصد بقای لاروهای سوف سفید در زمان‌های مختلف پس از ورود به آب شیرین و شورری‌های ۷ و ۱۲ در هزار آب دریای خزر (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). الف) گروه قبل از جذب کامل کیسه زرده (لاروهای ۴ روزه). ب) گروه پس از جذب کیسه زرده (لاروهای ۷ روزه). حروف متفاوت روی نمودار نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین سه تیمار در هر یک از زمان‌های نمونه‌برداری است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۲: مقطع عرضی بدن لارو سوف سفید دریای خزر (*Sander lucioperca*) قبل از جذب کیسه زرده در روز چهارم پس از تفریح. الف) موقعیت و تراکم یونوسیت‌های ایمونوفلورسانس روی پوست سر و نزدیک چشم. ب و ج) یونوسیت‌های پوست ناحیه کیسه زرده. مکان‌یابی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  به روش ایمونوهیستوشیمی (الف و ج). رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین (ب). B: مغز (Brain); E: حذقه چشم (Eye); IC: یونوسیت پوست (Ionocyte); Y: زرده (Yolk).



شکل ۳: مقطع عرضی بدن لارو سوف سفید دریای خزر (*Sander lucioperca*) پس از جذب کیسه زرده در روز هفتم پس از تفریح. الف) موقعیت و تراکم یونوسیت‌ها روی پوست تنه. ب) ایمونوفلورسانس در یونوسیت‌های پوست تنه و همچنین در بخش قاعده‌ای جانبی سلول‌های لوله‌های پروکسیمال کلیوی (PT) قابل مشاهده است، ولی هیچ ایمونوفلورسانسی در لوله گوارش قدامی (DT) مشاهده نمی‌شود. ج) موقعیت و تراکم یونوسیت‌های ایمونوفلورسانس روی پوست ناحیه انتهای دم. رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین

(الف). مکان‌یابی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  به روش ایمونوهیستوشیمی (ب و ج). DT: لوله گوارش (Digestive Tract); IC: یونوسیت پوست (Ionocyte); L: کبد (Liver); NC: نوتوکورد (Notochord); PT: لوله پروکسیمال کلیوی (Proximal Tubule).

جدول ۱: شاخص‌های کمی مربوط به یونوسیت‌های پوست لاروهای سوف سفید در مرحله قبل از جذب کیسه زرده پس از ۹۶ ساعت مواجهه با آب شیرین و آب لب‌شور ۷ در هزار (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

تیما		شاخص
آب شیرین (شاهد)	آب لب‌شور ۷ در هزار	
$460.0/51 \pm 650.6^a$	$7857/23 \pm 21^b$	تعداد یونوسیت در هر میلی‌متر مربع از سطح پوست
$11/0.1 \pm 1/6^a$	$17/47 \pm 93^b$	درصد سطح یونوسیت‌های موجود در هر میلی‌متر مربع از مقطع پوست
$24/8 \pm 1/1^a$	$23/7 \pm 0/6^a$	مساحت یونوسیت (میکرومتر مربع)

در هر ردیف حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

جدول ۲: شاخص‌های کمی مربوط به یونوسیت‌های پوست لاروهای سوف سفید در مرحله پس از جذب کیسه زرده پس از ۹۶ ساعت مواجهه با شوری‌های مختلف (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

تیما			شاخص
آب شیرین (شاهد)	آب لب‌شور ۷ در هزار	آب دریای خزر (۱۲ در هزار)	
$10240.5 \pm 1307/61^a$	$8757/5 \pm 788/9^a$	$13086/5 \pm 629/8^b$	تعداد یونوسیت در هر میلی‌متر مربع از سطح پوست
$22/0.1 \pm 2/4^a$	$19/2 \pm 9^a$	$28/6 \pm 1/4^b$	درصد سطح یونوسیت‌های موجود در هر میلی‌متر مربع از مقطع پوست
$23/1 \pm 0/6^a$	$22/1 \pm 0/5^a$	$21/6 \pm 0/6^a$	مساحت یونوسیت (میکرومتر مربع)

در هر ردیف حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

**بحث**  
کیسه زرده (۷ روزه) در معرض سه محیط آب در مطالعه حاضر، پس از قرار دادن دو گروه شیرین، شوری ۷ در هزار و شوری دریای خزر (۱۲ در هزار) مشخص شد گروه دوم (لاروهای لارو سوف سفید قبل (۴ روزه) و پس از جذب

گزارش شده است. نتایج این بررسی نشان داد که تحمل در مقابل شوری‌های بالاتر با افزایش سن افزایش یافت، مثلاً قدرت تحمل شوری ۳۹ در هزار از روز سوم پس از تفریخ کسب شد و به تحمل شوری ۴۵ در هزار در روز سیام پس از تفریخ، افزایش یافت. از زمان ۷۵ روزگی، تلفات این ماهی در شوری بالا به کمتر از ۱۰ درصد کاهش یافت. آن‌ها پیشنهاد کردند که افزایش تحمل شوری در طی انتوژنی مستقیماً با افزایش انتوژنیک توانایی تنظیم اسمزی رابطه دارد (Bodinier et al., 2010). این موضوع از سوی Varsamos و همکاران (۲۰۰۱) برای مراحل پس از دوران جنینی باس دریایی *D. labrax* نیز پیشنهاد شده بود. هرچند طول مدت مطالعه حاضر کوتاه بود، اما در همین مدت نیز مشخص شد که لاروهایی که ۳ روز بزرگ‌تر بودند و قسمت اعظم زرده آن‌ها جذب شده بود، در مواجهه با شوری‌های یکسان تلفات کمتری داشتند. بنابراین، به نظر می‌رسد، مانند گونه‌های سیم دریایی (Bodinier et al., 2010) و باس دریایی (Varsamos et al., 2001) بتوان به این نتیجه رسید که در لارو سوف سفید دریایی خزر با تکامل یافته‌تر شدن اندام‌ها در مراحل پس از تفریخ، توان تحمل شوری و تنظیم اسمزی بیشتر شود و به نظر می‌رسد که تحمل

پس از جذب کیسه زرده) که سن بالاتری به لحاظ زمان خارج شدن از تخم نسبت به گروه اول (لاروهای قبل از جذب کیسه زرده) داشتند، تغییرات ناشی از ورود به شوری‌های ۷ و ۱۲ در هزار را بهتر تحمل کردند. گروه اول که هنوز نسبتی از زرده را به همراه داشتند و در روز چهارم پس از تفریخ مورد آزمایش چالش با محیط‌های شور قرار گرفتند، قادر به تحمل آب شور ۱۲ در هزار دریای خزر نبودند و ۴۸ ساعت پس از ورود به آن همگی تلف شدند. در حالی که در آزمون گروه دوم، یعنی لاروهای پس از جذب کیسه زرده، در تیمار آب دریای خزر ۸۳/۷ درصد از لاروها تا زمان ۴۸ ساعت زنده ماندند. در گروه اول ۸۵/۷ درصد از لاروهای منتقل شده به آب لب‌شور ۷ در هزار تا ۹۶ ساعت مواجه ناگهانی با این شوری را تحمل کردند و زنده ماندند. در حالی که، در گروه دوم ۹۷/۳ درصد از لاروهای تیمار ۷ در هزار تا پایان ۹۶ ساعت زنده ماندند. ۳۰/۳ درصد از لاروهای پس از جذب کیسه زرده تیمار شده با آب دریای خزر تا ۷۲ ساعت و ۲۰ درصد تا ۹۶ ساعت شوری دریای خزر را تحمل کردند و زنده ماندند. این رابطه کاهش تلفات با زیاد شدن سن در مطالعه Bodinier و همکاران (۲۰۱۰) بر روی تحمل شوری در لارو ماهی سیم دریایی نیز

توجهی بالاتر از لاروهای تحت تاثیر آب شیرین در همان زمان قرار داشت. با این وجود، اندازه یونوسیت‌ها تغییر قابل توجهی نسبت به لاروهای آب شیرین نشان نداد. در آزمایش اثر شوری بر لاروهای سوف در زمان پس از جذب کیسه زرده تراکم و درصد سطح یونوسیت‌های موجود در پوست لارو ۹۶ ساعت پس از انتقال به شوری دریای خزر (۱۲ در هزار) افزایش قابل توجهی نسبت به دو تیمار شاهد (آب شیرین) و آب لب شور ۷ در هزار نشان داد. هر چند اندازه یونوسیت‌ها تفاوت قابل توجهی با اندازه آن در دو تیمار یاد شده نداشت و در هر سه تیمار اندازه یونوسیت پوست پس از ۹۶ ساعت مواجهه با چالش شوری تقریباً اختلافی نداشت. کاهش اندک تعداد و درصد سطح یونوسیت‌های موجود در پوست در آب لب شور ۷ در هزار نسبت به لاروهای آب شیرین هم معنی‌دار نبود.

تعداد و شکل یونوسیت‌ها بر اساس محیطی که ماهی در آن زندگی می‌کند، متفاوت است. از نظر اندازه یونوسیت‌های جنین و لاروهایی که در آب شور زندگی می‌کنند، بزرگ‌تر از آب شیرین هستند. طی رشد و نمو لاروی تعداد زیادی از یونوسیت‌های موجود در اطراف کیسه زرده و پوست تعادل اسمزی داخل بدن با محیط خارج را برقرار می‌سازند تا زمانی

شوری مانند دو گونه یاد شده، با سن و یا اندازه مربوط باشد.

با مقایسه نتایج آزمون تاثیر شوری بر اندازه و تراکم یونوسیت‌های پوست در جداول ۱ و ۲ مشخص شد که در آب شیرین و آب با شوری ۷ در هزار تعداد یونوسیت‌ها در یک میلی‌متر مربع از سطح پوست در گروه پس از جذب کیسه زرده از لاروهای گروه اول بیشتر بود. دو شاخص دیگر یعنی سطح یونوسیت‌های موجود در پوست و اندازه یونوسیت‌ها، اختلاف محسوسی با هم نداشتند. پس با بزرگ‌تر شدن لاروها تعداد یونوسیت‌های موجود در یک میلی‌متر مربع از سطح پوست افزایش یافت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که صرف نظر از تاثیر شوری محیطی، رشد و نمو لاروها اولین عامل دخیل در افزایش تعداد یونوسیت‌ها بودند. به بیان دیگر، تولید یونوسیت‌ها در سطح پوست با افزایش سن بیشتر شد که می‌تواند منشا ژنتیکی داشته باشد و در مورد دلیل این امر تحقیقات بیشتری در آینده نیاز است. در مورد تاثیر شوری بر اندازه و تراکم یونوسیت‌های پوست لارو سوف سفید دریای خزر مشخص شد که پس از انتقال به آب لب شور ۷ در هزار در مرحله قبل از جذب کیسه زرده، تراکم و درصد سطح یونوسیت‌های موجود در پوست لارو در زمان ۹۶ ساعت، به طور قابل

که وظیفه تنظیم اسمزی لوله گوارش، آبشش و کلیه‌ها شروع شود و این وظیفه از یونوسیت‌های پوست برداشته شود. در این زمان است که تعداد یونوسیت‌های پوست بسته به رشد و نمو لارو در هر دو محیط آب شور و شیرین کاهش می‌یابد (Oguz, 2018). بنابراین، اگر در مطالعه حاضر مشاهده شد که تعداد یونوسیت‌ها در هر دو گروه لاروی و تیمارهای شوری افزایش داشتند، به این دلیل نیز می‌تواند باشد که در لاروهای سوف سفید تا زمان ۱۱ روز پس از تفریح هنوز اندام‌های دیگر دخیل در تنظیم اسمزی کاملاً تکامل نیافته‌اند و وظیفه تنظیم اسمزی تا این زمان هنوز بر عهده یونوسیت‌های پوست است (احمدنژاد و همکاران، ۱۳۹۳). مطالعات زیادی در زمینه تغییرات کمی شدید یونوسیت‌های آبشش و سرپوش آبششی در پاسخ به تغییرات شوری محیط در ماهیان استخوانی بالغ وجود دارد. اما اغلب مطالعات درباره اثرات شوری بر یونوسیت‌های پوستی لارو در تیلاپیای موزامبیک انجام شده است که این گونه عمدتاً به دلیل یوری‌هالینیتی قوی می‌تواند در هر دو محیط شور و شیرین تولیدمثل کند (Van Der Heijden, Kaneko et al., 2002) و همکاران (۱۹۹۹) افزایش دو برابری تعداد یونوسیت‌ها را در ناحیه حفره دهانی لارو

تیلاپیای موزامبیک (۲۴ ساعت بعد از تفریح) منتقل شده به آب شور پس از ۲۴ ساعت گزارش کردند. با این حال، در آزمون آن‌ها ۴ روز بعد از انتقال هیچ تفاوتی در تعداد کل یونوسیت‌ها بین گروه آب شیرین و شور یافت نشد (Van Der Heijden et al., 1999). Ayson و همکاران (۱۹۹۴) با مطالعه یونوسیت‌های کیسه زرده لارو تیلاپیای موزامبیک تفریح شده در آب‌های شیرین و شور گزارش کردند که اندازه این سلول‌ها در لارو تفریح شده در آب شور به طور معنی‌داری بزرگ‌تر از گروه تفریح شده در آب شیرین بود. در لارو تفریح شده در آب شیرین از زمان تفریح تا جذب تقریباً کامل زرده (۶ روز) اندازه یونوسیت‌ها کاهش یافته بود. در حالی که در لاروهای تفریح شده در آب شور دریا، اندازه بزرگ این سلول‌ها در طول مدت همان دوره حفظ شد. در تراکم یونوسیت‌های کیسه زرده بین گروه آب شیرین و شور تفاوت معنی‌داری یافت نشد. وقتی لاروهای تازه از تخم درآمده در آب شیرین مستقیماً به آب شور منتقل شدند، ۸ روز بعد از انتقال، اندازه یونوسیت‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت. در حالی که اندازه آن‌هایی که در آب شیرین باقی مانده بودند رو به کاهش نهاد. اما وقتی لاروهای تازه تفریح شده در آب شور، مستقیماً به آب شیرین منتقل

اسمولاریته آب پیرامون خود نگه می‌دارند که لازمه‌ی حفظ این حالت، جذب فعالانه یون‌ها از آب و غذا و بازجذب فعالانه یون‌ها از طریق کلیه و روده است. از سوی دیگر، ماهیان دریازی که در محیطی هیپراسمتیک زندگی می‌کنند (محیطی که میزان فشار اسمزی آن از فشار اسمزی بدن ماهی بیشتر است)، تنظیم اسمزی از نوع Hypoosmoregulation دارند. در این ماهیان اسمولاریته مایعات بدن همواره کمتر از میزان آن در آب دریا است و در نتیجه با هجوم یون‌ها به خون و از دست دادن آب بدن در اثر اسمز مواجه هستند (Evans et al., 2010).

جنین و لارو ماهیان استخوانی با شیب یونی و اسمزی بین مایعات بدن و محیط پیرامون خود مواجه هستند. در آن‌ها اندام‌های تنظیم اسمزی بالغین که عمدتاً آبشش‌ها، دستگاه گوارش و کلیه هستند و تحت کنترل سیستم نورواندوکرین قرار دارند، در حال رشد و نمو است و یا این که در مراحل اولیه رشد و نمو هستند و هنوز تکامل نیافته‌اند و حضور ندارند. تنظیم اسمزی در مرحله جنینی و لاروی می‌تواند شامل نفوذپذیری کم غشاهای جنینی نسبت به آب و انتشار تسهیل‌شده یون‌ها تا زمان تکامل اندام‌های تنظیم اسمزی بالغ باشد، یا به صورت تبادل فعال آب و یون انجام شود. پوست

شدند، اندازه یونوسیت‌ها ۸ روز بعد از انتقال به طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی که اندازه سلول‌ها در آن‌هایی که در آب شور باقی مانده بودند، به همان صورت حفظ شد. انتقال لاروهای تازه تفریح شده به شوری‌های متضاد بر تراکم یونوسیت‌ها تاثیر نداشت (Ayson et al., 1994). نتایج مشابهی نیز در لاروهای تفریح شده ماهی Ayu در آب شیرین که مستقیماً به آب شور منتقل شده بودند، گزارش شد. به این ترتیب که بعد از ۴۰ روز مواجهه، افزایش دو برابری در تراکم یونوسیت‌های پوست لارو آب شور در مقایسه با شاهد‌های آب شیرین دیده شد (Hwang, 1990). این تغییرات کمی در اندازه و تراکم یونوسیت‌های پوست به دنبال چالش‌های شوری، به شدت از اهمیت وظیفه و عملکرد این سلول‌ها در تنظیم اسمزی، در طول مدت رشد و نمو اولیه لاروهای ماهیان استخوانی حمایت می‌کند.

ماهیان آب شیرین که در محیطی هیپواسمتیک نسبت به بدن خود زندگی می‌کنند (محیطی که میزان فشار اسمزی آن از فشار اسمزی بدن ماهی کمتر است)، تنظیم اسمزی از نوع Hyperosmoregulation انجام می‌دهند. به این معنی که همواره میزان اسمولاریته مایعات بدن خود را بالاتر از میزان

مکانیسم تنظیم تعادل یونی را در بدن لارو در طول مراحل اولیه رشد و نمو توضیح می‌دهد، مرحله‌ای که لاروها در آن، با فقدان عملکرد آبشش‌ها مواجه هستند. اما تا زمان شروع عمل نوشیدن و تولید ادرار، مکانیسم فعالی برای حفظ تعادل آب در جنین ماهی‌ها وجود ندارد. احتمالاً قبل از این که روده و کلیه عملکرد خود را آغاز کنند، نفوذپذیری اپیدرم نسبت به انتشار آب کم باقی می‌ماند تا از ورود آب به بدن در محیط آب شیرین و از دست دادن آب در محیط آب دریا جلوگیری کند (Kaneko et al., 2002; Evans et al., 2010). بنابراین، در مراحل اولیه رشد و نمو ماهی، پوست در تنظیم یون و آب بدن نقش محوری ایفا می‌کند و احتمال می‌رود قرار گرفتن در معرض شوری به عنوان محرکی برای بیان ژن‌های مربوط به تمایز سلول‌های پوست در جهت تبدیل شدن به یونوسیت‌هایی باشند که بتوانند تعادل یون و آب را در بدن لارو در هنگام رشد و نمو اولیه برقرار سازند. از این رو، می‌توان گفت در مطالعه حاضر یکی از عوامل دخیل در زنده ماندن ۲۰ درصد از لاروهای مرحله پس از جذب زرده در شوری ۱۲ در هزار آب دریای خزر، افزایش یونوسیت‌های پوستی در بدن آن‌ها بود که توانست تنظیم اسمزی لاروها را در شرایط هیپراسموتیک برقرار کند. به هر

لارو ماهیان استخوانی تازه از تخم خارج شده چندین وظیفه فیزیولوژیک مهم برعهده دارد. علاوه بر نقش حفاظتی، پوست در تنظیم اسمزی، تنفس و ترشح (دفع) دخالت دارد. برای تبادلات موثر تنفسی و تنظیم اسمزی پوست باید به میزان کافی نازک باشد تا تبادل گازها را امکان‌پذیر سازد و این مهم‌تر از نقش ساختاری آن به عنوان محافظ فیزیکی پوست در بالغین است. اهمیت پوست در مراحل اولیه رشد و نمو بر این حقیقت استوار است که نسبت سطح به حجم در این دوره از زندگی لارو بالا است و طی رشد و نمو کاهش می‌یابد. در طول رشد و نمو اولیه سطح بدن کندتر از توده بدن افزایش می‌یابد، اما در همان زمان نرخ متابولیسم بر اساس شاخص توده بدن در لارو کوچک، مانند لارو بزرگ است. بنابراین، سطح نسبی پوست موجود برای تبادلات در لارو کوچک نسبت به ماهی بزرگ‌تر، بیشتر است (Varsamos et al., 2005).

امروزه مشخص شده است که سلول‌های کلراید غشای کیسه زرده و پوست بدن برای تنظیم یونی در طی مراحل ابتدایی زندگی ماهیان ضروری هستند. سلول‌های کلراید خارج آبشش در آب دریا جایگاه ترشح و در آب شیرین مکان بازجذب یون‌ها است. این موضوع احتمالاً



حال، به دلیل پایین بودن نرخ بقای لاروها در این شوری نمی‌توان رهاسازی مستقیم لاروهای سوف سفید را به دریای خزر به طور قطعی پیشنهاد کرد و مطالعات گسترده‌تری در این باره در آینده نیاز است.

### تشکر و قدردانی

از ریاست محترم سابق پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی (بندر انزلی) سرکار

خانم دکتر فلاحی، ریاست محترم سابق ایستگاه تحقیقاتی تخصصی تغذیه و غذای زنده آبزیان ساحل غازیان جناب آقای مهندس دقیق روحی و کارکنان گرامی‌شان، ریاست و کارکنان محترم مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی دکتر یوسف‌پور سیاهکل همچنین از جناب آقای دکتر خدابنده و عزیزان دیگری که در انجام این مطالعه ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود.

## منابع

- lucioperca*. فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۷(۲): ۳۹-۴۸.
- عبدلی ا. ۱۳۷۸. ماهیان آب‌های داخلی ایران. انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش ایران. ۳۷۷ص.
- Ayson F.G., Kaneko T., Hasegawa S. and Hirano T. 1994.** Development of mitochondria rich cells in the yolk sac membrane of embryos and larvae of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and sea water. Journal of Experimental Zoology, 270: 129-135.
- Bancroft J.D. and Stevens A. 1977.** Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, UK. 436P.
- Bodinier C., Sucre E., Lecurieux-Belfond L., Blondeau-Bidet E. and Charmantier G. 2010.** Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Comparative Biochemistry and Physiology (A), 157: 220-228.
- Craig J.F. 2000.** Percid fishes: Systematic, Ecology and Exploitation. Blackwell Science, USA. 352P.
- Evans T.G. 2010.** Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and signal transduction events in fishes. Journal of Fish Biology, 76: 1903-1925.
- Ghanizadeh Kazerouni E. and Khodabandeh S. 2011.** Ionocyte immunolocalization and the effects of ultraviolet radiation on their abundance and distribution in the alelins of Caspian Sea salmon, *Salmo trutta caspius*. Cell Journal (Yakhteh), 13(1): 45-54.
- Hamza N., Mhetli M., Khemis I.B., Cahu C. and Kestemont P. 2008.** Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. Aquaculture, 275: 274-282.
- Hiroi J., Kaneko T., Seikai T. and Tanaka M. 1998.** Developmental sequence of chloride cells in the body skin and gills of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. Zoological Science, 15: 455-460.
- Hiroi J., McCormick S.D., Ohtani-Kaneko R. and Kaneko T. 2005.**
- احمدنژاد م.، عربان ش.، بهمنی م. و صیاد بورانی م. ۱۳۹۳. روند ظهور یونوسیت‌های آبشش و پوست در مراحل اولیه رشد و نمو لارو سوف سفید دریای خزر (*Sander*

- Functional classification of mitochondrion rich cells in euryhaline Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* embryos by means of triple immunofluorescence staining for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, cotransporters and CFTR anion channel. *Journal of Experimental Biology*, 208: 2023–2036.
- Hirose S., Kaneko T., Naito N. and Takei Y. 2003.** Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136: 593–620.
- Hwang P.P. 1990.** Salinity effects on development of chloride cells in the larvae of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Marine Biology*, 107: 1–7.
- Hwang P.P., Sun C.M. and Woo S.M. 1989.** Changes of plasma osmolarity, chloride concentration and gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. *Marine Biology*, 100: 295–233.
- Kaneko T. and Hiroi J. 2008.** Osmo and ionoregulation. P: 163–183. In: Finn R.N. and Kapoor B.G. (Eds.). *Fish Larval Physiology*. Science Publishers, USA.
- Kaneko T., Shiraishi K., Katoh F., Hasegawa S. and Hiroi J. 2002.** Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. *Fisheries Science*, 68: 1–9.
- Kaneko T., Watanabe S. and Kyung Min L. 2008.** Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. *Aqua Bioscience Monographs*, 1(1): 1–62.
- Khodabandeh S., Charmantier G. and Chramantier-Daures M. 2006.** Immunolocalization of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and post-embryonic development of the lobster, *Homarus gammarus*. *Journal of Crustacean Biology*, 26(4): 515–523.
- Khodabandeh S., Mosafer S. and Khoshnood Z. 2009a.** Effect of cortisol and salinity acclimation on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> cotransporter gene expression and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in gill of Persian sturgeon *Acipenser persicus* fry. *Scietia Marina*, 73: 111–116.
- Khodabandeh S., Shahriari M. and Abtahi B. 2009b.** Changes in chloride cells abundance Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase immunolocalization and activity in gills of golden grey mullet, *Liza aurata* fry during adaptation to different salinities. *Yakhteh Medical Journal*, 11: 49–54.
- Lasker R. and Threadgold L.T. 1968.** Chloride cells in the skin of the larval sardine. *Experimental Cell Research*, 52: 582–590.

- Lignot J.H., Nugroho susanto G., Charmantier-daures M. and Charmantier G. 2001.** Immunolocalization of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in the branchial cavity during the early development of cray fish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell and Tissue Research*, 319: 331–339.
- Nebel C., Romestand B., Negre-Sadargues G., Grousset E., Aujoulat F., Bacal J., Bonhomme F. and Charmantier G. 2005.** Differential freshwater adaptation in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*: Involvement of gills and urinary system. *Journal of Experimental Biology*, 208: 3859–3871.
- O'connell C.P. 1981.** Development of organ systems in the northern anchovy *Engraulis mordax* and other teleosts. *American Zoology*, 21: 429–446.
- Oguz A.R. 2018.** Development of osmoregulatory tissues in the Lake Van fish (*Alburnus tarichi*) during larval development. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44: 227–233.
- Rambourgh P.J. 1999.** The gill of fish larvae. Is it primarily a respiratory or an ionoregulatory. *Journal of Fish Biology*, 55(A): 186–204.
- Shelbourne J.E. 1957.** Site of chloride regulation in marine fish larvae. *Nature*, 180: 920–922.
- Shikano T. and Fujio Y. 1999.** Changes in salinity tolerance and branchial chloride cells of newborn guppy during freshwater and seawater adaptation. *Journal of Experimental Zoology*, 284: 137–146.
- Van Der Heijden A.J.H., Van Der Meij J.C.A., Flik G. and Wendelaar Bonga S.E. 1999.** Ultra-structure and distribution dynamics of chloride cells in tilapia larvae in fresh water and sea water. *Cell Tissue Research*, 297: 119–130.
- Varsamos S., Connes R., Diaz J.P., Barnabe G. and Charmantier G. 2001.** Ontogeny of osmoregulation in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Marine Biology*, 138: 909–915.
- Varsamos S., Nebel C. and Charmantier G. 2005.** Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 141: 401–429.
- Wales B. and Tytler P. 1996.** Changes in chloride cell distribution during early larval stages of *Clupea harengus*. *Journal of Fish Biology*, 49: 801–814.



Research Paper

**Ionocyte changes in the skin of *Sander lucioperca* larvae exposed to different salinities**

Mohaddeseh Ahmadnezhad<sup>1\*</sup>, Shahrbanoo Oryan<sup>2</sup>, Mahmoud Bahmani<sup>3</sup>,  
Mohammad Sayad Bourani<sup>4</sup>

Received: August 2020

Accepted: October 2020

**Abstract**

The aim of the present study was to evaluate the osmoregulation ability of zander (*Sander lucioperca*) at two larval stages including before (group “a”) and after (group “b”) yolk sac absorption. Both groups were exposed to freshwater (less than 0.5‰ salinity), estuarine conditions (7‰) and Caspian Sea water (12‰) for 96h. Larva survival rate and chloride cell number, size and the its surface percentage were examined by classical histology using H & E staining and immunolocalization of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Survival rate was 97% for both groups in freshwater and was 86% and 97%, respectively for group “a” and “b” at 7‰ salinity. At 12‰ salinity, all larvae in group “a” died while 20% of group “b” survived. The size of skin chloride cells did not change in the face of different salinity. At the end of the experiment, the number and the surface percentage of chloride cells significantly increased in the group “a” at 7‰ salinity and in group “b” at 12‰ salinity (P<0.05). The results showed that in the Caspian Sea zander larvae, the function of skin chloride cells in osmoregulation improved with development of body and it could act in such a way that the survival rate in the post-yolk sac uptake stage was more than the pre-yolk sac uptake stage exposed to salinity.

**Key words:** Caspian Sea, Zander, Osmoregulation, Immunohistochemistry, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

1- Assistant Professor in Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.

2- Professor in Biology Department, Biology Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran.

3- Professor in Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

4- Associate Professor in Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.

\*Corresponding Author: [m\\_ahmadnezhad@yahoo.com](mailto:m_ahmadnezhad@yahoo.com)