مطالعه تغییرات سلول‌های غدد آنتنی خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) تحت تاثیر شوری‌های متفاوت

مجید عسکری حصنی[1*]، فاطمه لواجو[2]

۱- عضو هیئت علمی و استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، استان کرمان، پست الکترونیکی: mahesni@gmail.com

۲- کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، استان گیلان، پست الکترونیکی: f.lavajoo@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۴ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۴*

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۳، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

تنظیم اسمزی یکی از مکانیسم‌های فعال بدن خرچنگ دراز آب شیرین است که اغلب توسط غدد آنتنی، لوله گوارش و آبشش انجام می‌شود که در این تحقیق تاثیر شوری بر تغییرات سلول‌های غدد این سخت پوست شیرین مطالعه شد. در این پژوهش نمونه‌ها در گروه شاهد (آب شیرین) و ۵ تیمار شوری با غلظت‌های ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ گرم در لیتر با سه تکرار قرار گرفتند. تمامی تیمارها به مدت ۷۲ ساعت در شوری مورد نظر باقی مانده و پس از آن به‌طور ناگهانی به آب شیرین منتقل شدند. نمونه‌های بافت غدد آنتنی در هر تیمار قبل و بعد از شوک شوری استخراج و بلافاصله در محلول بوئن تثبیت شدند، سپس مقاطع ۵ میکرون تهیه و با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شده و به‌وسیله میکرومتر و میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. در بررسی تغییرات سلولی غدد آنتنی، از نمونه‌ی شاهد تا شوری ۱۲ گرم در لیتر به ترتیب کاهش اندازه سلول‌های لابیرنت و کیسه سلومی غدد آنتنی مشاهده شد. در مقابل، پس از ایجاد شوک شوری اندازه سلول‌ها افزایش یافت و هیپرپلازی مشاهده گردید. افزایش حجم سلولی در تیمارهای ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ گرم در لیتر به‌ترتیب با قطر ۵۹/۱۲، ۶۲/۱۸، ۷۰/۱۳، ۷۷/۶۶ و ۷۹/۸۰ میکرون مشاهده شد. بر اساس آنالیز آماری، رابطه معنی‌داری بین شوری محیط و اندازه سلول‌ها به‌دست آمد ($P<0/05$). این تغییرات نشان دهنده افزایش اسمولاریته سلولی، جذب آب و در نتیجه افزایش اندازه سلول‌ها در هر تیمار بعد از شوک می‌باشد. طبق این پژوهش در اثر تغییر شوری و اسمولاریته محیط سلول‌های غدد آنتنی تحت تاثیر قرار گرفته و از طریق بازجذب یا ترشح مایعات غدد آنتنی باعث تنظیم اسمزی بدن می‌شوند.

کلمات کلیدی: *غدد آنتنی، تغییرات سلولی، شوری، خرچنگ دراز آب شیرین.*

۱. مقدمه

در فرآیند دفع و تنظیم اسمزی، حجم مایعات بدن و همچنین فشار اسمزی و ترکیبات یونی کنترل می‌شود. بنابراین، این نظریه وجود دارد که تنظیم اسمزی[1] به‌عنوان یک واکنش سازگاری در موجودات است که به‌وسیله آن جانوران قادرند در محیط‌های با شوری کم، زیاد و یا متغییر زندگی کنند (Nagarajua, 2007).

در ده پایان سه اندام آبشش، سامانه گوارشی و غدد آنتنی در اعمال دفعی و تنظیم یونی دخالت دارند. غدد آنتنی نوعی اندام دفعی در خرچنگ دراز آب شیرین هستند که در پایه‌ی چشمی قرار گرفته‌اند. این اندام در دفع مواد زائد متابولیکی، سمی و همچنین در تنظیم شرایط هموستاتیک همولنف نقش دارند (Holdich et al., 1997, Khodabandeh et al., 2005a). غدد آنتنی در این جانوران توسط دو رگ آنتنی و سینه‌ای خون‌دهی می‌شود و همانند سامانه کلیوی مهره‌داران، این اندام در نگهداری حجم مایع خارج سلولی، تنظیم غلظت یون‌ها، مواد غذایی و دیگر مواد حل شده، نقش دارند (Mantel and Farmer, 1983; Khodabandeh et al., 2005b).

در ده پایان دریایی علاوه بر کنترل حجم همولنف، غدد آنتنی در تنظیم هیپر اسمزی منیزیم و سولفات همولنف، ترشح ترکیبات آلی و بازجذب مایع، قندها و اسیدهای آمینه از ادرار فیلتر شده اولیه نیز دخالت می‌کنند (Mantel and Farmer, 1983; Pequeux, 1995). مطالعات نشان داده که در گونه‌های لابستر Homarid از جنس *Homarus* نمونه‌های جوان و بالغ در شرایط آب دریا فاقد سامانه تنظیم اسمزی و در محیط رقیق، فعالیت تنظیم اسمزی کمی دارند (Charmantier et al., 2001). ظاهراً تنظیم اسمزی در این جانوران از طریق تنظیم اسمزی بالای سدیم و مقدار کمتر کلر و پتاسیم در شوری‌های بالا انجام می‌شود و نسبت به منیزیم در تمام شوری‌ها تنظیم اسمزی را انجام می‌دهند (Charmantier et al., 2001).

سخت‌پوستان، به‌خصوص ده پایان، دارای مهاجرت تولیدمثلی از ساحل به عمق یا از رودخانه به مصب و دریا می باشند بنابراین تحت تاثیر تغییرات شوری، سامانه تنظیم اسمزی آنها فعال می‌گردد (Holdich, 2002, Whiteley et al., 2001). اگرچه عملکرد فعال غدد آنتنی در تنظیم اسمزی ده پایان آب شیرین کمتر مطالعه شده است، اما در مورد تغییرات سلولی بافت غده آنتنی خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) در شوری های مختلف و تحت تاثیر شوک شوری، تحقیقی صورت نگرفته است. در این پژوهش تغییرات سلولی غدد آنتنی در شرایط شوک شوری بررسی شده است تا میزان تاثیر شوری بر روی اندازه سلول‌ها و تغییرات بافتی غدد آنتنی در شرایط مختلف بیان شود.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌های خرچنگ دراز آب شیرین (*A. leptodactylus*) از استخرهای خاکی واقع در ایستگاه تحقیقات شیلاتی سفید رود شهر آستانه اشرفیه تهیه شدند. نمونه‌های تهیه شده به آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی دریا دانشگاه گیلان منتقل و در وان‌های پلاستیکی ۱۰۰ لیتری با هوادهی مناسب قرار گرفتند. نمونه‌ها طی دو هفته در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. برای تغذیه نمونه‌ها، به نسبت هر شاه میگو یک قطعه ماهی کیلکا با وزن ۱/۱ گرم استفاده شد. برای تمیز نگهداشتن محیط جانور هر دو روز یک بار آب آکواریوم‌ها با شوری و دمای مشابه تعویض می‌گشت. همچنین غذای باقیمانده هر روز سیفون شده و بر حسب میزان تغذیه نمونه‌ها، مجدداً غذادهی انجام می‌شد. پس از دو هفته، نمونه‌ها برای آزمایش استفاده شدند. این فاصله‌ی زمانی بین انتقال نمونه‌ها و شروع آزمایش به خاطر سازگاری موجود با محیط جدید بود، تا اینکه تمام عوامل تأثیر گذار مثل ترشح هورمون ها در اثر تنش و همچنین تلفات به حداقل امکان کاهش یابد.

در زمان شروع آزمایش نمونه‌ها زیست‌سنجی شده و در آکواریوم‌های ۵۰ لیتری با هوادهی مرکزی قرار گرفتند. اندازه‌گیری وزن توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم و اندازه‌گیری طول کل و کاراپاس به‌وسیله کولیس با دقت ۰/۱ میلیمتر انجام شد. ۱۰۸ نمونه خرچنگ در قالب یک گروه شاهد و پنج گروه تیمار با سه تکرار در نظر گرفته شد. برای گروه شاهد، محیط طبیعی با آب شیرین و تیمارهای آزمایشی شامل شوری‌های ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ گرم در لیتر بودند. برای تهیه آب با شوری مورد نظر، به تدریج نمک دریا به آب شهر افزوده شد. تغییر شوری برای نمونه‌های مورد مطالعه در گروه‌های آزمایشی به‌تدریج و به میزان یک گرم در لیتر در ساعت صورت گرفت. سازش جانور با شوری جدید توسط حرکات معمول آن مشخص

[1] Osmoregulation

بود. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت از زمان تعیین شوری نهایی، در شوری مورد نظر قرار گرفته و پس از آن به‌طور ناگهانی به آب شیرین هم دما منتقل شدند.

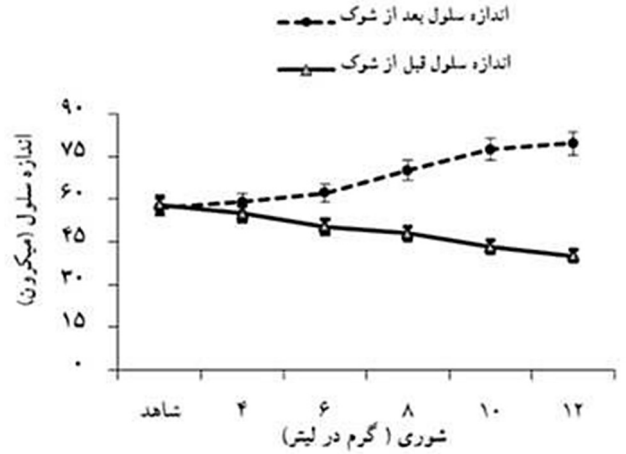
در زمان قبل از شوک و شش ساعت بعد از شوک از تیمارها نمونه‌برداری و غده سبز هر نمونه استخراج گردید. بلافاصله بافت‌های تهیه شده در محلول بوئن قرار گرفته و بعد از ۴۸ ساعت به الکل ۷۰ درصد منتقل و سپس نمونه‌های تثبیت شده وارد مراحل پاساژ بافت (مرحله آبگیری، مرحله شفاف کردن، تهیه بلوک‌های پارافینی، برش گیری و قرار دادن مقاطع روی لام) شدند (Adams and Bonami, 1991; Luna, 1968). برش‌های بافتی به قطر ۴ تا ۵ میکرون به‌وسیله میکروتوم تهیه شدند (Lightner, 1996) و به روش هماتوکسیلین – ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری و میکرومتر تغییرات سلولی مورد بررسی قرار گرفتند (Bell and Lightner, 1988,). تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده از طریق نرم افزار SPSS و رسم نمودار به‌وسیله نرم افزار Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون‌های آنالیز واریانس استفاده شد.

۳. نتایج

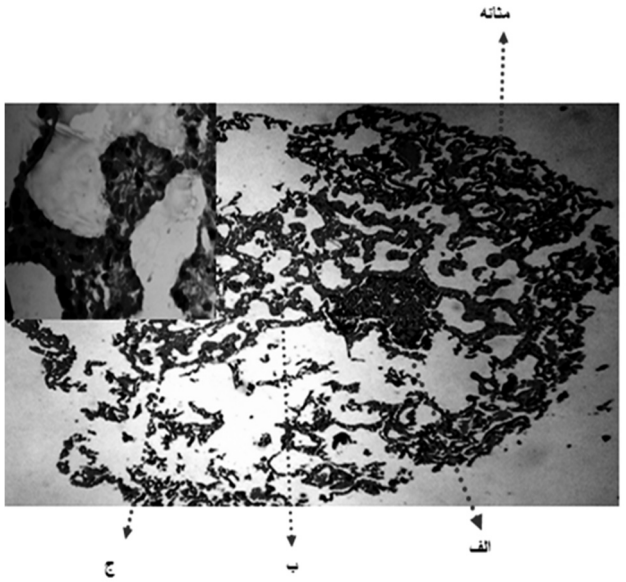
بر اساس نتایج زیست‌سنجی، میانگین وزن نمونه‌ها ۴/۷± ۱۹/۸۷ گرم، طول کل ۸/۶± ۸۷/۸۷ میلیمتر و طول کاراپاس ۴/۴± ۴۵/۸ میلیمتر به‌دست آمد.

بر اساس بررسی‌های بافت شناسی جایگاه مثانه و سایر بخش‌های مختلف غده آنتنی مشخص شد، به‌طوری‌که مثانه به‌صورت کیسه‌ای روی سطح غده آنتنی را می‌پوشاند همچنین بخش‌های مختلف غده آنتنی به ترتیب شامل کیسه سلومی، لوله‌های نفریدی، لابیرنت بودند که لابیرنت به مثانه متصل می‌شود (شکل ۱).

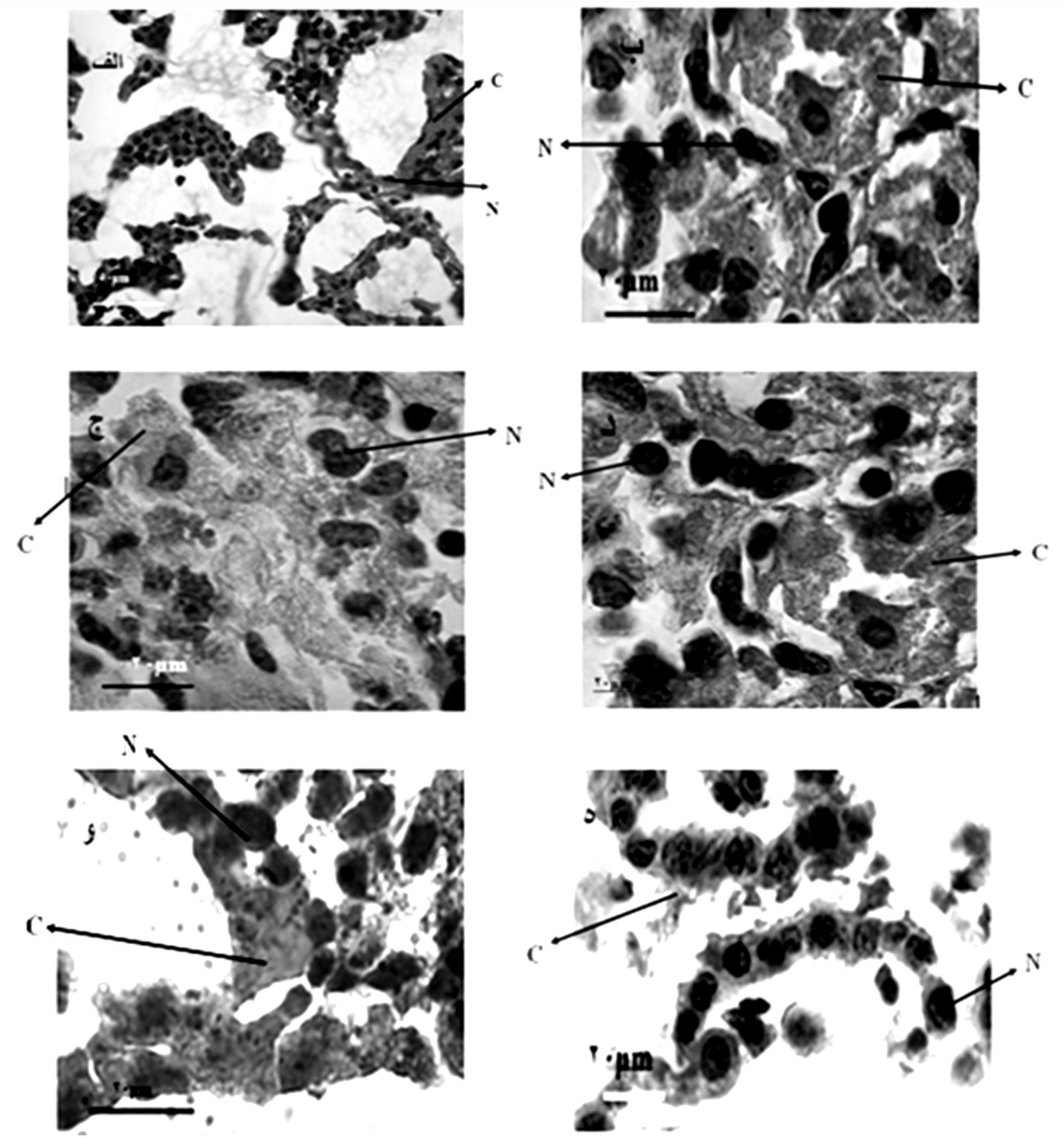
بر طبق اندازه‌گیری‌ها، میانگین اندازه سلول‌های ناحیه کیسه سلومی و لابیرنت در گروه شاهد ۵۷/۶۲ میکرون و میانگین اندازه سلول‌ها در تیمارهای ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ گرم در لیتر در زمان قبل از شوک شوری به‌ترتیب ۵۵/۱۴، ۵۰/۴۹، ۴۸/۱۳، ۴۳/۲۳ و ۴۰/۱۹ میکرون و بعد از شوک شوری به‌ترتیب ۵۹/۱۲، ۶۲/۱۸، ۷۰/۱۳، ۷۷/۶۶ و ۷۹/۸۰ میکرون به‌دست آمد (شکل ۲). بر طبق نتایج به‌دست آمده اندازه سلول‌ها قبل از شوک شوری (انتقال از محیط هیپرتونیک به محیط هیپوتونیک) به‌ترتیب از تیمار ۴ گرم در لیتر تا تیمار ۱۲ گرم در لیتر کاهش پیدا کرد و اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای شاهد و ۴ گرم در لیتر مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). البته بین گروه شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). به‌علاوه بعد از شوک، اندازه سلول‌ها از نمونه شاهد تا تیمار ۱۲ گرم در لیتر افزایش یافت (نمودار ۱). بر اساس آزمون توکی در نمونه‌های پس از شوک شوری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای شاهد، ۴ و ۶ گرم در لیتر و بین تیمارهای ۱۰ و ۱۲ گرم در لیتر دیده نشد (P>۰/۰۵).



نمودار ۱: تغییرات سلولی غده آنتنی در شوری های مختلف در محیط هیپرتونیک و هیپوتونیک



شکل ۱: برش عرضی اعضای تشکیل دهنده بافت غده سبز در خرچنگ دراز آب شیرین (*A. leptodactylus*) الف- کیسه سلومی ب- لابیرنت، ج- لوله‌های نفریدی د- مثانه (خط مقیاس: ۱۵۰ میکرومتر، هماتوکسیلین- ائوزین).



شکل ۲: مقاطع بافتی، سلول‌های غده آنتنی بعد از شوک شوری: الف- نمونه شاهد، ب- تیمار شوری ۴ گرم در لیتر، ج- تیمار شوری ۶ گرم در لیتر، د- تیمار شوری ۸ گرم در لیتر، ه- تیمار شوری ۱۰ گرم در لیتر، و- تیمار شوری ۱۲ گرم در لیتر (پارگی بخش سیتوپلاسم برخی سلول‌ها)، N: هسته C: سیتوپلاسم. (خط مقیاس: ۵۰ میکرومتر، هماتوکسیلین-ائوزین).

از سوی دیگر بین گروه شاهد با تیمارهای ۸، ۱۰ و ۱۲ گرم در لیتر و همچنین گروه ۴ و ۶ با تیمارهای ۱۰ و ۱۲ اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۵). بر طبق رگرسیون خطی یک رابطه معنی‌داری بین افزایش شوری و افزایش اندازه سلول‌ها بعد از شوک شوری مشاهده شد (P<۰/۰۵). بر اساس آنالیز آماری در بین اندازه سلول‌ها در تیمارهای بعد و قبل از شوک شوری به غیر از تیمارهای ۴ گرم در لیتر قبل و بعد از شوک شوری در سایر تیمارهای قبل و بعد از شوک شوری، اختلاف معنی‌دار دیده شد (P<۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات بافت‌شناسی بخش‌های مختلف غده سبز از جمله کیسه سلومی، لابیرنت و لوله‌های نفریدی مشخص شد که لوله‌های مارپیچ نفریدی در نهایت به مثانه متصل می‌شدند. در خرچنگ دراز آب شیرین از گونه *Orconectes virilis*، بخش‌های مختلف غده سبز به‌طور کامل مشاهده شده است (Shivers and Chauvin, 1977)، در حالی‌که در لابستر گونه *Homarus gammarus* لوله‌های نفریدی مشاهده نشده است (Khodabandeh et al., 2005a). در خرچنگ‌های دراز آب شیرین، نقش اصلی لوله‌های نفریدی، بازجذب نمک فیلتر شده می‌باشد در نتیجه ادرار رقیق (هیپواسمتیک) دفع می‌کنند که به‌عنوان یک سازگاری کلیدی در محیط‌های با غلظت‌های پایین املاح است. در حالی که در نمونه‌های لابستر (شاه میگوی آب شور) با توجه به اینکه نیاز به بازجذب املاح ندارند و ادرار ایزوتونیک با همولنف بدن تولید می‌کنند، این بخش دیده نمی‌شود (Sesma et al., 1983; Fuller et al., 1989; Khodabandeh et al., 2005a).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و بر طبق نتایج به‌دست آمده، اندازه سلول‌ها قبل از شوک شوری (انتقال از محیط هیپرتونیک به محیط هیپوتونیک) به‌ترتیب از تیمار ۴ گرم در لیتر تا تیمار ۱۲ گرم در لیتر کاهش پیدا کرد و بعد از شوک اندازه سلول‌ها از نمونه شاهد تا تیمار ۱۲ گرم در لیتر افزایش یافت (نمودار ۱). در مطالعاتی که بر روی سلول‌های یونوسیت آبشش و سلول های کلیوی ماهیان نیز انجام شده است، تغییر اندازه و یا تعداد سلولی گزارش شده است. در مطالعه‌ای که بر روی ماهی شانک انجام شد، مشخص شد که با افزایش میزان شوری اندازه و تعداد سلول‌های تنظیم کننده سامانه اسمزی در آبشش افزایش می‌یابند (موحدی‌نیا، ۱۳۸۸). پور خواجه و همکاران (۱۳۹۰) نقش سلول‌های کلراید آبششی در تنظیم اسمزی و جایگاه آنها در آبشش لارو ماهیان هامور را مطالعه و بررسی نمودند.

برخی مطالعات نیز تغییرات موقت در تعداد و اندازه‌ی سلول‌های کلراید را گزارش کرده‌اند. Altinok و همکاران (۱۹۹۸) در مطالعه تغییرات سلول‌های تنظیم اسمزی آبشش (سلول‌های کلراید) در نوعی گونه ماهی خاویاری (*Acipenser oxyrinchus*) طی انتقال از آب دریا به آب شیرین و از آب شیرین به آب دریا گزارش کردند که در روزهای ابتدایی آداپتاسیون، تعداد و اندازه سلول‌های کلراید و همچنین اندازه سلول‌های کلیوی در نمونه‌های آب دریا از آب شیرین بیشتر است.

پاسخ افزایش اندازه و تعداد سلول‌ها در شوری‌های مختلف با نیاز به ظرفیت انتقال یون بیشتر، مرتبط است و احتمالاً نشانه‌ی افزایش در پمپ‌ها و ناقلین یون است. قابل تصور است که سلول‌های بزرگ‌تر می‌توانند تعداد پمپ بیشتری داشته باشند و بنابراین افزایش اندازه و تعداد را به افزایش فعالیت آنزیمی ارتباط دادند (موحدی نیا، ۱۳۸۸).

مطالعات مختلف بر روی غدد آنتنی خرچنگ‌های دراز آب شیرین، شور و خرچنگ‌های گرد نشان داده که سلول‌های کیسه سلومی نقش فعالی در فیلتراسیون و ترشح مواد دفعی دارند و همچنین نتایج تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بخش لابیرنت در انتقال فعال یون‌ها، در فیلتراسیون، بازجذب و ترشح و همچنین جذب موادی مثل گلوکز، اسیدهای آمینه، پروتئین‌های کوچک، آب و املاح نقش بسزایی دارند و با تغییر اسمولاریته اندازه آنها تغییر می‌کند (Fuller et al., 1989; Susanto and Charmantier, 2000; Khodabandeh et al., 2005a).

طبق پژوهش حاضر، سلول‌های غده آنتنی در شرایط اسمولاریته مختلف تغییر اندازه می‌دهند و بر اساس این تحقیق، رابطه معنی‌داری بین افزایش اندازه سلول‌ها بعد از شوک شوری با میزان شوری دیده شد ($P<0/05$)، به‌طوری‌که در شوری‌های بالا اندازه سلول‌ها بعد از شوک افزایش چشمگیری داشت و این نتایج نشان دهنده این است که غده سبز از طریق بازجذب یا دفع آب در تنظیم اسمزی نقش بسزایی دارد. بر طبق گزارش Neufeld و Cameron (۱۹۹۴) خرچنگ‌های گرد (*Callinectes sapidus*) زمانی که در شوری بالا و شرایط هیپر اسمتیک قرار می‌گیرند، اندازه سلول‌ها کوچک و چروکیده می‌گردند و در زمانی‌که در شوری‌های پایین آب دریا قرار دارند اندازه سلول‌ها بزرگتر بوده و حجم ادراری غده آنتنی بالا می‌رود (Khodabandeh et al., 2005 a,b). در مورد تغییر سلولی و اندازه غده آنتنی و تغییر تعداد و جایگاه پمپ‌های سدیم – پتاسیم در شرایط اسمزی مختلف در مورد گونه‌های *A. leptodactylus* و *Homarus gammarus* نیز گزارشاتی ارائه شده است. بدین صورت که در شرایط هیپراسمتیک تعداد و فعالیت این پمپ‌ها زیاد می‌شود، بنابراین میزان جابه‌جایی یون‌ها در شوری بالا افزایش می‌یابد (Holdich, 2002). در این آزمایش نیز در مدت

زمان ماندگاری در شرایط هیپرتونیک (۷۲ ساعت) احتمالاً میزان یون‌ها افزایش یافته بود که تحت تاثیر شوک و ورود به شرایط هیپوتونیک سلول‌ها آب جذب کرده و افزایش قطر داشتند. در گونه میگوی آب شیرین تحت تاثیر شوک شوری زمانی که میگوها به آب شیرین منتقل شدند میزان یون‌ها به‌خصوص منیزیم کاهش و حجم ادرار افزایش یافت (Lin et al., 2000).

بنابراین تحقیقات در مورد گونه‌های مختلف سخت‌پوستان از جمله خرچنگ دراز آب شیرین نشان داده است که میزان اسمولاریته در محیط آب شور افزایش می‌یابد و این افزایش بر روی سلول‌های غدد آنتنی تاثیر گذاشته و اندازه سلول‌ها کوچکتر و سلول چروکیده می‌شود که این نتایج نشان از نقش بارز غدد آنتنی در فرآیند تنظیم اسمزی خرچنگ دراز آب شیرین است.

۵. سپاسگزاری

بدین وسیله از دکتر نادر شعبانی پور دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه گیلان و تمام کسانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع

پورخواجه، م.؛ عبدی، ر.؛ ذوالقرنین، ح.؛ حسین‌زاده صحافی، ه.؛ مروتی، ح.، ۱۳۹۰. بافت شناسی و مکان یابی ایمنیایی سلول های یونوسیت در آبشش بچه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*). نشریه اقیانوس‌شناسی، سال دوم، شماره ۶، صفحات ۶-۱.

موحدی نیا، ع.، ۱۳۸۸. مکانیسم‌های تنظیم اسمزی در ماهی‌شانک (*Acanthopagrus latus*): مطالعه اکوفیزیولوژیکی، بافت‌شناختی و فراساختاری آبشش. پایان نامه مقطع دکتری، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صفحات ۷۷-۵۳.

Adams, J.R.; Bonami, J.R., 1991. Preparation of invertebrate viruses and tissues for examination In: Atlas of Invertebrate Viruses (Eds.J.R. Adams and J.R. Bonami) Boca Raton, CRC press. Inc., 9-30 pp.

Altinok, I.; Galli, S.M.; Chapman, F.A., 1998. Ionic and osmotic regulation capabilities of juvenile Gulf of Mexico sturgeon, *Acipenser oxyrinchus* de sotoi. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 120: 609–616.

Bell, T.A.; Lightner, D.V., 1988. A hand book of normal Penaeid shrimp histology, Baton Rouge, AL: World Aquaculture Society.

Charmantier, G.; Hoand, C.; Lignot, J.H.; Charmantier-Daures, M., 2001. Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: a review in Homarid lobsters. The Journal of Experimental Biology, 204: 967–977.

Fuller, E.G.; Highison, G.J.; Brown, F.; Bayer, C., 1989. Ultrastructure of the crayfish antennal gland revealed by scanning and transmission electron microscopy combined with ultrasonic microdissection. Journal of Morphology, 200: 9–15.

Holdich, D.M., 2002. Biology of Freshwater Crayfish. Blackwell Science Ltd. 510 pp.

Holdich, D.M.; Harlioglu, M.M.; Firkins, I., 1997. Salinity adaptations of the crayfish in British waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus*. Journal of Estaurina, Coastal and Shelf Science, 44: 147-54.

Khodabandeh, S.; Charmantier, G.; Blasco, C.; Grousset, E.; Charmantier-Daures, M., 2005a. 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.; Charmantier, G.; Charmantier-Daures, M., 2005b. Ultrastructural studies and Na, K–Atpase immunolocalization in the antennal glands of the Lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 53: 1203-1214.

Lightner, D.V., 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic Procedures for diseases of cultured

Journal of Experimental Biology, 188: 11-23.

Pequeux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. Journal of Crustacean Biology, 15: 1-60.

Sesma, P.; Bayona, C.; Villaro, A.C.; Vazquez, J.J., 1983. A microscopic study on the antennal gland of *Antrapotamobius ballines* (Crustacea, Decapoda). Morfologia Normaly Patologica, 7: 289-301.

Shivers, R. R.; Chauvin, W. J., 1977. Intercellular junctions of antennal gland epithelial cells in the crayfish, *Orconectes virilis*. Cell and Tissue Research, 175(4): 425-438.

Susanto, G.N.; Charmantier, G., 2000. Ontogeny of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. Physiological and Biochemical Zoology. 73: 169-176.

Whiteley, N.M.; Scott, J.L.; Breeze, S.J.; McCann, L., 2001. Effects of water salinity on acid-base balance in Decapod crustaceans. The Journal of Experimental Biology, 204: 1003–1011.

Penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.

Lin, S.C.; Liou, C.H.; Cheng, J.H., 2000. The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. Comparative Biochemistry and Physiology, 127: 121-129.

Luna, L.G., 1968. Manual of histological methods of the Armed Forces Institute of pathology, New York: The Blackstone Division, McGraw-Hill Book Company.

Mantel, L.H.; Farmer, L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation. In Bliss DE, ed. The Biology of Crustacea, volume 5. Internal Anatomy and Physiological Regulations. London, Academic Press.

Nagarajua, G.P.C., 2007. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? Aquaculture, 47: 245-257.

Neufeld, D.S.; Cameron, J.N., 1994. Mechanism of the net uptake of water in molting blue crabs (*Callinectes sapidus*) acclimated to high and low salinities. The