

## سازگاری‌های فراساختاری آبشش ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) تحت شرایط اسمزی مختلف

عبدالعلی موحدی نیا<sup>۱\*</sup> احمد سواری<sup>۱</sup> امیر پرویز سلاطی<sup>۲</sup>

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

۲) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر - ایران.

(دریافت مقاله: ۹ آبان ماه ۱۳۹۰، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۹۰)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** سلول‌های غنی از میتوکندری (MRC) از سلول‌های تخصص یافته اپیتلیومی می‌باشند که نقش فعال و موثری در تنظیم یونی ایفا می‌کنند. این سلول‌ها در اپیتلیوم آبشش ماهیان به اشکال و انواع مختلف وجود دارند. **هدف:** در این مطالعه شوری‌های مختلف مصنوعی برای تعیین الگوی تغییرات دهانه‌های راسی سلول‌های غنی از میتوکندری در کوتاه مدت و بلندمدت استفاده شد. **روش کار:** ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) برای مدت ۲۱ روز علاوه بر شوری طبیعی محیط در خور موسی (۴۲ ppt) در شوری‌های مورد نظر (آب شیرین ۶۰ ppt، ۵۰ ppt، ۴۰ ppt) با سه تکرار برای هر کدام نگهداری شدند. ۱، ۷ و ۲۱ روز پس از شروع دوره آزمایشی، نمونه‌های آبشش ماهی جهت مطالعه تحت میکروسکوپ الکترونی، در گلو تار آلدهید ۲٪+ پارافرمالدهید ۲٪ در بافر فسفات (pH=۷/۴) در دمای ۴°C تثبیت شد. **نتایج:** بر اساس مشاهدات تحت میکروسکوپ الکترونی نگاره در اپی تلیوم آبششی، سه نوع MRC در شوری‌های محیطی مختلف تشخیص داده شد: سلول‌های دارای دهانه‌ی عمیق (deep hole)، کم عمق (shallow basin) و برآمده (wavy convex). بیشتر MRCها در آب دریا و تمامی آن‌ها در ۶۰ ppt از نوع کم عمق بود. پس از کاهش شوری به ۲۰ ppt غشای رأسی MRCها به سرعت شروع به بالا آمدن کرد و در روز ۷ بسیاری از سلول‌ها از نوع کم عمق و برآمده بودند. ولی در روز ۲۱، MRCها به حالت قبل از تغییر شوری بازگشتند. در اثر انتقال به محیط‌های هایپواسموتیک (۵ ppt و آب شیرین) تغییرات سریع در غشای راسی مشاهده شد و پس از ۲۱ روز همه‌ی انواع MRC در فیلامنت وجود داشت. **نتیجه‌گیری نهایی:** MRCهای کم عمق به عنوان فرم تیپیک آب شور، نیاز فیزیولوژیکی شانک در تنظیم اسمزی در آب دریا و محیط‌های غلیظ تر را فراهم می‌کند، ولی در محیط‌های هایپواسموتیک، عملکرد تمامی انواع MRC برای تنظیم اسمزی لازم است.

**واژه‌های کلیدی:** تنظیم اسمزی، سلول غنی از میتوکندری، فراساختار، شانک زردباله، *Acanthopagrus latus*.

غشای و واجد  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$  می‌باشند که نشان دهنده قدرت فوق العاده آن‌ها در انتقال فعال یون است. سطح راسی MRCها در تماس با آب اطراف است (۱۴، ۱۳، ۱۲، ۵، ۶). تغییر ناحیه سطحی MRCها در پاسخ به تغییرات شرایط محیطی متعددی شامل سازش به آب دریا، مواجهه با آب کم یون، تیمارهای کورتیزول و هورمون رشد و مواجهه با pH بالا رخ می‌دهد بطوریکه در محیط آب شور به یک چین عمیق و در آب شیرین به یک چین کم عمق یا هم سطح و در برخی موارد بالاتر از سطح سلول‌های سنگفرشی پوششی (PVC) و دارای میکروویلی (با تراکم‌های مختلف) تغییر شکل می‌یابد (۱۳، ۳). تغییرات فنوتایپی در سطح راسی MRCها به عنوان مکانیسم‌های تعیین کننده برای تنظیم یونی یا اسید-باز پیشنهاد می‌شوند. همچنین نشان داده شده که جذب یون‌های مختلف ارتباط معنی داری با سطوح عملکردی MRC روی اپی تلیوم فیلامنت آبشش برخی تلتوست‌ها دارد (۱۵، ۷). MRCها در آب دریا (SW) مسئول دفع یون‌های سدیم و کلرو در آب شیرین (FW) جذب این دو یون هستند.

بنابراین شرایطی که همئوستاز یونی را درگیر یا مختل سازد موجب تغییرات در مرفولوژی سلول‌های غنی از میتوکندری در اپی تلیوم آبشش به عنوان پاسخ به مطلوب ساختن ظرفیت انتقال یون می‌شود (۱۶، ۴، ۷).

### مقدمه

ماهیان دریایی متعددی قادر به تنظیم اسمزی و حفظ همئوستاز در محدوده وسیعی از شوری‌های محیطی می‌باشند (۱، ۲). تنظیم یونی و اسمزی در ماهیان استخوانی حاصل عملکرد تلفیقی اندام‌های دخیل در این زمینه از قبیل آبشش، کلیه و روده است (۳) و ماهیان درگیر با تغییر اسمولالیتی محیطی، باید اسمولالیتی و تعادل یونی بدنشان را بوسیله تغییر رفتار مانند نرخ نوشیدن آب، سطوح هورمون‌های مختلف و عملکرد سطوح تنظیم اسمزی حفظ کنند (۱، ۴). در تلتوست‌های بالغ، آبشش‌ها مهم‌ترین اندام مسئول تنظیم یون می‌باشند و اثبات شده که سلول‌های غنی از میتوکندری (MRC یا Mitochondria-Rich Cell) موجود بر روی اپی تلیوم آبششی به وسیله ترشح یا جذب فعال نمک‌ها نقش‌های مهمی در تنظیم آب و مواد معدنی و آداپتاسیون با شرایط شوری متفاوت در تلتوست‌ها ایفا می‌کنند (۱۱، ۸، ۷، ۵، ۶، ۳).

MRC تلتوست‌ها، سلول‌هایی کروی یا بیضوی با خصوصیات بسیار متفاوتی نسبت به سلول‌های عادی اپی تلیال هستند. این سلول‌ها دارای میتوکندری‌های فراوان و یک سیستم لوله‌ای جانبی-قاعده‌ای ممتد از



در مخازن ۱۵۰۰L، کلرزی و کلرزایی می‌شد. بدین منظور ۲۴ ساعت قبل از افزودن آب به تانک‌های نگهداری ماهیان، کلر به مقدار ۲۰ppm در آنها حل و یک ساعت قبل از انتقال با تیوسولفات سدیم خنثی می‌شد (۱). به ماهیان فرصت داده شد تا به مدت ۲ هفته قبل از شروع اعمال تغییرات شوری با شرایط سوله‌ی جدید و تانک ۳۰۰L محتوی آب دریا (۴۲ppt)،  $\text{H}_2\text{O}$   $1570 \pm 10/18 \text{ Amosmol/kg}$  تحت فتوپریود و دمای طبیعی عادت کنند تا از اثرات و اختلال بالقوه و احتمالی استرس جابجایی (از قبیل افزایش سطوح کورتیزول) روی تنظیم اسمزی اجتناب شود (۲۵).

شوری با استفاده از شوری سنچ دیجیتال مدل Sension5 (Hach Company)، pH توسط دستگاه قابل حمل سنجش pH مدل (TS1 (SUNTEX) و اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن مدل DO-5510 بطور روزانه و به ترتیب در حد ۰/۰۱ و ۰/۰۱ واحد pH و  $0/1 \text{ mg/L}$  اندازه‌گیری می‌شد. تمامی تانک‌ها به گونه‌ای که حداقل آشفستگی در آنها ایجاد شود هوادهی می‌شدند (در حدود  $1000 \text{ mL/minute}$ ). تنها در نوبت‌های غذایی، هوادهی موقتاً قطع و سپس مجدداً برقرار می‌شد (۲۴).

ماهیان دو بار در روز با پلت (پروتئین ۵۸٪، چربی ۱۳٪، کربوهیدرات ۱۰٪، فیبر ۵٪ و خاکستر ۷٪) به نسبت ۲٪ وزن بدن در هر روز تغذیه می‌شدند. پلت‌ها با توجه به اندازه ماهی به قطعات ۴-۷ mm خرد و به تانک‌ها افزوده می‌شدند. زمان غذایی در تمام طول دوره در ساعات ۹:۳۰-۹:۳۰ صبح و ۳:۳۰-۲:۳۰ عصر بود (۲۴). پلت‌های مصرف نشده، ۳۰ دقیقه پس از زمان شروع تغذیه با سیفون نمودن از کف تانک‌ها تخلیه می‌شد تا مانع از آلودگی آب تانک گردد. حدود ۵۰٪ آب تانک‌ها هر روز تخلیه و با آب جدید جایگزین می‌شد تا از تجمع آمونیاک و سایر متابولیت‌ها جلوگیری شود (۲۶). بدلیل سقف شفاف سوله و شدت زیاد نور طی روز، یک سایه بان با استفاده از پلاستیک مشکی جهت کاهش تابش نور آفتاب در ارتفاع ۱m روی تانک‌ها کشیده شد (۱).

**آداپتاسیون ماهی‌ها با شوری‌های مختلف:** پس از دوره عادت پذیری، ماهی‌ها جهت ارزیابی چگونگی سازش با شوری‌های مختلف، مورد آزمایش قرار گرفتند. برای این کار تغییر سریع شوری برای آداپتاسیون با شوری‌های ۵، ۲۰ و ۶۰ ppt و تغییر تدریجی شوری برای آداپتاسیون با آب شیرین (۱۰٪) در نظر گرفته شد. برای تغییر شوری، ابتدا آب تانک‌ها تا باقی ماندن حدود ۱۰٪ از آب تانک، خالی شد و سپس تانک‌های تیمار کنترل مجدداً با آب دریا پر شد. تانک‌های تیمارهای آداپتاسیون سریع، بلافاصله از آب با شوری‌های مورد نظر (۵، ۲۰، ۶۰ ppt) پر شد و لی تانک‌های آداپتاسیون با آب شیرین در روز اول با آب ۳۵ ppt پر شد و پس از آن به تدریج تغییر شوری در آن‌ها انجام شد (کاهش روزانه ۵ ppt تا رسیدن به شوری ۵ ppt و سپس کاهش روزانه ۱ ppt تا رسیدن به شوری ۱ ppt) (Movahedinia) و همکاران در سال ۲۰۰۹. ترکیب یونی آب در شوری‌های مختلف در جدول ۲-۱ آمده است. تمامی گروه‌های تیمار و کنترل شامل ۳ تانک تکرار (مجموعاً ۱۵ تانک

این وجود هنوز دقیقاً مشخص نشده است که در پی انتقال بین آب شور و شیرین، عملکرد و مرفولوژی یک نوع سلول به نوع دیگر تغییر می‌یابد یا اینکه یک نوع سلول جایگزین نوع دیگر می‌شود (۳).

خانواده Sparidae که عموماً به شانک ماهیان (seabream) معروفند، ماهیان دریایی اند که توانایی تحمل دامنه وسیعی از شوری‌ها را نشان می‌دهند. با وجود خصوصیات فیزیولوژیک یوری‌هالین، این گروه از ماهیان تلئوست‌های دریایی بوده و در هیچ یک از مراحل چرخه زیستی خود، نیاز به آب شیرین ندارند (۱۷، ۱۸).

شانک زردباله (Houttuyn در سال ۱۷۸۲) *Acanthopagrus latus* از زیر خانواده Sparinae یک گونه هرمافرودیت پیش نر (۱۹) و یکی از مهمترین ماهیان دریایی از نظر تجاری و اکولوژیک است (۲۰، ۲۱، ۲۲). این گونه عموماً در آب‌های گرم و ساحلی (۲۱) در سرتاسر اقیانوس هند و غرب آرام پراکنش دارد (۱۹، ۲۳).

شناخت کمی در مورد اثرات شوری‌های مختلف روی اندام‌های تنظیم اسمزی ماهیان دریایی وجود دارد و تا کنون مطالعات کمی روی تاثیرات انتقال از آب دریا به شوری‌های دیگر روی تغییرات در مرفولوژی غشای راسی cc انجام شده است. هدف این مطالعه، توصیف فراساختار MRC آبتششی در شانک زردباله تحت میکروسکپ الکترونی نگاره و ارزیابی اثرات انتقال ماهی از شوری آب دریا در خور موسی (شمال خلیج فارس، ۴۲ppt) به شوری‌های کمتر هایپر و هایپوسموتیک (۱، ۵، ۲۰ppt) و شوری بالاتر (۶۰ppt) روی مرفولوژی غشای راسی MRC آبتشش بود.

## مواد و روش کار

**تامین ماهی و دوره عادت پذیری:** برای انجام تحقیق، یک استوک از ماهی‌های شانک زردباله، *A. latus* از ایستگاه تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی واقع در استان خوزستان در بهمن ماه ۱۳۸۶ تهیه شد. تمامی این ماهیان، یکساله و حاصل تکثیر در بهمن ماه ۱۳۸۵ در همین ایستگاه تحقیقاتی بودند که در تانک‌های ۶۰۰۰L مدور محتوی آب دریای فیلتر و تیمار شده با اشعه‌ی ماورای بنفش (UV) در سوله سرپوشیده نگهداری می‌شدند. تعداد ۶۰۰ عدد ماهی به سوله تحقیقاتی اختصاص یافته برای دوره آزمایشی طرح حاضر واقع در مجاورت سوله نگهداری ماهیان در ایستگاه تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی منتقل و بصورت تصادفی در ۱۵ تانک ۳۰۰L (۴۰ عدد ماهی در هر تانک) قرار داده شدند. چیدمان تانک‌ها به صورت تلفیقی از حالت انتخابی و تصادفی بود. به گونه‌ای که طراحی ترتیب قرارگیری تیمارهای مختلف با فرض حضور تکرارهای هر تیمار در هر دو سوی سوله و با فاصله از یکدیگر به صورت تصادفی انجام و اجرا شد. هر کدام از این تانک‌ها همانند تانک‌های ۶۰۰۰L از آب دریا پر شده بود (۲۴). در این دوره و دوره‌ی آزمایش جهت پیشگیری از آلودگی‌ها و بیماری‌های احتمالی ماهی و تاثیر بر نتایج بافتی و فیزیولوژیک ناشی از تغییرات شوری، آب علاوه بر فیلتر شدن و تیمار UV،



هایپواسموتیک (آب شیرین) تا پایان دوره‌ی آزمایش تلفاتی در اثر تغییر شوری نداشت. همچنین در سرتاسر آزمایش‌ها، ماهی‌ها در تمامی دوزهای شوری، سالم به نظر می‌رسیدند.

در نمای جانبی، رشته‌های آبششی بصورت شعاع‌هایی از کمان آبششی امتداد یافته‌اند و لاملاها بصورت صفحاتی عمود بر آن‌ها در هر دو سمت قرار گرفته‌اند (تصویر ۱). در سطح فیلامنت‌های آبشش ماهی شانک سه ناحیه‌ی مشخص دیده شد: لبه‌ی آوران، فضای بین لاملایی و لبه‌ی کوتاه و ابران (تصویر ۲، ۳).

بیشتر سطح اپیتلیوم آبشش توسط سلول‌های سنگفرشی اپی‌تلیومی (PVC) پوشیده شده بود که البته مساحت آن در فضای بین لاملایی در مجاورت لبه‌ی آوران کمتر از سایر نواحی بود (تصویر ۳). سطح سلول‌های سنگفرشی، وسیع، عمدتاً چندضلعی و دارای لبه‌هایی است که به آن ظاهری مانند اثر انگشت می‌دهد. علاوه بر لبه‌ها، میکروویلی‌ها هم ممکن است در تراکم‌های مختلف، بر سطح سلول‌های سنگفرشی وجود داشته باشند. سلول‌های غنی از میتوکندری برانشی، در سمت آوران و فضای بین لاملایی فیلامنت‌ها (بیشتر به سمت لبه‌ی آوران) وجود داشتند و از تعداد آن‌ها به سمت لبه‌ی ابران کم می‌شد به گونه‌ای که اپیتلیوم لبه‌ی ابران فیلامنت فاقد این نوع سلول بود. غشای دهانه‌ی رأسی سلول‌های غنی از میتوکندری در بین دو یا تعداد بیشتری سلول سنگفرشی و در نمونه‌های تیمار کنترل (۴۲ ppt) بیشتر به فرم مدور یا بیضی، قابل تشخیص بودند (تصویر ۳).

**مرفولوژی سطح رأسی سلول‌های غنی از میتوکندری:** غشای رأسی سلول‌های غنی از میتوکندری آبشش ماهی شانک زردباله، مرفولوژی‌های متفاوت سطوح رأسی از فرورفتگی‌های عمیق تا سطح برآمده را نشان داد. در فرورفتگی عمیق، غشای رأسی سلول نسبت به سطح سلول‌های سنگفرشی بسیار پایین‌تر قرار داشته و فقط دهانه آن در بین سلول‌های سنگفرشی قابل مشاهده بود در حالیکه سطح غشای رأسی سلول دیده نمی‌شد. در برخی موارد عمق این حفره کمتر بود و تشکیل حفره‌های کم عمق را می‌داد. در این حالت ساختارهای سطحی غشای رأسی قابل مشاهده بود. این سطوح عمدتاً دارای میکروویلی‌ها (در تراکم‌های مختلف) و به ندرت دارای حفره‌های ثانویه بود. سرانجام غشای رأسی ممکن بود همسطح سلول‌های سنگفرشی بوده یا تا کمی فراتر از سطح آن بالا بیاید که میکروویلی‌های متعدد روی آن وجود داشت (تصویر ۴).

در تیمار کنترل، دهانه سلول‌های غنی از میتوکندری تشکیل حفراتی با اعماق مختلف را میداد که عمدتاً ساختارهای روی غشای رأسی (میکروویلی‌ها) روی آن قابل تشخیص بود. MRC‌های همسطح با سلول‌های سنگفرشی بندرت در اپیتلیوم آبشش ماهی متعلق به آب دریا دیده شد (تصویر ۵). در تیمار ۶۰ ppt دهانه‌ی MRC‌ها پس از یک روز مواجهه با این شوری، مدور و نسبت به اپیتلیوم آبشش ماهی تیمار کنترل، بزرگ‌تر بود در حالیکه همچنان زوایید سطحی روی غشای رأسی قابل

بود. شوری‌های مختلف با رقیق کردن توسط آب شهر فیلتر شده یا افزودن نمک طبیعی دریایه آب دریای فیلتر و تیمار UV شده در تانک‌های ذخیره تهیه می‌شد و به همراه مخازن آب دریا و آب شیرین (۰۱) فیلتر شده به شیوه‌ای که در بالا بیان شد با کلرزنی و کلرزایی ضد عفونی می‌شدند. آزمایش به مدت ۲۱ روز انجام شد و غذادهی و حذف پلت‌های مصرف نشده در طول دوره آزمایش ادامه یافت. روز قبل از نمونه‌گیری، غذادهی ماهیان انجام نمی‌شد (۲۷). حدود ۵۰٪ از آب هر تانک غروب هر روز (پس از غذادهی) تعویض می‌شد (۲۶). فاکتورهای فیزیکی شیمیایی (شوری، pH و DO) در طول دوره آزمایش بصورت روزانه اندازه‌گیری و کنترل می‌شد.

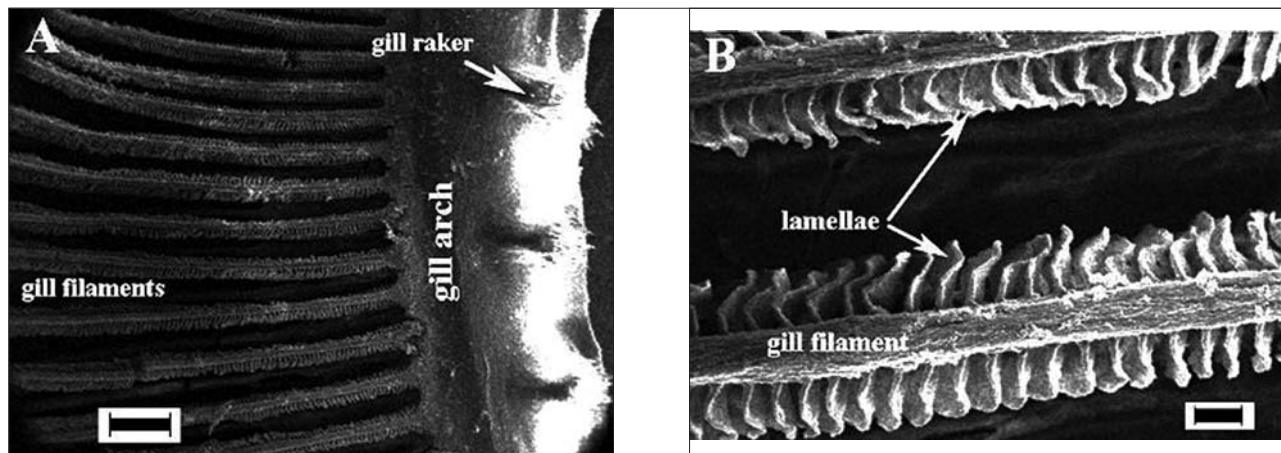
**نمونه‌گیری و بررسی‌های فراساختاری:** از ماهی‌های مورد آزمایش (در ۳ تانک) در پایان دوره عادت‌پذیری یعنی بلافاصله قبل از تغییر شوری هادر تانک‌ها، جهت تعیین داده‌های زمان صفر، نمونه‌گیری انجام شد. در زمان‌های ۱ و ۷ روز پس از شروع تغییرات شوری‌ها از تانک‌های کنترل و تیمارهای ۵، ۲۰، ۶۰ ppt و در پایان دوره آزمایش (۲۱ روز) از تمامی تانک‌ها (۱۵ تانک) نمونه‌گیری صورت گرفت. برای نمونه‌گیری، یک ماهی از هر تانک ( $n=3$ ) برای هر تیمار در هر زمان نمونه‌گیری) را بوسیله یک تور دستی خارج نموده و پس از بیهوشی، آب اضافی از سطح بدن آن‌ها بوسیله حوله نرم حذف می‌شد. وزن و طول چنگالی هر ماهی به وسیله ترازوی دیجیتال در حد ۰/۰۱g و تخته‌ی بیومتری در حد ۱mm اندازه‌گیری و ثبت می‌شد.

جهت بررسی‌های فراساختاری آبشش شانک زردباله، قطعه‌کوچکی از قسمت میانی کمان آبششی دوم از سمت چپ سر ماهی برداشته و در محلول فیکساتیو گلو تار آلدهید ۲٪ + پارافرمالدهید ۲٪ در بافر فسفات ( $\text{pH}=7/4$ ) در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  تثبیت می‌شد (۲۴). قطعات بافتی، پس از تثبیت، از فیکساتیو خارج و با بافر فسفات ۰/۱M ( $\text{pH}=7/4$ ) شسته و در سری‌های افزایشی اتانل (از ۵۰٪ تا اتانل خالص) و سپس استن ۱۰۰٪ آب‌گیری شدند (۱۷، ۱۸، ۲۸، ۲۹). در ادامه قطعات بافتی بوسیله نیتروژن مایع سریعاً منجمد و با استفاده از چسب غیررسانای دو طرفه به گونه‌ای روی پایه‌های مسی قرار داده شدند که کمان آبششی عمود بر پایه و سطح رشته آبششی افقی قرار گیرد. نمونه‌ها در دستگاه sputter coater (Edwards مدل SC7620) کاملاً خشک و با طلا روکش شدند. نمونه‌ها پس از این مراحل آماده سازی، تحت میکروسکپ الکترونی نگاره (LEO مدل 1455VP) با ولتاژ ۱۵kV بررسی شدند. تصاویر میکروسکپی با بزرگنمایی ۲۰۰۰x از ۴ منطقه از سطح آوران فیلامنت، نزدیک به محل اتصال فیلامنت به کمان آبششی (سپتوم) از هر ماهی تهیه و جهت بررسی‌های بعدی ذخیره شد. انواع سلول‌های غنی از میتوکندری بر اساس مرفولوژی سطوح رأسی تعیین شد (۷).

## نتایج

ماهی شانک زردباله پس از مواجهه سریع با محیط‌های هایپو و هایپر اسموتیک (۵، ۲۰، ۶۰ ppt) و آداپتاسیون تدریجی با محیط





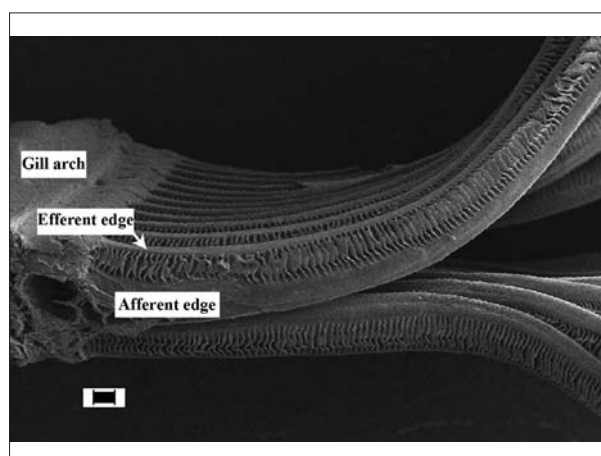
تصویر ۱- A: کمان آبششی ماهی شانک زردباله. فیلامنت‌ها بصورت شعاعی از کمان آبششی امتداد یافته‌اند. در سمت مقابل، خارهای آبششی (gill raker) کوتاه، بصورت برجستگی‌هایی قرار گرفته است (مقیاس =  $400\mu\text{m}$ ). B: تصویر میکروسکپ الکترونی نگاره از قسمتی از فیلامنت‌های آبششی. مقیاس =  $50\mu\text{m}$ .

همسطح با سلول‌های سنگفرشی بر روی لبه آوران، بیشتر در نزدیکی پایه لاملا و دهانه‌های فرورفته بیشتر در انتهای لبه (دور از لاملا) پراکنده بودند (تصویر ۴). در تیمار ۰۱ پس از ۲۱ روز آداپتاسیون نیز حالتی مشابه آنچه در ۵ ppt در همین زمان (۲۱ روز آداپتاسیون) شرح داده شد، مشاهده گردید (تصویر ۶-F). در تیمارهای ۵ ppt و ۱ ppt پس از ۲۱ روز آداپتاسیون، اندازه و عمق دهانه‌ی سلول‌های غنی از میتوکندری هم در لبه‌ی آوران و هم در فضای بین لاملائی بسیار کمتر از نمونه‌های تیمار کنترل بود.

## بحث

در این مطالعه شوری‌های مختلف مصنوعی برای تعیین الگوی تغییرات دهانه‌های MRC‌ها در کوتاه مدت و بلندمدت استفاده شدند و نتایج مشاهده شده پیشنهاد کرد که تغییرات مرفولوژیکی MRC‌ها نیازهای یونی و اسمزی جانور را منعکس می‌کند. در این تحقیق، شانک زردباله قادر بود تا مواجهه مستقیم با شوری‌های ۵ ppt تا ۶۰ ppt را بدون مرگ و میر تحمل کند. این با گزارشات قبلی در زمینه‌ی قابلیت تنظیم اسمزی دیگر گونه‌های شانک ماهیان (۱۷، ۱۸، ۱۴) مطابق بود. همچنین شانک توانست با کاهش تدریجی طی ۱۰ روز تغییر شوری محیط از آب دریا (۴۲ ppt) به آب شیرین را تحمل نموده و پس از آن تا پایان دوره آزمایش (۲۱ روز) آداپتاسیون موفق و بدون مرگ و میر با آب شیرین داشته باشد. این سریع‌ترین زمان گزارش شده برای سازگاری با آب شیرین در یک ماهی کاملاً دریایی برای یک دوره آزمایشی قابل قبول است. قبل از این Kelly و همکارانش در سال ۱۹۹۹ (۱۸) برای اولین بار سازش موفق شانک سیاه (*Mylio macrocephalus*) به مدت ۲۱ روز با آب شیرین را پس از ۸ ماه عادت پذیری ماهی با ۶ ppt را گزارش کرده بودند.

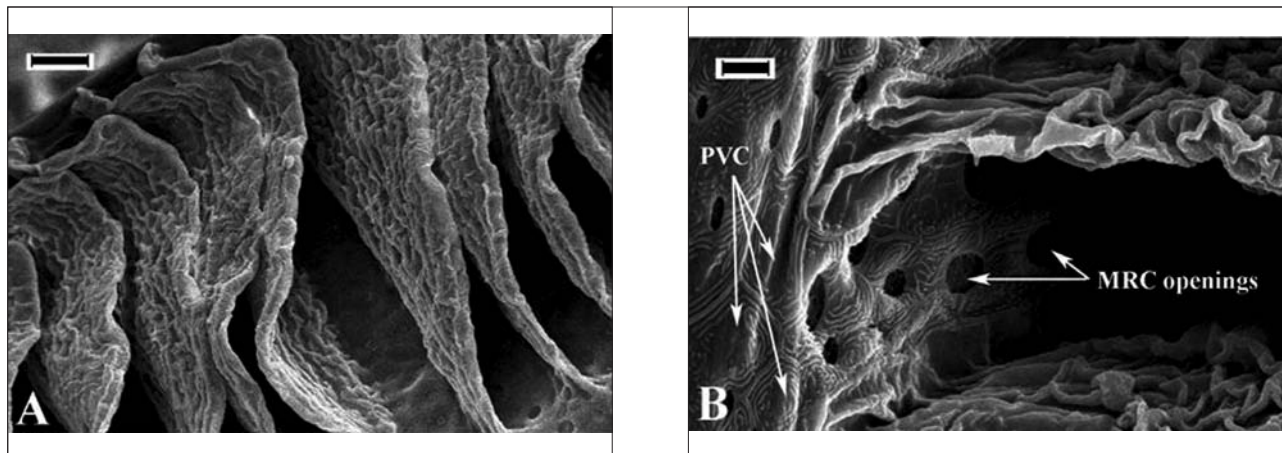
در شانک زردباله مانند شانک نقره‌ای (*Sparus sarba*) (۴) دهانه‌های MRC‌ها روی لبه‌ی وبران فیلامنت یافت نشد ولی در سطح آوران و فضای بین لاملائی (با افزایش تراکم در نزدیکی لبه‌ی آوران) به



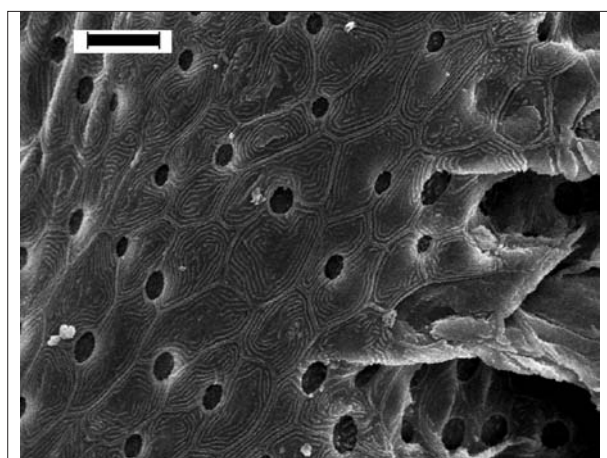
تصویر ۲- نمایی از یک کمان آبششی ماهی شانک. لاملاها عمود بر فیلامنت‌ها قرار داشته و آب در خلاف جهت جریان خون (counter current) پس از عبور از روی لبه وبران و فضای بین لاملائی، از سطح آوران عبور می‌کند. مقیاس =  $100\mu\text{m}$ .

تشخیص بود. افزایش اندازه‌ی دهانه در مورد سلول‌های واقع در فضای بین لاملائی بیشتر بود بطوریکه بیشتر فضای بین لاملائی در سمت لبه آوران بوسیله این دهانه‌ها اشغال شده بود. چنین افزایشی در اندازه حفره رأسی در نمونه‌های روزهای ۷ و ۲۱ نیز قابل تشخیص بود (تصویر ۶-A). در مواجهه با شوری ۲۰ ppt، پس از یک روز اندازه‌ی دهانه شروع به کاهش نمود و عمق آن کمتر شد (تصویر ۶-B) بطوریکه پس از ۷ روز سطح غشای رأسی بالاتر آمده و به سطح سلول‌های سنگفرشی نزدیک شد در حالیکه همچنان تعداد کمی دهانه رأسی کم عمق دیده می‌شد (تصویر ۶-C). اما پس از ۲۱ روز عمق و اندازه حفره‌های رأسی مجدداً افزایش یافته و تقریباً مشابه تیمار کنترل شده بود (تصویر ۶-D). در تیمار ۰۵ سلول‌های غنی از میتوکندری سریعاً تغییر یافتند و پس از یک روز غشای رأسی اکثر MRC‌ها بالا آمده و همسطح سلول‌های سنگفرشی شد (تصویر ۶-E). این درحالیست که پس از ۷ روز مجدداً تعداد MRC‌های کم عمق، افزایش یافت. نکته جالب اینکه در نمونه‌های ۷ و ۲۱ روز دهانه‌های برآمده و

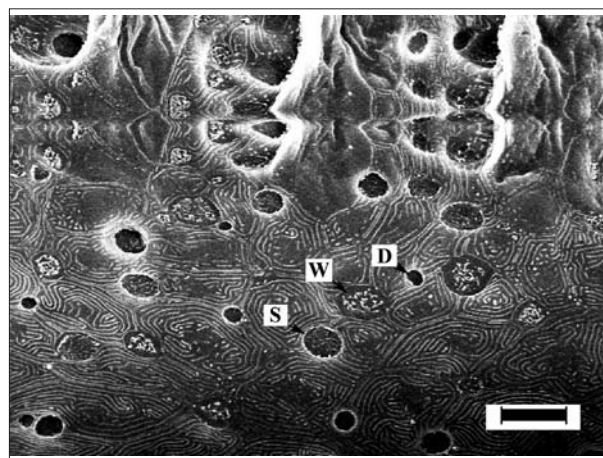




تصویر ۳- A. لا ملاها بصورت صفحات نیم دایره از سطح فیلامنت برآمده اند. مقیاس =  $20\mu\text{m}$ . B. سلول های سنگفرشی اپی تلیومی (PVC) با فرم های چندضلعی بیشترین ناحیه ی سطحی فیلامنت را به خود اختصاص داده اند. دهانه ی راسی سلول های غنی از میتوکندری (MRC opening) در بین دو یا تعداد بیشتری سلول سنگفرشی قرار دارد. مقیاس =  $5\mu\text{m}$ .



تصویر ۵- تصویر میکروسکپ الکترونی نگاره از سطح آوران و قسمتی از فضای بین لاملایی آبشش ماهی شانک در شرایط آب دریا (۴۲ppt). مقیاس =  $10\mu\text{m}$ .



تصویر ۴- انواع مختلف سلول های غنی از میتوکندری (بر اساس مورفولوژی ناحیه ی راسی) در اپیتلیوم آبشش ماهی شانک زردباله. D: دارای دهانه ی فرورفته و عمیق (cells) دارای دهانه ی هم سطح با سلول های سنگفرشی یا اندکی برآمده تر از آن (MR cells) (deep hole MR cells), S: دارای دهانه ی کم عمق (shallow basin MR cells) و W: دارای دهانه ی هم سطح با سلول های سنگفرشی یا اندکی برآمده تر از آن (MR cells) (wavy convex). مقیاس =  $10\mu\text{m}$ .

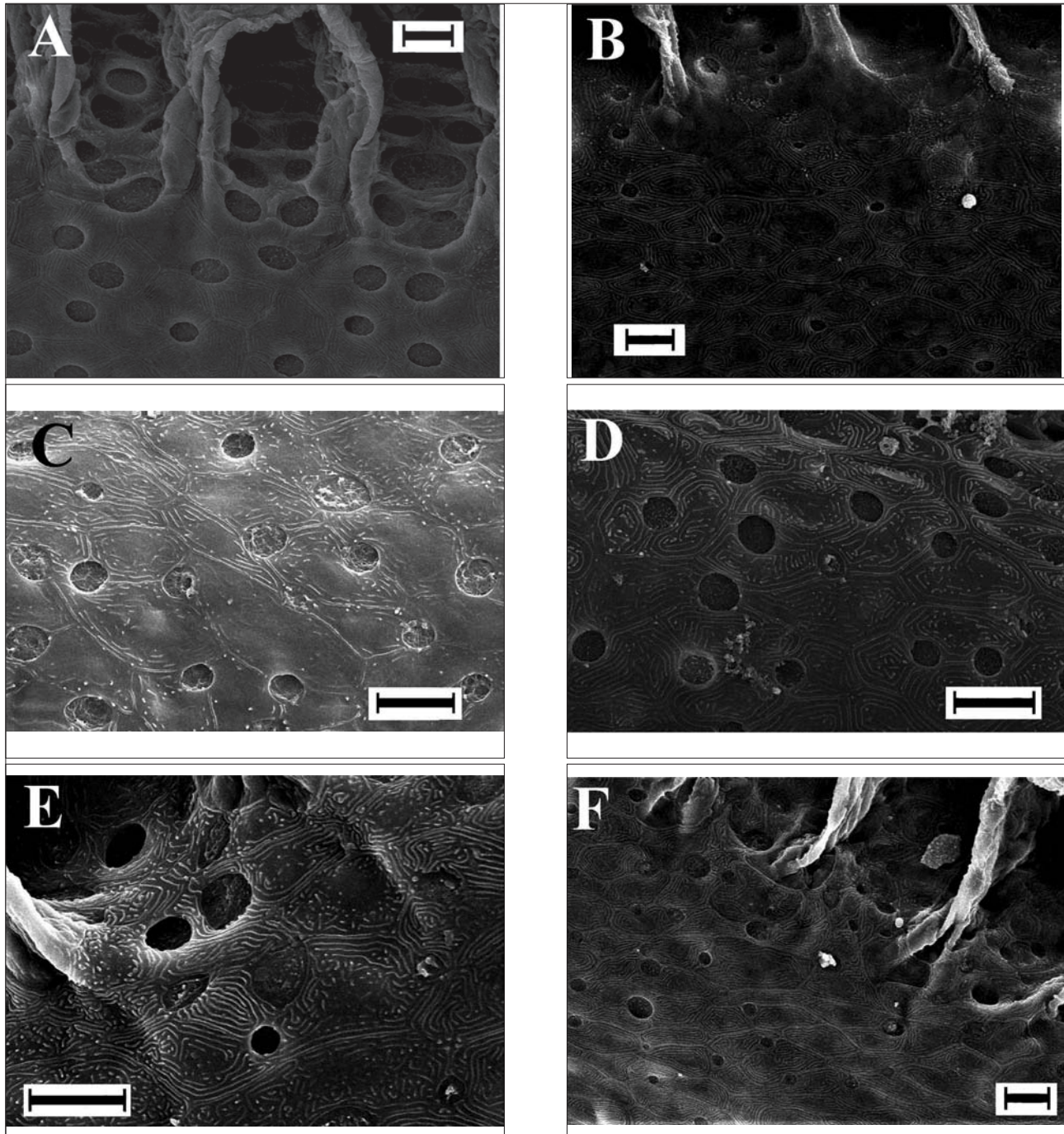
(عمیق، کم عمق و برآمده)، برای توصیف بهتر ویژگی های فراساختاری سطح راسی سلول های غنی از میتوکندری با استفاده از میکروسکپ الکترونی نگاره در نظر گرفته شد.

Chang و همکارانش در سال ۲۰۰۱ (۷)، سلول های غنی از میتوکندری دارای دهانه ی عمیق در تیلایپای آداپته به آب شیرین را اگرچه با تردید، معادل  $\alpha$ MRC و  $\beta$ MRC کم عمق را معادل  $\beta$ MRC دانسته اند. در حالیکه در مشاهدات ما در شرایط شوری ۶۰ppt تنها MRC های کم عمق در روی فیلامنت آبشش مشاهده شد. همچنین در ۴۲ppt (کنترل) اکثر MRC ها از نوع کم عمق بوده و تعداد اندکی MRC عمیق در آن ردیابی شده بود و در محیط های هایپرتونیک رقیق شده (در روزهای ابتدایی آداپتاسیون) و هایپوتونیک (۲۰ppt، ۵، آب شیرین) تمامی فرم های ساختار سطح راسی MRC (نوع ۳) در اپیتلیوم آبشش ماهی وجود داشت. بنابراین با توجه به تاکید مطالعات قبلی بر وجود تنها نوع  $\alpha$ MRC در ماهیان دریایی یا یوری هالاین آداپته به آب دریا (۱۴)، ما MRC های با ساختار راسی عمیق و کم

خوبی قابل تشخیص بود. بنابراین در این گونه مانند بسیاری از گونه ها مطالعه فراساختار MRC ها در سمت آوران، مطلوب است. اگرچه در برخی گونه ها مانند خامه ماهی (*Chanos chanos*)، لبه آوران بدلیل اینکه MRC ها به ندرت در آن وجود دارند، سطح مناسبی برای مطالعه این سلول هانیست (۲۸).

بر اساس شکل سلولی، مورفولوژی غشای راسی، ساختارهای زیر غشای راسی، توسعه ی سیستم لوله ای و مکان قرارگیری روی فیلامنت، انواع سلول های غنی از میتوکندری  $\alpha$  و  $\beta$  در ماهیان استنوها لاین آب شیرین یا یوری هالاین آداپته به آب شیرین تعریف شده اند. به طور کلی MRC های آب شور، معادل MRC ها شناخته می شوند ولی نوع  $\beta$  مخصوص گونه های آب شیرین است (۳، ۵، ۶، ۷، ۱۳، ۱۴). در مطالعه حاضر با توجه به مطالعه Chang و همکارانش در سال ۲۰۰۱ (۷) روی تیلایپای آداپته به آب شیرین (*Oreochromis mossambicus*)، نوع ۳ MRC





تصویر ۶- تصاویر میکروسکپ الکترونی نگاره از سطح اپی تلیوم فیلامنت آبشش ماهی شانک زردباله در سازش با محیط‌های مختلف هایپراسموتیک (۶۰ ppt و ۲۰) و هایپواسموتیک (۵ ppt) (۱) و تصاویر، ویژگی‌ها و تغییرات مورفولوژی رآسی سلول‌های غنی از میتوکندری را طی سازش با ۶۰ ppt پس از ۷ روز (A)، ۲۰ ppt پس از ۲۴ ساعت، ۷ روز و ۲۱ روز (به ترتیب B، C و D)، ۵ ppt پس از ۲۴ ساعت (E) و ۲۱ روز (F) را نشان می‌دهند. مقیاس = ۱۰  $\mu\text{m}$ .

در فیلامنت آبشش شانک زردباله پاسخ‌های سریع MRC‌ها در پی تغییرات ناگهانی و تدریجی در شوری رخ داد. بطوریکه تنه‌اطی ۲۴ ساعت تغییرات در فراساختار MRC‌ها قابل ملاحظه بود. مشابه چنین تغییری قبلاً توسط Kelly و Woo در سال ۱۹۹۹ (۴) در شانک نقره‌ای نیز گزارش شده و پس از ۲۱ روز اختلاف فراساختاری بین تیمارهای مختلف وجود داشت. یک روز پس از قرار گرفتن در شرایط ۶۰ ppt، بواسطه افزایش

عمق را معادل  $\alpha$ MRC می‌دانیم. هر چند مدارک و اطلاعات مستند برای توضیح و اثبات چنین ارتباطی وجود ندارد و تعیین قطعی، نیاز به مقایسه آنها با تصاویر میکروسکپ الکترونی گذاره در شرایط یکسان دارد. احتمالاً نوع گونه، محیط زیست طبیعی گونه، نحوه و نوع آداپتاسیون (از شوری‌های بالاتر به پایین‌ترین‌ها برعکس) در تعیین انواع از سلول‌های غنی از میتوکندری موثر است.



جدول ۱- ترکیب یونی آب در شرایط آزمایشی.  $[Na^+]$  و  $[K^+]$  به روش شعله سنجی و  $[Ca^{++}]$  و  $[Cl^-]$  به روش رنگ سنجی اندازه گیری شد (n=6).

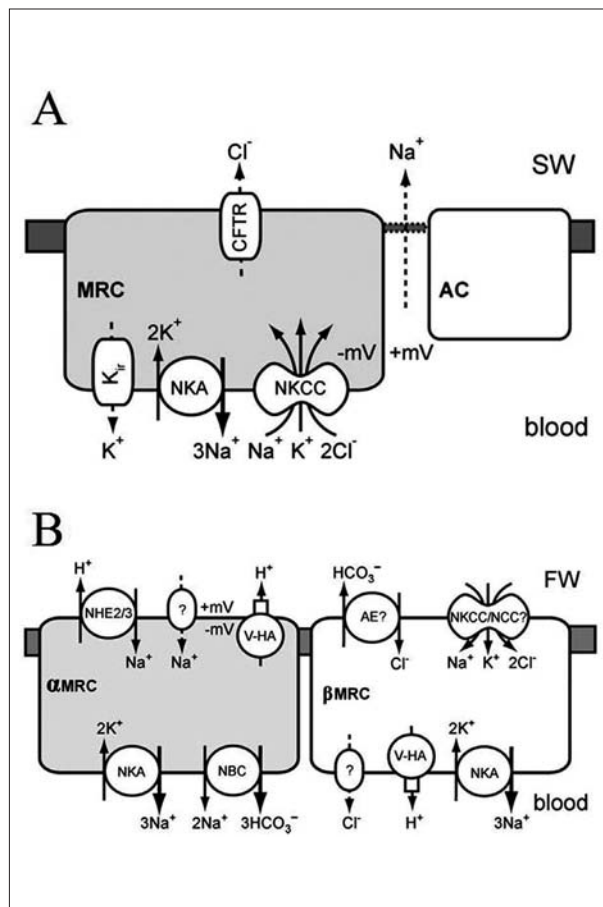
شوری (ppt)	$Na^+$ (mM)	$Cl^-$ (mM)	$Ca^{2+}$ (mg/100mL)	$K^+$ (mM)
۶۰	۳۷۰/۸۳±۲/۸۸	۱۰۵۹±۱۳/۲۳	۱۸/۷۵±۰/۶۷	۱۰/۶۰±۰/۳۳
۴۲	۲۹۳/۵±۱/۴۱	۶۱۱/۸۳±۲/۹۸	۱۹/۲۷±۱/۵	۱۱/۱۵±۰/۲۸
۲۰	۱۹۴/۱۷±۱/۴۱	۲۸۴/۱۷±۰/۹۵	۱۵/۹۳±۰/۰۲	۵/۷۵±۰/۱۳
۵	۸۵/۵±۲/۵۵	۸۰/۷۵±۰/۸۶	۱۰/۵۵±۰/۰۷	۱/۳۸±۰/۰۷
۱	۲۵±۱/۱۵	۴/۴۵±۰/۳۹	۶/۵۷±۰/۱۴	۰/۲۷±۰/۰۲

آداپت به ۲۰ppt است. همچنین نتایج این مطالعه اثبات می کند که سلول های غنی از میتوکندری دارای دهانه ی کم عمق به عنوان فرم تمییز در یابی نیاز فیزیولوژیکی تلئوست های دریایی یا تلئوست های یوری هالاین آداپت به آب دریا و محیط های شورتر را تامین سازند. احتمالاً عملکرد همین نوع سلول ها در شرایط هایپواسموتیک بر اساس الگوی ارایه شده توسط Evans در سال ۲۰۰۸ (تصویر ۷) با تغییر در نوع، تراکم و محل قرارگیری آنزیم ها و سایر پروتئین های ناقل در غشای سلولی تغییر یافته و در جذب یون شرکت داشته باشند. حضور همه انواع MRC در محیط های هایپواسموتیک همانند آنچه سایر محققین اعلام داشته اند (۷، ۱۶، ۳۱) پیشنهاد می کند که این سلول ها با مرفولوژی های مختلف، مسئول جذب یون های مختلف در محیط نیز هستند. با حضور فراوان انواع دارای سطوح برآمده و افزایش میکروویلی در غشای راسی در معرض محیط های هایپواسموتیک، مساحت این غشاها افزایش می یابد که این پدیده با طبیعت جذبی MRC ها در این شرایط مطابقت دارد (۵، ۱۰، ۱۳).

Carmona و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۳۲) در مطالعه روی نوعی ماهی خاویاری (*Acipenser naccarii*) بیان کردند که در جانوران نگهداری شده در آب شیرین نسبت به ماهیان دریا سطح راسی MRC ها تورفتگی کمتری داشت. در تحقیق مانیز بالا آمدن سطح غشای راسی در نمونه های ۲۰ppt و ۵ پس از ۱ روز مشاهده شد که این حالت (وجود MRC های کم عمق) پس از ۲۱ روز در محیط های هایپواسموتیک همچنان وجود داشت ولی انواع عمیق و برآمده نیز در اپی تلیم جانوران آداپت شده با این محیط ها حضور داشتند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خویش از آقای دکتر بهروز حیدری، دکتر مرزعی، پرسنل محترم ایستگاه تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران، بخاطر مساعدت ها و حمایت هایشان در انجام این تحقیق، اعلام می دارند.



تصویر ۷- مدل کاری برای مکانیسم های دفع (A) و جذب (B) یون های سدیم و کلر بوسیله سلول های غنی از میتوکندری آبشش. AC: سلول ضمیمه، MRC: سلول غنی از میتوکندری (تصویر از: ۲۴).

مساحت غشای راسی، نسبت کل این سطح به مساحت اپی تلیم در پهلوی آوران فیلامنت افزایش چشمگیری داشته و این سطح وسیع تر تا روز ۲۱ هم مشخص بود. در این شوری عمیق وجود نداشت در حالیکه در نمونه های کنترل به تعداد کم دیده می شد که تبدیل اینها به نوع کم عمق را بوسیله بالا آمدن غشای راسی پیشنهاد می کند.

در شوری های ۲۰ppt و ۵ پس از یک روز، با کوچکتر شدن سطح غشای راسی، نسبت مساحت اشغال شده اپی تلیم توسط MRC ها کمتر از نمونه های کنترل شد. البته در محیط ۲۰ppt، اپیتلیوم آبشش پس از ۲۱ روز مواجهه، از نظر ساختار دهانه های راسی تقریباً مشابه نمونه های کنترل شد. این تغییر موقت در ساختار راسی MRC ها در ۲۰ppt نشان دهنده ی نقش مهم و اولیه آبشش در پاسخ به شوک کاهش شوری است و بدلیل اینکه محیط همچنان هایپراسموتیک است ساختار غشای راسی سلول های کلراید به حالت طبیعی دریایی باز می گردد. بنابراین تغییر میزان فعالیت آنزیم ها و پروتئین های انتقال دهنده ی یون ها در غشای MRC های دریایی، بدون نیاز به تغییرات فراساختار این سلول ها نسبت به آب دریا (۴۲ppt) و یا سازش های بعدی در اندام های دیگر مانند کلیه (۱)، قادر به تامین نیاز فیزیولوژیکی ماهی



## References

- Fielder, D.S., Allan, G.L., Pepperall, D., Pankhurst, P.M. (2007) The effects of changes in salinity on osmoregulation and chloride cell morphology of juvenile Australian snapper, *Pagrus auratus*. *Aquaculture*. 272: 656-666.
- 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. *J. Exp. Zool.* 276: 193-200.
- Kaneko, T., Katoh, F. (2004) Functional morphology of chloride cells in killifish *Fundulus heteroclitus*, a euryhaline teleost with seawater preference. *Fish. Sci.* 70: 723-733.
- Kelly, S.P., Woo, N.Y.S. (1999) The response of sea bream following abrupt hyposmotic exposure. *J. Fish Biol.* 55: 732-750.
- Pisam, M., Auperin, B., Prunet, P., Rentier-Delrue, F., Martial, J., Rambourg, A. (1993) Effects of prolactin on  $\alpha$  and  $\beta$  chloride cells in the gill epithelium of the saltwater adapted tilapia "*Oreochromis niloticus*". *Anat. Rec.* 235: 275-284.
- Shikano, T., Fujio, Y. (1998) Immunolocalization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation in a euryhaline teleost, *Poecilia reticulata*. *J. Exp. Zool.* 281:80-89.
- Chang, I.-C., Lee, T.-H., Yang, C.-H., Wei, Y.-Y., Chou, F.-I., Hwang, P.-P. (2001) Morphology and function of gill mitochondria-rich cells in fish acclimated to different environments. *Physiol. Biochem. Zool.* 74:111-119.
- Wilson, J.M., Laurent, P. (2002) Fish gill morphology, Inside out. *J. Exp. Zool.* 293: 192-213.
- Varsamos, S., Diaz, J.P., Charmantier, G., Flik, G., Blasco, C., Connes, R. (2002) Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to fresh water, seawater, and doubly concentrated seawater. *J. Exp. Zool.* 293: 12-26.
- Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G. (2005) Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 141: 401-429.
- Giari, L., Manera, M., Simoni, E., Dezfuli, B.S. (2006) Changes to chloride and rodlet cells in gills, kidney and intestine of *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to reduced salinities. *J. Fish Biol.* 69: 590-600.
- Helfman, G.S., Collette, B.B., Facey, D.E. (1997) *The Diversity of Fishes*. Blackwell Science Pub., Malden, USA.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y. (2003) Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol. (part B: Biochem.)*. 136: 593-620.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P. (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97-177.
- Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P. (1998) Gill morphology and acid-Base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 119: 107-115.
- Moron, S.E., Oba, E.T., De Andrade, C.A., Fernandes, M.N. (2003) Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerethrinus unitaeniatus*. *J. Exp. Zool.* 298A: 93-104.
- Kelly, S.P., Chow, I.N.K., Woo, N.Y.S. (1999a) Alterations in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and gill chloride cell morphometrics of juvenile black sea bream (*Mylio macrocephalus*) in response to salinity and ration size. *Aquaculture*. 172: 351-367.
- Kelly, S.P., Chow, I.N.K., Woo, N.Y.S. (1999b) Haloplasticity of black seabream (*Mylio macrocephalus*): hypersaline to freshwater acclimation. *J. Exp. Zool.* 283: 226-241.
- Hesp, S.A., Potter, I.C., Hall, N.G. (2004) Reproductive biology and protandrous hermaphroditism in *Acanthopagrus latus*. *Environ. Biol. Fishes.* 70: 257-272.
- Abou-Seedo, F.S., Dadzie, S., Al-Kanaan, K.A. (2003) Sexuality, sex change and maturation patterns in the





- yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* (Teleostei: Sparidae) (Houttuyn, 1782). J. Appl. Ichthyol. 19: 65-73.
21. Xia, J.H., Xia, K.F., Jiang, S.G. (2006) Characterization of 11 polymorphic microsatellite loci in the yellowfin seabream *Acanthopagrus latus*. Mol. Ecol. Notes. 6: 484-486.
22. Jiang, S., Zhang, D., Li, J., Liu, Z. (2008) Molecular characterization, recombinant expression and bio-activity analysis of the interleukin-1 $\beta$  from the yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn). Fish Shellfish Immunol 24: 323-336.
23. Jean, C.-T., Lee, S.-C., Chen, C.-T. (2000) Population structure of yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*, from the waters surrounding Taiwan, based on mtDNA sequences. Ichthyol. Res. 47: 187-192.
24. Movahedinia, A.A., Savari, A., Morovvati, H., Kochanian, P., Marammazi, J.G., Nafisi, M. (2009) The effects of changes in salinity on gill mitochondria-rich cells of juvenile yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*. J.Biol.Sci. 9: 710-720.
25. Biswas, A.K., Seoka, M., Takii, K., Maita, M., Kumai, K. (2006) Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling and chronic photoperiod manipulation. Aquaculture. 252: 566-572.
26. Altinok, I., Galli, S.M., Chapman, F.A. (1998) Ionic and osmotic regulation capabilities of juvenile Gulf of Mexico sturgeon, *Acipenser oxyrinchus de sotoi*. Comp. Bioch. Physiol. Part A. 120: 609-616.
27. Stefanson, S.O., Berge, A.I., Gunnarsson, G.S. (1998) Changes in seawater tolerance and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity during desmoltification in Atlantic salmon kept in freshwater at different temperatures. Aquaculture. 168: 271-277.
28. Chen, C.-N., Lin, L.-Y., Lee, T.-H. (2004) Ionocyte distribution in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos* (Forsskål, 1775). Zool. Stud. 43: 773-777.
29. Lin, C.-H., Huang, C.-L., Yang, C.-H., Lee, T.-H., Hwang, P.-P. (2004) Time-course changes in the expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and the morphometry of mitochondrion-rich cells in gills of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during fresh-water acclimation. J. Exp. Zool. 301A: 85-96.
30. Evans, D.H. (2008) Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. Am. J. Physiol. 295: R704-R713.
31. Marisa, N.F., Perna-Martins, S.A. (2002) Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). Acta Zool. (Stockholm). 83: 321-328.
32. Carmona, R., Garcia-Gallego, M. Sanz, A., Domezain, A., Ostos-Garrido, M.V. (2004) Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. J. Fish Biol. 64: 553-566.



# Gill ultrastructural alterations in response to various environmental salinities in yellowfin seabream, (*Acanthopagrus latus*)

Movahedinia, A.A.<sup>1\*</sup>, Savari, A.<sup>1</sup>, Salati, A.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr-Iran.

<sup>2</sup>Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr- Iran.

(Received 31 October 2011 , Accepted 17 March 2012)

## Abstract:

**BACKGROUND:** Alterations to mitochondria-rich cells (MRC) in the fish gill epithelium have been previously reported. **OBJECTIVES:** To specify the variation pattern of apical openings in mitochondria- rich cells in short and long terms exposure to different salinities. **METHODS:** Yellowfin seabream, (*Acanthopagrus latus*) was subjected to different salinities (freshwater, 5, 20 and 60ppt) besides the normal environmental salinity in the Musa creek (42ppt) over 21 days, with three replicates for each condition. Samples were collected at the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of experiment. Dissected gill arches were fixed in 2% glutaraldehyde+2% paraformaldehyde (pH=7.4) at 4°C and studied using scanning electron microscopy. **RESULTS:** Three subtypes of mitochondria-rich cells (shallow basin, deep hole and wavy convex) were detected in the gill epithelium based on different environmental salinities. While most of mitochondria-rich cells were present in seawater group, all of them were detected as the shallow basin subtype in 60 ppt group. Meanwhile, decrease in salinity to 20ppt, made morphological changes in the apical membrane of the mitochondria-rich cells on day 7, so that most of these cells have been detected as wavy convex or shallow basin subtypes. On the other hand, on day 21 they showed a pattern similar to the basal status. Furthermore, when they were transferred to hypoosmotic medium (5ppt and FW), rapid changes were exhibited in the apical membrane of mitochondria-rich cell which were stabilized after 21 days so that all subtypes of mitochondria-rich cells were observed in photomicrographs of gill filaments. **CONCLUSIONS:** Shallow basin mitochondria-rich cells as typical cells in seawater fish species, would be able to do osmoregulation in hyperosmotic environment in yellowfin seabream, yet in hypoosmotic conditions all sub- types of the mitochondria-rich cells would be required.

**Key words:** osmoregulation, mitochondria rich cell, ultrastructure, yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*.

## Figure Legends and Tabel Captions

**Figure 1.** A: Scanning electron micrograph of gill arch of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) shows gill filaments extended from arch (scale bar=400µm). B: Scanning electron micrograph of gill filaments (scale bar=50µm)

**Figure 2.** Scanning electron micrographs of a portion of a gill arch from yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) including two hemibranches which radiate off it (scale bar=100µm).

**Figure 3.** A: Gill lamellae in the shape of semicircles arranged on gill filament (scale bar=20µm). B: Pavement epithelial cells (PVC) in the shape of polygonal occupied most epithelial surface of the filaments (scale bar=5µm).

**Figure 4.** Various MRC subtypes according to the apical opening morphology recognizable under scanning electron microscope. D: deep hole MR cells; S: shallow basin MR cells; W: wavy convex MR cells (scale bar=10µm).

**Figure 5.** Scanning electron micrograph of afferent and interlamellar surface from seabream in seawater condition (42ppt) (scale bar=10µm).

**Figure 6.** Scan Electron microscope images of the surface of gill filaments in *Acanthopagrus latus* acclimated to different hyperosmotic (60ppt and 20ppt) and hypoosmotic (5ppt and 1ppt) environments (scale bar=10µm).

**Figure 7.** Working model for the mechanisms of NaCl secretion (A) and uptake (B) by the teleost gill mitochondria-rich cells (MRC).

**Table 1.** Ionic composition of water in experimental condition.

