کشت بافت باله دمی تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*

محمدرضا نوروزفشخامی[۱*]، محمد پورکاظمی[۲]، محمدحسن زاده صابر[۱]، شهروز برادران نویری[۱]، محمود بهمنی[۱]، مرتضی دلیری[۳] و احمد غروقی[۲]

[۱] رشت، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر

[۲] تهران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

[۳]تهران، پژوهشگاه ملی مهندس ژنتیک و زیست‌فناوری

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۰

چکیده

در این تحقیق رده‌های اولیه سلولی از طریق کشت تکه‌های باله دمی تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* تهیه شد. حاشیه باله دمی یک عدد ماهی دوساله به طول ۲۳ سانتیمتر و وزن ۱۳۳گرم را به‌اندازه تقریباً دو سانتیمتر بریده، سه‌بار با محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها شستشو داده شد. سپس به تکه‌های تقریباً ۱ میلیمتر بریده شد و در محیط کشت L-15 حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها و ۲۰ درصد سرم جنین گاو تحت دمای ۲۲ درجه سانتیگراد کشت داده شد. پس از تشکیل مقدار کافی لایه سولی بر روی کف فلاسک کشت، سلول‌ها با محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها شستشو شدند و از طریق تیمار با Trypsin-EDTA (۰/۲۵درصد) و تکان دادن فلاسک از کف فلاسک جدا شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک ها، آنها در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو، آنتی‌بیوتیک‌ها تحت دمای ۲۲ درجه سانتیگراد کشت داده شدند (ساب‌کالچر اول). پس از تشکیل مقدار کافی لایه سلولی، مشابه همین مراحل برای ساب‌کالچردوم انجام شد. در بین سلول‌های حاصل از کشت اولیه تکه‌های بافت، سلول‌های شبه‌فیبروبلاست و شبه‌اپی‌تلیال مشاهده شد ولی پس از انجام ساب‌کالچر (کشت مجدد) اول تعداد سلول‌های شبه فیبروبلاست بیشتر بود. در این تحقیق تولید دو رده سلولی درنتیجه کشت اولیه و دو ساب‌کالچر بررسی شد.

واژه‌های کلیدی:تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus* ، کشت بافت، باله دمی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۴۵۳۷۲۱ ، پست الکترونیکی: Nowruzfashkhami@yahoo.com

مقدمه

سلول‌های جداشده از بافت جانوری یا خود موجود زنده چنانچه در یک ظرف کشت حاوی مواد غذایی موردنیاز سلول‌ها و فاکتورهای رشد قرارداده شوند به رشد خود ادامه خواهند داد. این عمل کشت بافت نامیده می‌شود (۱۰). کشت بافت ماهی‌ها خیلی شبیه روش‌های استفاده شده برای کشت بافت پستانداران و پرندگان است و موارد مشترک فراوانی وجود دارد (۶۱). کشت سلول‌های ماهی ظاهراً اندکی آسانتر است (۵۹). در کشت سلولی، سلول-های حاصل از کشت اولیه و رده سلولی تولید می‌شود(۵۱). سلول‌های حاصل از کشت اولیه درنتیجه کشت تکه‌های بافت (explant) جداشده از خود موجود زنده و یا سلول‌های حاصل از تیمار آنزیمی بافت موردنظر بدست می‌آید ولی رده‌های سلولی درنتیجه کشت مجدد و متوالی سلول‌های حاصل از کشت اولیه بافت (سلول‌ها) حاصل می‌شود. اولین رده سلولی تحت عنوان RTG-2 توسط ولف و کویمبای (۵۸) تهیه شد. این رده سلولی از

گناد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان برای جداسازی ویروس IPNV تهیه شد. طی پنجاه سال گذشته، رده‌های سلولی متعلق به تعداد زیادی از ماهی‌ها بدست آمد و تا سال ۲۰۱۱، ۲۸۳ رده سلولی از ماهیان باله‌دار سراسر جهان تهیه شد (۴۰). کشت سلول‌های ماهی‌ها برای انجام مطالعات مختلف ازجمله ویروس‌شناسی (۲۴ و ۶۲)، بررسی مولکولی و سلولی پروسه‌های فیزیولوژیک و مکانیزم‌های سم‌شناسی (۸)، آلاینده‌های محیط‌زیست (۱۲، ۱۹ و ۵۲)، اندوکرینولوژی، بیوتکنولوژی و آبزی‌پروری (۶)، ایمنولوژی (۷ و ۱۵)، بیوشیمی (۲۷)، کنترل بیماری (۵۵)، رادیوبیولوژی (۴۹)، سرطان‌شناسی و ژنتیک (۴ و ۸) و حفظ ذخایر (۱۳ و ۶۴) صورت می‌گیرد. همچنین رده-های سلولی برای تولید مکمل‌های غذایی نظیر اسیدهای چرب امگا ۳ استفاده می‌شوند. سلول‌های ماهی اگر در مقیاس وسیع تولید شوند پتانسیل بیوتکنولوژیک تولید غذای ماهی را دارند لذا این تکنولوژی ممکن است نیاز به صید گونه‌های وحشی را کاهش دهد (۲۵).

برخی از بافت‌ها بهتر از سایر بافت‌ها کشت می‌شوند. سلول‌های جنین و لارو به دلیل بالابودن میزان تقسیمات میتوزی راحت‌ترین بافت‌ها برای کشت هستند (۴۲). گاهی خارج نمودن بافت از بدن بدون کشتن و یا وارد نمودن آسیب جدی به ماهی مهم است و چنانچه ماهی موردنظر کمیاب و یا دارای ارزش اقتصادی زیادی باشد اهمیت این موضوع بمراتب بیشتر است. بافت باله بخاطر تقسیمات میتوزی و قدرت ترمیم زیاد (۲۴)، عدم نیاز به کشتن ماهی (۴۴) و سهولت نمونه‌برداری (۱) اغلب برای کشت استفاده می‌شود. باله دمی بیش از سایر باله‌ها برای کشت انتخاب می‌شود (۲۹،۳۴ و ۶۳). کشت باله دمی در مورد ماهی طلایی *Carassius auratus* (۱۱ و ۴۴)، ماهی‌کپور کوی *Cyprinus carpio koi* (۱۶)، ماهی سیم سرمخطط *Sparus auratus* (۵)، ماهی کاردینال *Apogon imberbis* و اردک‌ماهی *Esox lucius* (۲)، کپورسربزرگ *Aristichthys nobilis* (۴۳)، ماهی مداکا *Oryzias latipes* (۳۰)، باس دریایی آسیایی *Lates calcarifer* (۳۹)، ماهی *Anabarilius grahami* (۵۷)، کپورماهی روهو *Labeo rohita* (۳۸)، ماهی توربوت *Scophthalmus maximus* (۱۸)، تاسماهی سیبری *Acipenser baerii*، تاسماهی سفید *Acipenser transmontanus* و فیلماهی *Huso huso* (۲۲)، تاسماهی چینی *Acipenser sinensis* (۶۴) و تاسماهی ساخالین *Acipenser mikadoi* (۵۶) انجام شد. با توجه به کاربردهای مختلف کشت بافت ماهیان و ارزش اقتصادی زیاد تاسماهی ایرانی برای کشورمان، در این تحقیق کشت تکه‌های بافت باله تاسماهی ایرانی بمنظور دستیابی به روش کشت بافت باله دمی و رده های سلولی بافت باله این ماهی باارزش انجام شد. تاسماهی ایرانی از نظر اقتصادی بیش از سایرتاسماهی‌های دریای خزر برای کشورمان مهم است زیرا بخش اعظم صید (تقریباً ۶۰ درصد) و خاویار استحصالی (تقریباً ۵۵ درصد) سالیانه از ماهیان خاویاری دریای خزر توسط کشورمان مربوط به این‌گونه می‌باشد. تاسماهی‌ایرانی متعلق به خانواده تاسماهیان است. این ماهی بیشتر در سواحل ایرانی دریای خزر زندگی می‌کند لذا علت نامگذاری آن نیز به همین دلیل می‌باشد (۲۸).

مواد و روشها

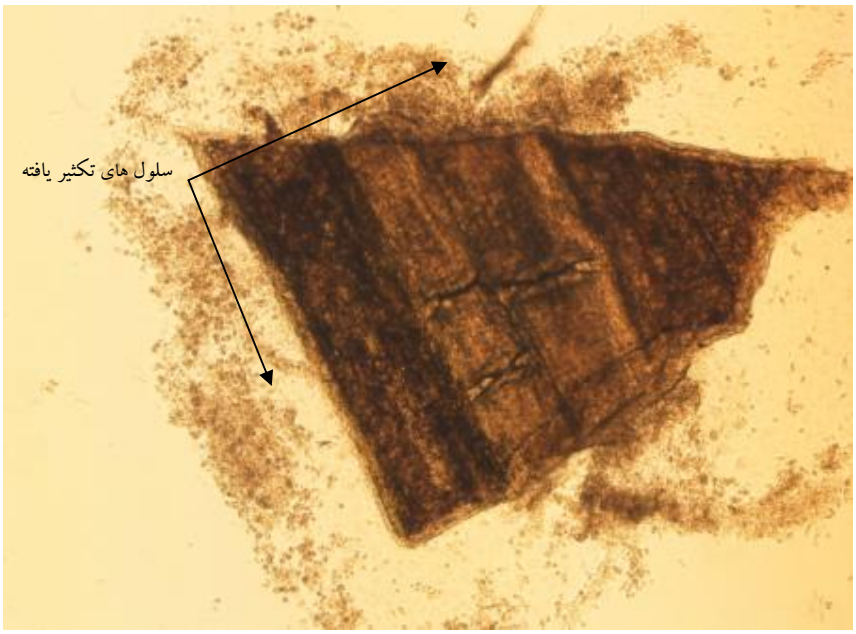
یک عدد تاسماهی ایرانی پرورشی ۲ ساله به طول تقریبی ۲۳ سانتیمتر و وزن ۱۳۳ گرم که بطور تصادفی جداشده بود برای این مطالعه استفاده شد. برای کشت تکه‌های بافت باله از روش فونتانا و همکاران (۲۲) باکمی تغییرات استفاده شد. پس از بیهوش نمودن ماهی مورد آزمایش با پودر گل‌میخک (۴۵)، حاشیه باله‌دمی ماهی مورد آزمایش پس از خشک کردن با یک پارچه و ضدعفونی نمودن با اتانول ۷۰ درصد، با یک عدد قیچی استریل به طول تقریباً دو سانتیمتر بریده شد و به یک عدد ظرف پتری استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول PBS، پنی‌سیلین‌پتاسیم‌جی (۲۰۰ $iu.ml^{-1}$, Gibco)، استرپتومایسین سولفات (Gibco ۲۰۰ $\mu g.ml^{-1}$, Gibco) و آمفوتریسین B (۵ $\mu g.ml^{-1}$, Gibco)

منتقل شد. پس از ۱۰ دقیقه بافت باله از ظرف پتری خارج و ۲بار دیگر و هربار به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف‌های پتری حاوی محلول PBS و آنتی‌بیوتیک‌های ذکرشده قرارداده شد. سپس بافت باله را به یک ظرف پتری استریل حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 (Sigma)، HEPES (۲۵mM، Gibco)، ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS،Gibco)، پنی‌سیلین پتاسیم جی ($۲۰۰iu.ml^{-1}$)، استرپتومایسین سولفات ($۲۰۰\mu g.ml^{-1}$) و آمفوتریسین ($۵\ \mu g.ml^{-1}$) انتقال داده، به‌وسیله دو عدد اسکالپل استریل به تکه‌های کوچک تقریباً ۱ میلیمتر بریده شد. قبل از انتقال تکه‌های بافت به یک فلاسک کشت (۲۵ سانتیمترمربع)، بمنظور بالا بردن میزان چسبندگی بافت‌ها به کف فلاسک‌کشت، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر سرم جنین گاو به فلاسک افزوده، به مدت ۱/۵ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده شد تا سرم خشک شود. سپس ۱۴ عدد تکه‌بافت باله به همراه ۴ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 حاوی پنی‌سیلین پتاسیم جی ($۲۰۰\ iu.ml^{-1}$)، استرپتومایسین سولفات ($۲۰۰\mu g.ml^{-1}$) و آمفوتریسین B ($۵\ \mu g.ml^{-1}$) توسط یک پیپت ۱۰ میلی‌لیتری دهانه گشاد که قبلاً جداره آن با محیط کشت L-15 خیس شده بود به فلاسک‌کشت منتقل شدند و بلافاصله تمامی محیط کشت از فلاسک خارج شد و فلاسک به انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شد تا تکه‌های بافت بر روی کف فلاسک‌ها قرارگیرند. پس از گذشت تقریباً ۱/۵ ساعت، ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت L-15حاوی۲۰ درصد سرم جنین گاو، پنی‌سیلین پتاسیم جی ($۱۰۰\ iu.ml^{-1}$)، استرپتومایسین سولفات ($۱۰۰\ \mu g.ml^{-1}$) و آمفوتریسین B ($۲/۵\ \mu g.ml^{-1}$) افزوده، در انکوباتور ۲۲ درجه سانتیگراد قرارداده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها بررسی شدند. بافت‌های جداشده از کف از فلاسک خارج گردیدند، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۲۰٪ سرم جنین‌گاو به‌دقت به فلاسک اضافه شد و در انکوباتور قرارگرفت. هرروز مقداری محیط‌کشت L-15 به فلاسک اضافه شد تا طی سه روز مقدار محیط‌کشت داخل فلاسک به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. هر ۵ روز نیمی از حجم محیط کشت داخل فلاسک‌کشت با محیط‌کشت جدید جایگزین شد. پس از دو هفته وقتی سلول‌ها در اطراف تکه‌های باله‌های کشت داده شده پدیدار شدند و به‌اندازه کافی سطح کف فلاسک را اشغال نمودند، سلول‌ها با محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها شستشو داده شدند و از طریق تیمار با محلول Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد تریپسین و ۰/۰۲ درصد EDTA، حل‌شده در محلول PBS عاری از یون‌های کلسیم و منیزیم) به مدت ۵ دقیقه و تکان دادن فلاسک کشت، از کف آن جدا شدند. فلاسک،کشت بمنظور کسب اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک مذکور، با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Nikon, Eclipse-Ti) مورد بررسی قرارگرفت. پس از سانتریفوژ نمودن سلول‌ها (با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۸ دقیقه) و افزودن سرم برای خنثی نمودن اثر تریپسین، سلول‌ها بمنظور کشت مجدد (ساب کالچر اول) به ۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت با همان ترکیب قبلی منتقل شدند. همین مراحل برای کشت مجدد بعدی (ساب‌کالچر دوم) نیز انجام شد.

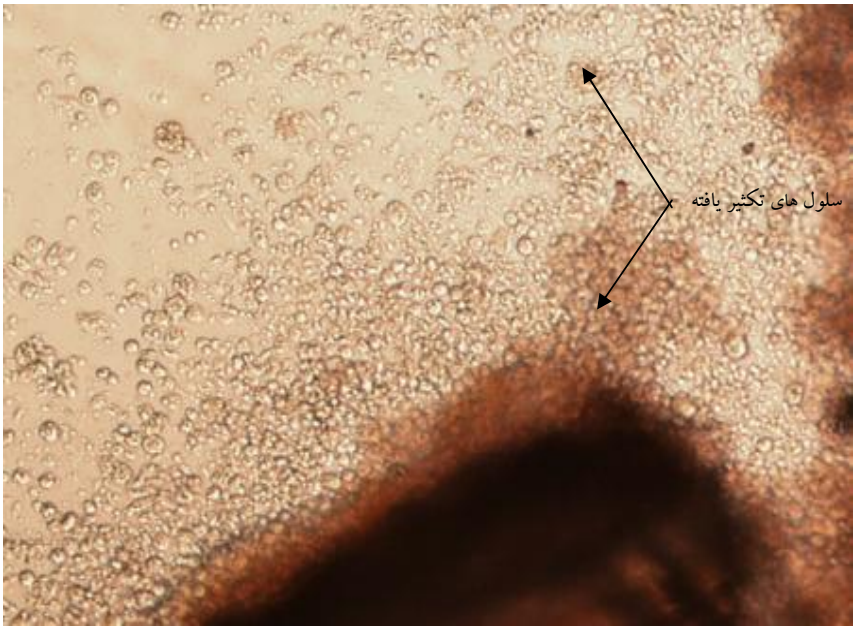
نتایج

طی بیست‌وچهار ساعت اول اغلب تکه‌های باله دمی کشت داده شده به کف ظرف کشت چسبیدند. درصد تکه‌های بافتی چسبیده به کف فلاسک در طول مدت کشت ۶۰ درصد بود. سلول‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت شروع به تکثیر نمودند و سلول‌های تکثیر یافته از حاشیه بافت به‌طرف خارج یعنی به سمت محیط‌کشت مهاجرت نمودند (شکل ۱). این سلول‌های اولیه باعث تثبیت تکه‌های بافتی به کف فلاسک شدند. تکثیر و مهاجرت سلول‌ها از تکه‌های بافتی کشت داده شده به‌طرف محیط کشت ادامه یافت و باگذشت زمان بیشتر شد. در روز هفتم سلول‌ها بخوبی تکثیر یافته بودند و تعداد زیادی سلول پیرامون تکه‌های باله‌دمی کشت داده شده مشاهده گردید (شکل‌های

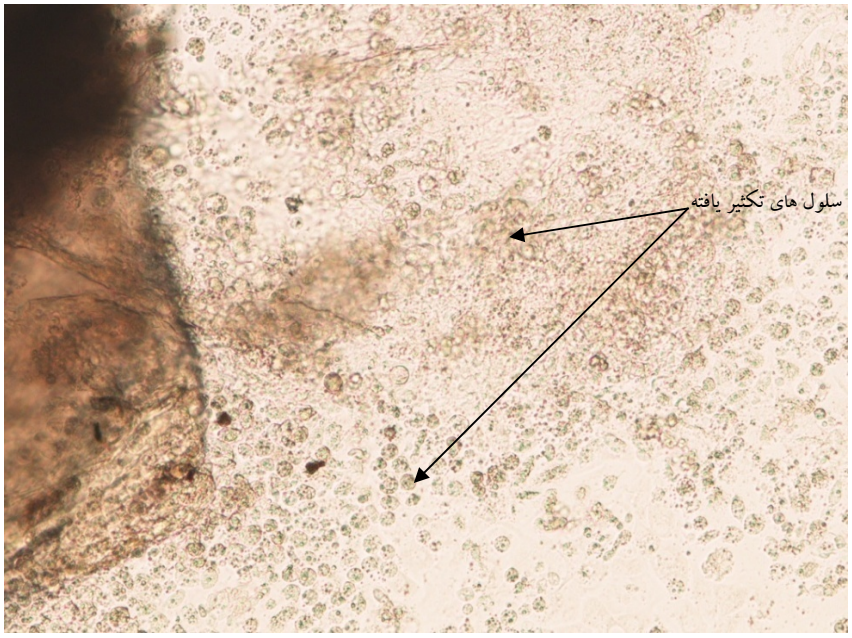
۲ و ۳).



شکل ۱–تکثیر سلول های باله دمی تاسماهی ایرانی در محیط کشت (۱۲۰ ×)

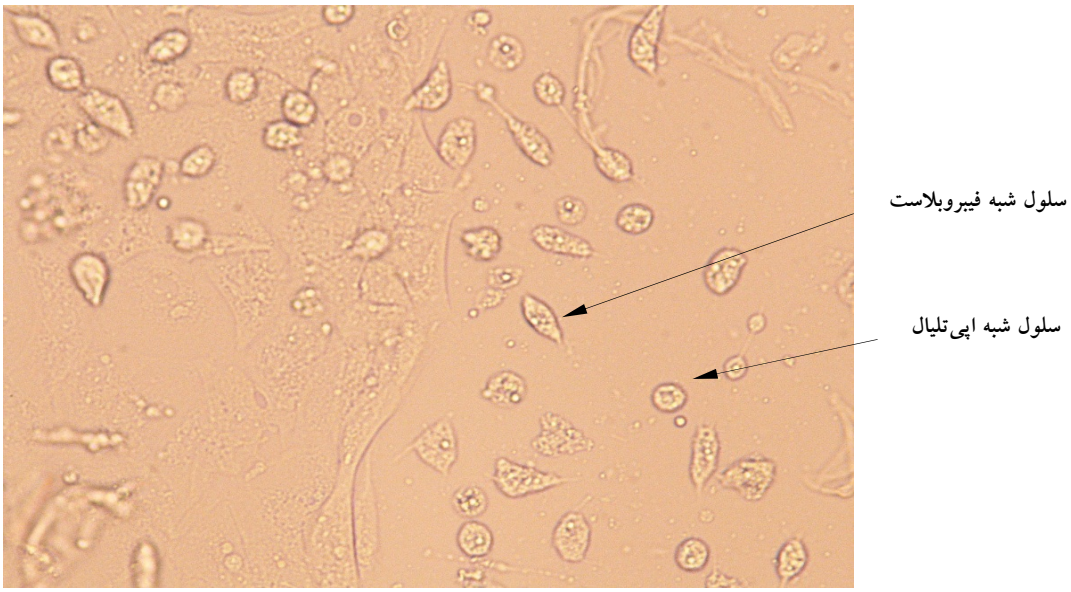


شکل ۲– تکثیر سلول های بافت باله تاسماهی ایرانی (۳۰۰ ×)



شکل ۳-تکثیر بافت باله تاسماهی ایرانی (۳۰۰ ×)

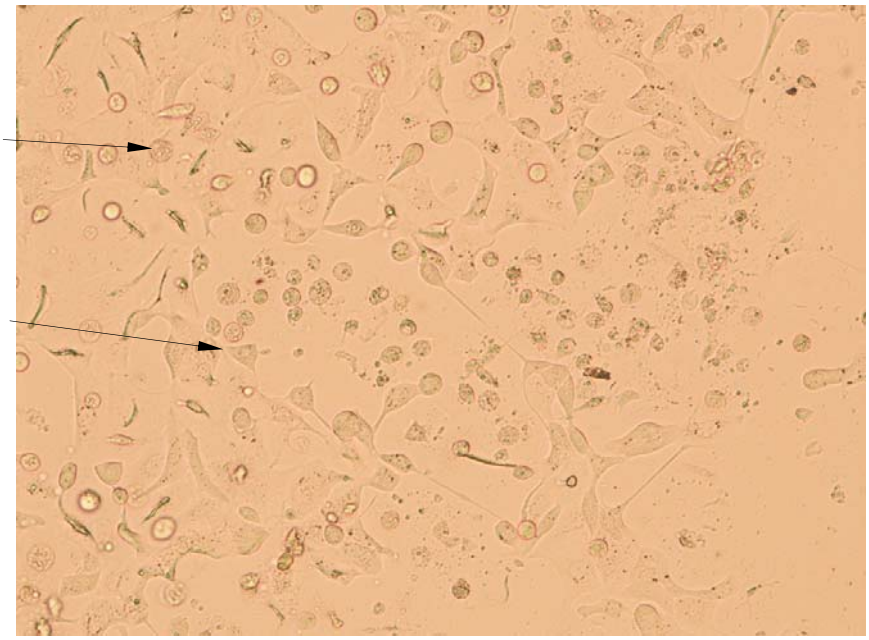
سلول‌های تکثیرشده گسترش یافتند و به نزدیکی تکه‌های بافتی مجاور رسیدند تا جایی که پس از گذشت دو هفته تقریباً ۹۰ درصد کف فلاسک را اشغال نمودند. در روز چهاردهم دو نوع سلول در محیط کشت وجود داشتند. سلول‌های شبه‌فیبروبلاست که ۷۰ تا ۸۰ درصد سلول‌ها و سلول‌های شبیه اپی‌تلیال (شکل ۴) که بقیه سلول‌ها را شامل می‌شدند.



شکل ۴- سلول های حاصل از کشت اولیه باله دمی تاسماهی ایرانی (۶۰۰ ×)

۷۵ درصد سلول‌های کشت داده شده (سلول‌های حاصل از ساب‌کالچر اول) به کف فلاسک چسبیدند و در محیط کشت جدید تکثیر شدند. در بین سلول‌های حاصل از ساب‌کالچر اول نیز سلول‌های شبه فیبروبلاست و شبه اپی-

تلیال وجود داشت (شکل ۵) و ۸۵ درصد سلول‌ها زنده بودند. در بین سلول‌های حاصل از ساب‌کالچر دوم نیز سلول‌های شبه فیبروبلاست و شبه‌اپی تلیال وجود داشت و ۷۲ درصد سلول‌ها زنده بودند. این سلول‌ها تا شش روز به حیات خود ادامه دادند و در روز هفتم تغییر شکل‌یافته، کم‌رنگ شدند و تکثیر آنها در روزهای بعد ادامه نیافت. بهترین تکثیرسلولی تکه‌های بافتی در محیط کشت L-15 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو و در دمای ۲۲ درجه-سانتیگراد بدست آمد و در محیط کشت‌هایM199 و DMEM/F12 هیچ تکثیرسلولی مشاهده نشد.



شکل ۵-سلول های حاصل از ساب کالچر اول (۶۰۰ ×)

بحث

در این تحقیق برای کشت باله‌دمی از تکه‌های بافتی (۱ تا ۲ میلی‌متر) بدون تیمار آنزیمی استفاده شد. در مورداستفاده از آنزیم برای تکه‌تکه کردن بافت قبل از کشت آن، بین محققین اختلاف‌نظر وجود دارد. اغلب محققین ابتدا بافت را به تکه‌های کوچکتر بریده، سپس بدون استفاده از آنزیم آنها را کشت دادند. این کار در مورد ماهی مداکا (۳۰)، ماهی سیم سرطلایی *Sparus aurata* (۲ و ۵) و ماهی mahseerطلایی *Tor putitora* (۴۷) انجام شد. برخی از محققین برای تکه‌تکه نمودن بافت از آنزیم استفاده کردند (۲۶ و ۳۳). برخی از آنها ابتدا تکه‌های بافت را مورد تیمار آنزیمی قراردادند سپس سلول‌های جداشده را کشت دادند (۲۶ و ۳۳)، استفاده از تکه‌های بافت نسبت به سوسپانسیون سلولی حاصل از تیمار آنزیمی دارای مزایایی نظیر سرعت و سهولت کار، امکان تعیین واکنش‌های بین سلولی، حفظ شکل طبیعی و سالم ماندن سلول‌ها است (۳ و ۴۶). گمان می‌رود تکه‌های بافت از نظر ساختمانی شباهت بیشتری به اندام طبیعی دارد (۳۹). در این تحقیق برای تکه‌تکه کردن بافت باله از روش هضم آنزیمی نیز استفاده شد ولی از کشت آنها نتایج خوبی بدست نیامد.

علیرغم استفاده از محیط کشت‌های M199، DMEM/F12 و L-15، تکثیر باله دمی فقط در محیط کشت L-15 مناسب بود و در سایر محیط‌کشت‌ها تکثیر سلولی مشاهده نشد. این موضوع باسایر مطالعات انجام‌شده (۲۰ و ۵۴) نیز سازگار می‌باشد. محیط‌کشت یکی از متغیرترین پارامترها بین محققین است (۵۹). چندین نوع محیط‌کشت ازجمله L- 15، DMEM/F12، MEM، DMEM و M199

برای کشت سلول‌های مختلف ماهی‌ها استفاده شده است. محیط‌کشت DMEM/F12 برای کشت سلول‌های پستانداران، پرندگان، خزندگان، دوزیستان و ماهیان استفاده می‌شود (۳ و ۵۹). محیط کشت L-15 به‌جای بیکربنات - سدیم دارای مقدار زیادی سدیم پیروات است و در صورت استفاده از این محیط کشت نیاز به افزودن گاز CO_2 به محیط کشت نیست. تکثیر سلول‌های چندین ماهی با استفاده از این محیط‌کشت موفقیت‌آمیز بود (۳۳، ۳۹، ۴۱ و۵۰) و به عقیده برخی از محققین (۳۵، ۳۹ و۵۰) این محیط‌کشت بهترین محیط‌کشت برای رشد سلول‌های ماهی است.

در این تحقیق زمانی که مقدار سرم جنین‌گاو موجود در محیط‌کشت از ۱۰ به ۲۰ درصد رسید میزان تکثیرسلولی بافت باله افزایش یافت و بیشترین میزان تکثیر سلولی باله-دمی زمانی محقق شد که ۲۰ درصد حجم محیط‌کشت سرم جنین‌گاو بود. این سرم توسط اکثر محققین برای غنی‌تر نمودن محیط‌کشت استفاده می‌شود زیرا دارای تعداد زیادی فاکتور رشد است (۴۰). بجار و همکاران (۵) و برادفورد (۹) از ۵ درصد سرم، فونتانا و همکاران (۲۲) و جوزف و همکاران (۳۱) از ۱۵درصد سرم، لاکرا و بونده (۳۸) و زوو و همکاران (۶۴) از ۲۰ درصد سرم در محیط‌کشت برای کشت سلول‌های ماهی‌های مختلف استفاده کردند. معمولاً از غلظت بیش از ۲۰ درصد سرم در محیط‌کشت استفاده نمی‌شود زیرا شواهدی وجود دارد که غلظت زیاد سرم در محیط کشت ممکن است از رشد سلول‌ها جلو-گیری نماید (۱۳ و ۲۳). علاوه‌بر رشد سلول‌ها سرم می-تواند نقش کلیدی در چسبیدن سلول‌ها به بستر و تکثیر آنها داشته باشد، نظیر آنچه در مورد تهیه رده‌های سلولی تاسماهی‌چینی (۶۴) و تحقیق حاضر مشاهده شد. رشد خوب سلول‌ها بستگی به چسبندگی خوب سلول‌ها به کف ظرف کشت دارد. چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف کشت اولین ضرورت موفقیت‌آمیز بودن کشت سلولی است. ازآنجایی‌که آغشته نمودن کف پلاستیکی ظرف کشت با فیبرونکتین باعث چسبندگی خوب سلول‌ها به کف و تکثیر مناسب آنها می‌گردد. بنابراین پوشاندن کف ظرف‌کشت با سرم که دارای فیبرونکتین است به چسبیدن بهتر تکه‌های بافت به کف ظرف‌کشت کمک می‌کند (۴۸).

خطر آلودگی میکروبی یکی از مشکلات اصلی کشت سلول است. استفاده از ماهیان سالم و شستشوی بافت با اتانول قبل از جداسازی بافت از بدن به‌تنهایی کافی نیست. بااستفاده درست از آنتی‌بویتیک‌ها و ضدقارچ می‌توان مانع بروز آلودگی میکروبی شد (۴۸). استفاده از دز زیاد این مواد نیز باعث تکثیر کم و یا توقف تکثیر سلول‌ها خواهد شد. در این تحقیق استفاده از پنی‌سیلین پتاسیم جی ($iu.ml^{-1}$ ۲۰۰)، استرپتومایسین‌سولفات ($\mu g.ml^{-1}$ ۲۰۰) و آمفوتریسین B ($\mu g.ml^{-1}$ ۵) در ترکیب محیط‌کشت برای از بین بردن آلودگی میکروبی مناسب بود. قبلاً نیز از پنی‌سیلین ($iu.ml^{-1}$ ۱۰۰۰)، استرپتومایسین سولفات ($\mu g.ml^{-1}$ ۱۰۰۰) و نیستاتین ($mg.ml^{-1}$ ۵) برای کشت باله-دمی تاسماهی چینی (۶۴)، از جنتامایسین ($\mu g.ml^{-1}$ ۱۰۰۰) و آمفوتریسین B ($\mu g.ml^{-1}$ ۲/۵) برای کشت باله دمی ماهی طلایی (۴۴)، از پنی‌سیلین ($iu.ml^{-1}$ ۱۰۰۰) و استرپتومایسین سولفات ($\mu g.ml^{-1}$ ۱۰۰) برای کشت باله دمی تاسماهی سیبری، تاسماهی سفید و فیلماهی (۲۲)، از پنی‌سیلین‌سدیم جی ($iu.ml^{-1}$ ۲۰۰)، استرپتومایسین سولفات ($\mu g.ml^{-1}$ ۲۰۰) و آمفوتریسین B ($\mu g.ml^{-1}$ ۵۰) برای کشت باله کپورماهی روهو (۴۸)، از ضدقارچ ($\mu g.ml^{-1}$ ۱/۲) و جنتامایسین ($\mu g.ml^{-1}$ ۵۰) برای کشت باله‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* (۱۷)، از پنی‌سیلین‌جی ($iu.ml^{-1}$ ۱۰۰۰۰)، استرپتومایسین-سولفات ($mg.ml^{-1}$ ۱۰) و آمفوتریسین B ($mg.ml^{-1}$ ۲۵) برای کشت باله ماهی سیم‌دریایی سر مخطط (۵) و بالاخره از پنی‌سیلین ($iu.ml^{-1}$ ۱۰۰) و استرپتومایسین ($\mu g.ml^{-1}$ ۱۰۰) برای کشت باله ماهی توربوت (۱۸) استفاده شد.

در این مطالعه مشخص گردید استفاده از دمای ۲۵ درجه-سانتیگراد به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت برای چسبیدن تکه‌های بافت باله به کف ظرف‌کشت و دمای ۲۲درجه سانتیگراد برای تکثیر یافتن سلول‌های باله‌دمی تاسماهی ایرانی مناسب بود. در آزمایش‌های انجام‌شده طی این تحقیق مشاهده شد دمای بیش از ۲۵ درجه سانتیگراد برای کشت سلول‌های باله‌دمی تاسماهی ایرانی مناسب نیست و مانع تکثیر سلول‌های باله می‌شود. برخی مطالعات هم نشان داد بیشترین میزان تکثیر رده‌های سلولی ماهیان در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه‌سانتیگراد انجام‌شده است (۳۲ و ۵۳) و دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه‌سانتیگراد برای بسیاری از رده‌های سلولی ماهی‌ها مهلک است (۵۳). همچنین گزارش‌شده است اغلب رده‌های سلولی بدست آمده از ماهیان سرد آبی در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتیگراد تکثیر می‌یابند (۲۱) و دمای بیش از۲۰ درجه سانتیگراد برای کشت سلول‌های ماهیان سرد آبی مناسب نیست و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد یک عامل بازدارنده تقسیمات سلولی ماهیان مذکور (۲۱ و ۶۰) می‌باشد. بیشترین میزان تکثیر رده های سلولی ماهیان گرمابی نیز در دماهای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد (۳۲ و ۵۳)، ۲۸ درجه سانتیگراد (۳۶، ۳۷ و۵۰) و ۳۲ درجه سانتیگراد (۳۷) گزارش‌شده است. نتایج کسب‌شده در این تحقیق نشان داد باله‌دمی تاسماهی ایرانی برای کشت مناسب است و در آینده می‌تواند به‌عنوان منبعی مناسب برای تهیه رده‌های سلولی استفاده شوند. کشت باله اغلب در مورد باله‌دمی انجام‌شده است (۳۴ و ۶۳) و این کار در مورد تعدادی از گونه‌ها انجام‌شده است (۲۶، ۳۱ و ۶۳). زیرا سلول‌های آن از پتانسیل بالای تکثیر برخوردارند و نمونه‌برداری از باله مذکور بدون آسیب رساندن و یا کشتن ماهی امکانپذیر است.

اولین سلول‌هایی که از بافت باله به‌طرف محیط کشت مهاجرت کردند سلول‌های شبه فیبروبلاست و شبه اپی‌تلیال بودند، اما در مراحل بعدی کشت (ساب‌کالچرها) تعداد سلول‌های شبه‌اپی‌تلیال کاهش یافتند و تعداد سلول‌های شبه فیبروبلاست بیشتر بود. غالب بودن تعداد سلول‌های شبه فیبروبلاست بر سلول‌های شبه اپی‌تلیال در مورد سایر ماهیان نیز گزارش‌شده است (۵، ۱۴ و ۳۷). فرش‌نی (۲۳) عنوان داشت برخی از پروتئین‌های ترشح شده از پلاکت-های خون که در سرم جنین‌گاو وجود دارد دارای اثر میتوژنی قوی بر سلول‌های فیبروبلاست است ولی اثر بازدارنده در تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال دارد (۲۳). بنابراین باعث غالبیت سلول‌های شبه‌فیبروبلاست بر سلول‌های شبه اپی‌تلیال در ساب‌کالچرها می‌گردد. افزایش رقت محیط-کشت یا شستشوی سلول‌ها با آب مقطر بجای محلول PBS نیز می‌تواند باعث لیز شدن و تخریب سلول‌های شبه اپی‌تلیال و درنتیجه غالب شدن تعداد سلول‌های شبه فیبروبلاست در محیط کشت گردد (۲۲). نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد سلول‌های شبه فیبروبلاست حاصل از کشت باله دمی تاسماهی ایرانی دارای توانمندی بالای تکثیر هستند و می‌توانند مجدداً با موفقیت کشت داده شوند.

منابع

1- Akimenko, M. A., Mari-Beffa, M., Becerra, J., and Geraudie, J., 2003. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. Developmental Dynamics, 226, PP: 190–201.

2- Alvarez, M. C., Otis, J., Amores, A., and Guise, K., 1991. Short term cell culture technique for obtaining chromosomes in marine and freshwater fish, Journal of Fish Biology, 39, PP: 817–824.

3- Avella, M., Berhaut, J., and Payan, P., 1994. Primary culture of gill epithelial cells from the sea bass *Dicentrarchus labrux*, In Vitro Cell and Developmental Biology, 30, PP: 41-49.

4- Babich, H., Rosenberg, D. W., and Borenfreund, E., 1991. In vitro cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*), Journal of Ecotoxicology Environmental Safety, 21, PP: 327−336.

5- Bejar, J., Borrego, J. J., and Alvarez, M. C., 1997. A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head sea bream *Sparus aurata*, Aquaculture, 150, PP: 143-153.

6- Bols, N. C., and Lee, L. E. J., 1991. Technology and uses of cell culture from tissues and organs of bony fish, Cytotechnology, 6 (3), PP: 163-187.

7- Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C., and Lee, L. E. J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish, Developmental & Comparative Immunology, 25 (8-9), PP: 853-873.

8- Bols, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J., and Schirmer, K., 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish, Piscine cell lines in environmental toxicology, In: Mommsen TP, Moon TW (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol 6. Environmental toxicology, Elsevier, Amsterdam, PP: 43−84.

9- Bradford, C. S., 1997. Characterization of cell cultures derived from Fugu, the Japanese Puffer fish. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 6 (4), PP: 279-288.

10- Butler, M., 2004. Animal Cell Culture and Technology, BIOS Scientific Publishers, Tylor & Francis Group, London and New York, 299 p.

11- Casiano, H., Choresca, J., kang, J. K., Han, J. E., Kim, J. H., Shin, S. P., Jun, J. W., Lee, B., C., and Park, S. C., 2012. Effect of storage media and time on fin explants culture in the goldfish *Carassius auratus*. African Journal of Biotechnology, 11 (24), PP: 6599-6602.

12- Castano, A., Bols, N. C., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L. E. J., Mothersill, C., Part, P., Repetto, G., Riego Sintes, J., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., and Segner, H., 2003. The use of fish cells in ecotoxicology, Alternatives to Laboratory Animals, 31, PP: 317–351.

13- Chen, S. L., and Qin, Q. W., 2011. Theory and Technology of Fishes Cell Culture, Beijing Science Press, 289P.

14- Chi, S. C., Hu, W. W., and Lo, B. J., 1999. Establishment and characterization of a continuous cell line GF-I derived from grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus GNNV, Journal of Fish Diseases, 22, PP: 173-182.

15- Clem, L. W., Bly, J. E., Wilson, M., Chinchar, V. G., Stuge, T., Barker, K., Luft, C., Rycyzyn, M. Hogan, R.J., Van Lopik, T., and Miller, N.W., 1996. Fish immunology: the utility of immortalized lymphoid cells, a mini review, Veterinary Immunology and Immunopathology. 54, PP: 137-144.

16- Dong, C., Weng, S., Li, W., Li, X., Yi, Y., Liang, Q., and Gianguo, H., 2011. Characterization of a new cell line from caudal fin of koi, *Cyprinus carpio koi* and first isolation of cyprinid herpesvirus in China.Virus Research, 161, PP: 140-149.

17- Estepa, A., Frias, D., and Coll, J. M., 1993. In vitro susceptibility of rainbow trout fin cells to viral haemorrhagic septicaemia virus. Diseases of Aquatic Organisms, 15, PP: 35-39.

18- Fan, T. J., Ren, B. X., Geng, X. F., Yu, Q. T., and Wang, L. Y., 2010. Establishment of a turbot fin cell line and its susceptibility toturbot reddish body iridovirus. Cytotechnology, 62 (3), PP: 217-223.

19- Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Toxicology In Vitro, 15, PP: 477-488.

20- Fernandez, R. D., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T., 1993a. Comparative growth response of fish cell lines in different media, temperature and sodium chloride concentrations, Fish Pathology, 28, PP: 27-34.

21- Fernandez, R. D., Yoshimizu, M., Kimura, T., and Ezura, Y., 1993c. Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish, Journal of Aquatic Animal Health, 15 (2), PP: 137-147.

22- Fontana, F., Rossi, R., Lanfredi, M., Arlati, G., and Bronzi, P., 1997. Cytogenetic characterization of cell lines from three sturgeon species, Caryologia, 50 (1), PP: 91-95.

23- Freshney, R. I., 2000. Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 4th edition, Wiley-Liss, JohnWiley and Sons, Inc, Publ, New York, 577 p.

24- Fryer, J., and Lannan, C., 1994. Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes. Methods in Cell Science, 16 (2), PP: 87-94.

25- Grunow, B., Noglick, S., Kruse, C., and Gebert, M., 2011. Isolation of cells from Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* and optimization of culture conditions, Aquatic Biology, 14, PP: 67–75.

26- Hashimoto, H., Toyohara, H., Yokoyama, Y., Sakaguchi, M., Ozato, K., and Wakamatsu, Y., 1997. Effects of Carp serum on the growth of gold fish fin cells in early passage. Journal of Fish Biology, 50, PP: 201–207.

27- Hightower, L. E., and Renfro, J.L., 1988. Recent applications of fish cell culture to biomedical research, Journal of Experimental Zoology, 248, PP: 290−302.

28- Holcik, J., 1989. The freshwater fishes of Europe, Vol I/II, General Introduction to fishes Acipenseriformes, Aula-Verlag Wiesbaden 468, PP: 342-362.

29- Iovine, M. K., 2007. Conserved mechanisms regulate outgrowth in zebra fish fins. Nature Chemical Biology, 3, PP: 613-618.

30- Ju, B., Pristyazhnyuk, I., Ladygina, T., Kinoshita, M., Ozato, K., and Wakamatsu, Y., 2003. Development and gene expression of nuclear transplants generated by transplantation of cultured cell nuclei into none-nucleated eggs in the medaka *Oryzias latipes*. Development, Growth & Differentiation, 45, PP: 167–174.

31- Joseph, M. A., Sushmitha, R. K., Mohan, C. V., and Shankar, K. M., 1998. Evaluation of tissues of Indian major carps for development of cell lines by explant method. Current Science, 75, PP: 1403-1406.

32- Kang, M. S., Oh, M. J., Kim, Y. J., Kawai, K., and Jung, S. J., 2003. Establishment and characterization of two new cell lines derived from founder, *Paralichtys olivaceus* (Temminck & Schlegel), Journal of Fish Diseases, 26, PP: 657- 665.

33- Komura, J. I., Mitani, H., and Shima, A., 1988. Fish cell culture: establishment of two fibroblast-like cell lines (OL-17 and OL-32) from fins of the medaka *Oryzias latipes*. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 24, PP: 294–298.

34- Kondo, H., and Watabe, S., 2004. Temperature-dependent enhancement of cell proliferation and mRNA expression for type I collagen and HSP70 in primary cultured goldfish cells, Journal of Comparative Biochemistry and Physiology, 138 (2), PP: 221– 228.

35- Kumar, G. S., Singh, I. B. S., and Philip, R., 2001. Development of a cell culture system from the ovarian tissue of African catfish *Clarius gariepinus*, Aquaculture, 194, PP: 51-62.

36- Lai, Y. S., Murali, S., Ju, H. Y.,Wu, M. F., Guo, I. C., Chen, S. C., Fang, K., and Chang, C. Y., 2000. Two iridovirus susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, *Epinephelus awoara* (Temmick & Schlegeli), and partial characterization of grouper iridovirus, Journal of Fish Diseases, 23, PP: 379-388.

37-Lai, Y. S., John, J. A. C., Lin, C. H., Guo, I. C., Chen, S. C., Fang, K., Lin, C. H., and Chang, C. Y., 2003. Establishment of cell lines from a tropical grouper *Epinephelus awoara* (Temminck and Schlegel) and their susceptibility to grouper irido and noda viruses. Journal of Fish Diseases, 26, PP: 31-42.

38- Lakra, W. S., and Bhonde, R. R., 1996. Development of primary cell culture from the caudal fin of an Indian major carp *Labeo rohita* (Hamilton), Asian Fisheries Science, 9, PP: 149-152.

39- Lakra, W. S., Sivakumar, N., Goswami, M., and Bhonde, R., 2006. Development of two cell culture systems from Asian Seabass *Lates calcarifer*, Aquaculture Research, 37, PP: 18-24.

40- Lakra, W. S., Swaminathan, T. R., and Joy, K. P., 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines, a review. Fish Physiology and Biochemistry, 37 (1), PP: 1-20.

41- Leibovitz, A., 1963. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. American Journal of Hygiene, 78, PP: 173-180.

42- Lester, k., 2007. Primary cell cultures from Cod *Gadus morhua* and Atlantic Halibut *Hippoglossus*. A thesis submitted in the fulfilment of the requirements of Stirling University for the degree of Master of Philosophy, Stirling University In collaboration with Fisheries Research Services Aberdeen, 64 p.

43- Liu, T. M.,Yu, X. M., Ye, Y. Z., Zhou, J. F., Wang, Z. W., Tong, J. G., and Wu, C. J., 2002. Factors affecting the efficiency of somatic cell nuclear transplantation in the fish embryo, Journal Experimental Zoology, 293(7), PP: 719–725.

44- Mauger, P. E., LeBail, P. Y., and Labbé, C., 2006. Cryobanking of fish somatic cells, Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation, Comparative Biochemistry and Physiology, 144 (1), PP: 29-37.

45- Nowruzfashkhami, M. R., Safaiian, S., Bahmani, M., and Chubian, F., 2006. Karyotype analysis in ship sturgeon *Acipenser nudiventris* in the

south Caspian Sea using leukocyte culture, Journal of Applied Ichthyology, 22, PP: 97–98.

46- Parkinson, E. K., and Yeudall, W. A., 1992. The epidermis, In: Culture of epithelial cells ed. Freshney RIWiley-Liss, New York, PP: 59-80.

47- Prasanna, I., Lakra, W. S., Ogale, S. N., and Bhonde, R.R., 2000. Cell culture from fin explant of endangered golden mahseer, *Tor putitora* (Hamilton), Current Science, 79 (1), PP: 93-98.

48- Rathore, G., Kumar, G., Swaminathan, T. R., Sood, N., Singh, V., Abidi, R., and Lakra, W.S., 2007. Primary cell culture from fin explants of *Labeo rohita* (Hamilton), Indian Journal of Fisheries. 54 (1), PP: 93-97.

49- Ryan, L. A., Seymour, C. B., O'Neill-Mehlenbacher, A., and Mothersill, C. E., 2008. Radiation- induced adaptive response in fish cell lines, Journal of Environmental Radioactivity, 99 (4), PP: 739–747.

50- Sathe, P. S., Basu, A., Mourya, D. T., Marathe, B. A., Gogate, S. S., and Banerjee, K., 1997. A cell line from the gill tissues of Indian cyprinoid *Labeo rohita*, In Vitro Cellular & Developmental Biology, 33, PP: 425-427.

51- Schaeffer, W. I., 1990. Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 26, PP: 97−101.

52- Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish, Toxicology, 224, PP: 163–183.

53- Tong, S. L., Li, H., and Miao, H. Z., 1997. The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line FG-9307 from the gill of founder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 56, PP: 327-333.

54- Tung, L. C., Chen, S. N., and Kou, G. H., 1991. Three cell lines derived from spleen and kidney of black porgy *Acanthopagrus schlegeli*. Gyobyo Kenkyu (Fish pathology), 26 (3), PP: 109-117.

55- Villena, A. J., 2003. Application and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture, Reviews in Fish Biology Fisheries, 13, PP: 111–140.

56- Vishnyakova, K. S., Mugue, N. S., Zelenina, D. A., Mikodina, E. V., Kovaleva, O. A., Madan, G. V., and Yegorov, Y. E., 2009. Cell culture and karyotype of Sakhalin sturgeon *Acipenser mikadoi*, Membrane and Cell Biology, 3 (1), PP: 42-54.

57- Wang, X., Yang, J., Chen, X., and Pan, X., 2012. Establishment and characterization of fibroblast-like cell line from *Anabarilius graham*, Zoological Research, 33, PP: E89-E97.

58- Wolf, K., and Quimby, M. C., 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro, Science, 135, PP: 1065-1066.

59- Wolf, K., and Quimby, M. C., 1969. Fish Cell and Tissue Culture In: Hoar WS, Randall DJ (Eds), Fish Physiology, volume III, Academic Press, New York, PP: 253-305.

60- Wolf, K., and Mann, J. A., 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses a current listing for fishes. In Vitro, 16 (2), PP: 168-179.

61- Wolf, K., and Ahne, W., 1982. Fish Cell culture. In Advances in cell culture Vol. 2 (Ed. Maramorosch K), New York Academic Press, PP: 305-328.

62- Wolf, K., 1988.Viral hemorrhagic septicemia. In:Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY, p 217-249.

63- Zhou, L. R., Deane, E. E., and Woo, N. Y. S., 2003. Development of a black sea bream fibroblast cell line and its potential use as an in vitro model for stress protein studies. Fish Physiology & Biochemistry. 29, PP: 255–262.

64- Zhou, G. Z., Gui, L., Li, Z., Yuan, X., and Zhang, Q., 2008. Establishment of a Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* tail fin cell line and its susceptibility to frog iridovirus, Journal of Fish Biology, 73 (8), PP: 2058-2067.

Caudal fin tissue culture of Persian sturgeon *Acipenser persicus*

Nowruzfashkhami M.R.[1], Pourkazemi M.[2], Hassanzadeh Saber M.[1], Baradrannoveiri S.[1], Bahmani M.[1], Daliri M.[3] and Ghoroghi A.[2]

[1] Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), International Sturgeon Research Institute, Rasht, I.R. of Iran

[2] Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Research Organization (I.F.R.O), Tehran, I.R. of Iran

[3] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Primary cell lines were established from the culture of explants of caudal fin of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. The margin of the caudal fin from a two year old specimen (23 cm in length, and 133 g in weight) was aseptically cut (2 cm), washed three times with PBS containing antibiotics and then minced into 1mm explants and cultured in L-15 medium complemented with antibiotics and FBS (20%) at 22°C. After confluent monolayer formation on the bottom of the flask, the cells were washed with PBS containing antibiotics and dislodged by trypsin-EDTA solution (0.25%) and shaking the flask. After washing the cells with PBS containing the antibiotics, they were cultured in 5 ml of L-15 medium, FBS (20%), antibiotics at 22 °C (first subculture). After a confluent monolayer formation, a similar procedure was followed for the second subculture. The emerging cells from explants exhibited fibroblast-like and epithelial-like cells in primary culture but the fibroblast-like cells were seen to predominate after the first subculture. In the present study the establishment of cell lines from the original culture at two passages was investigated.

Key words: Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, tissue culture, caudal fin