دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی"
دوره پنجم، شماره سوم، پاییز ۹۶
http://jair.gonbad.ac.ir

تاثیر محیط کشت پایه، سرم جنین گاو (FBS) و دما بر کشت سلول‌های فولیکولی تاسماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758

محمدرضا نوروزفشخامی*[۱]، محمد سوداگر[۲]، محمود بهمنی[۳]، نگین سلامات[۴]، محمد مازندرانی[۲]

[۱]استادیار سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران
[۲]دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۳]استاد سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران
[۴]استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۲/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۳۰

چکیده

دراین تحقیق پس از بیهوش نمودن یک عدد تاسماهی استرلیاد ماده پرورشی ۶ ساله به وزن ۷۲۹ گرم و طول ۴۷/۳ سانتی‌متر و با استفاده از پودر گل میخک (۰/۴ گرم در لیتر)، قسمتی از تخمدان خارج شد. تخمک‌ها از یکدیگر جدا شدند و پس از شستشو با بافر PBS استریل حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها، سلول‌های فولیکولی از طریق تیمار تخمک‌ها با Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد) حل شده در PBS عاری از یون‌های کلسیم و منیزیوم جدا شدند و در محیط کشت L-15 دارای۲۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) و آنتی‌بیوتیک‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند (۱/۲۵×۱۰^{۶} clls/ml). پس از دوازده روز، زمانی که به مقدار کافی یک لایه سلولی روی کف فلاسک کشت تشکیل شد، سلول‌ها با استفاده از Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد) از کف فلاسک جدا شدند و با PBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها شستشو و کشت داده شدند. در این تحقیق از محیط کشت‌های L-15، DMEM/F12 و M199، غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم جنین گاو و دماهای۲۰، ۲۲ و ۲۵ درجه سانتیگراد استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت L-15 تکثیر خوبی را نشان دادند ولی در محیط کشت‌های دیگر تکثیری مشاهده نشد و در دماهای۲۰ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد توانستند تکثیر یابند که دمای ۲۲ درجه ایده‌آل بود. همچنین میزان تکثیر سلول‌های فولیکولی زمانی که مقدار FBS محیط کشت از ۱۰ درصد به ۲۰

*نویسنده مسئول: nowruzfashkhami@yahoo.com

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

درصد رسید، افزایش یافت. بهترین تکثیر در غلظت ۲۰ درصد FBS مشاهده شد. بیشترین تکثیر سلولی در محیط کشت L-15 دارای ۲۰ درصد FBS و دمای انکوباسیون ۲۲ درجه سانتیگراد بدست آمد.

واژه‌های کلیدی **: *A. ruthenus*، سرم جنین گاو (FBS)، سلول‌های فولیکولی، L-15**

مقدمه

سلول‌های ماهی، مانند سلول‌های سایر مهره‌داران از جمله پستانداران در محیط خارج از بدن (in vitro) قابل کشت هستند (Bols and Lee, 1991) و روش‌کار بسیار شبیه روش کار مورد استفاده برای کشت سلول‌های پستانداران است (Wolf and Ahne, 1982). سلول‌های فولیکولی که تخمک ماهی را احاطه نموده‌اند (Unal *et al*., 2005) و نقش مهمی را در ترشح آنزیم‌های مؤثر در تکثیر و رسیدگی تخمک برعهده دارند (Nagahama, 1994) نیز می‌توانند تحت شرایط مساعد آزمایشگاهی کشت داده شوند (Stoklosowa and Epler, 1985; Salamat *et al*., 2010). کشت سلول این امکان را برای سلول‌ها فراهم می‌کند که مانند یک واحد حیاتی مستقل نظیر بسیاری از ارگانیزم‌ها از جمله باکتری‌ها و یا قارچ‌ها به‌حیات خود ادامه دهند، تقسیم شوند و سلول‌های بوجود آمده به تکثیر خود ادامه دهند تا این که برخی عوامل نظیر کمبود موادغذایی، دمای نامناسب تکثیر آنها را متوقف کند. کشت سلول‌های متعلق به بافت اصلی، کشت اولیه (Primary culture) نامیده می‌شود. در صورت انجام کشت‌های مجدد (Subcultures) و متوالی (Passages)، سلول‌های ضعیف از بین خواهند رفت و سلول‌های قوی‌تر و همگن تحت عنوان رده سلولی (Cell line) به‌حیات خود ادامه خواهند داد (Freshney, 2005).

رده‌های سلولی ماهیان برای شناسایی ویروس‌ها (Sobhana *et al*., 2009)، تاثیر داروهای ضدویروس، تولید واکسن، بررسی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، سیتوژنتیک، سرطان‌شناسی و سم‌شناسی (Kojima *et al*., 2011; Kienzler *et al*., 2012)، ایمنولوژی (Goswami *et al*., 2012; Bols *et al*., 2001)، بررسی اثر آلاینده‌های محیط زیست (Bols *et al*., 2005; Schirmer, 2006)، آبزی‌پروری (Bols and Lee, 1991)، تولید مکمل‌های غذایی نظیر اسید چرب امگاتری برای صنایع غذایی (Grunow *et al*., 2011)، حفظ ذخایر ماهیان کمیاب و در معرض خطر انقراض و حفظ تنوع گونه‌ای (Zhou *et al*., 2008; Chen and Qin, 2011)، اندوکرینولوژی (Thomas, 2012)، کلونینگ (Ju *et al*., 2003)، بیوتکنولوژی (Tafalla *et al*., 2006) و ژنتیک مولکولی از جمله بررسی بیان ژن (Holopainen *et al*., 2012) استفاده می‌شود. اولین رده سلولی ماهی از گناد ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان تهیه شد (Wolf and Quimby, 1962). طی دهه‌های گذشته کشت بافت‌های

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

مختلف ماهیان توسعه یافت و تا سال ۱۹۸۰ تعداد ۶۱ رده سلولی از ۳۶ گونه ماهی متعلق به ۱۷ خانواده (Fent, 2001)، تا سال ۱۹۹۳ تعداد ۱۵۹ رده سلولی (Fryer and Lennan, 1994) و تا سال ۲۰۱۱ تعداد ۲۸۳ رده سلولی بافت‌های مختلف ماهیان توسط محققین تهیه شد (Lakra *et al*., 2011) که تعدادی از آنها به‌صورت منجمد در بانکهای سلولی کشورهای مختلف از جمله بانک سلولی آمریکا[1]، بانک سلولی اروپا[2] (Crespo *et al*., 2012)، چین (Chen and Qin, 2011) و بانک سلولی هندوستان[3] (Goswami *et al*., 2014) نگهداری می‌شوند.

با توجه به اهمیت روزافزون کاربردهای رده‌های سلولی ماهیان، دراین تحقیق بررسی تأثیر نوع محیط کشت پایه، دما و غلظت سرم جنین گاو (FBS[4]) بر کشت سلول‌های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) به‌منظور بدست آوردن بهترین شرایط برای کشت سلول‌های مذکور انجام شد. تاسماهی استرلیاد که در این تحقیق به‌عنوان ماهی مدل استفاده شد، در نواحی معتدل اروپا و آسیا (Riede, 2004) از جمله نواحی شمالی دریای خزر و رودخانه‌هایی که به دریاهای خزر، سیاه، آزوف و بالتیک می‌ریزند یافت می‌شود. این ماهی احتیاج به مراقبت کمی دارد و تنوع غذایی آن زیاد است (Holčík, 1989). لذا مورد توجه بسیاری از کشورها است و برای آبزی‌پروری، تولید خاویار و به‌عنوان ماهیان زینتی برای نگهداری در آکواریوم استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از یک عدد ماهی استرلیاد پرورش یافته به وزن ۷۲۹ گرم و طول ۴۷ سانتی‌متر استفاده شد. ابتدا ماهی مورد نظر را با استفاده از پودر گل میخک (۰/۴ گرم در لیتر) بیهوش نموده، پس از خارج نمودن قسمتی از تخمدان، تخمک‌ها از بافت بینابینی جدا شدند. سپس سلول‌های فولیکولی با استفاده از محلول Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد عاری از یون‌های کلسیم و منیزیوم، Gibco) و روش استوکلوزووا و ایپلر (Stoklosowa and Epler, 1985) با کمی تغییرات (Nowruzfashkhami *et al*., 2016) از تخمک‌ها جدا شدند. پس از رنگ‌آمیزی سلول‌های فولیکولی با رنگ تریپان بلو (۰/۴ درصد)، تعیین تراکم سلول‌های فولیکولی و درصد سلول‌های زنده با استفاده از لام هماسیتومتر (Doyle and Griffins,1998)، این سلول‌ها به یک فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت L-15، ۲۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، استرپتو مایسین سولفات (µg/ml ۱۰۰)، پنی‌سیلین پتاسیم G (Iu/ml ۱۰۰) و آمفوتریسین B (۲/۵µg/ml) منتقل شدند ($۱/۲۵\times۱۰^{۶}$)

1- American Tissue Culture Collection (ATCC)
2- European Collection of Cell Cultures (ECACC)
3- National Repository of Fish Cell Line (NRFC)
4- Fetal Bovin Serum

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت دوازده روز یعنی زمانی که سلول‌های تکثیر یافته بخش اعظم کف فلاسک کشت را اشغال نمودند محیط کشت را خارج نموده، پس از شستشوی سلول‌ها با محلول بافر PBS (×۱) و جدا نمودن آنها از کف فلاسک کشت با استفاده از محلول Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد)، سوسپانسیون سلولی بدست آمده به یک فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی محیط کشت تازه منتقل شدند. پس از گذشت یک هفته سلول‌های فولیکولی داخل فلاسک کشت پس از شستشو با محلول بافر PBS (×۱) و جدا نمودن از کف فلاسک کشت مجدداً کشت داده شدند (ساب کالچر دوم). همچنین بررسی تاثیر نوع محیط کشت پایه، غلظت سرم (FBS) موجود در محیط کشت و دماهای مختلف بر رشد و تکثیر سلول های حاصل از کشت اولیه سلول‌های فولیکولی نیز انجام شد. به‌منظور بررسی تأثیر محیط کشت‌های M199 (Gibco)، DMEM/F12 (Gibco) و L-15 (Sigma) بر تکثیر سلول‌های فولیکولی، سلول‌های جدا شده در محیط کشت‌های مذکور با ۳ تکرار برای هر محیط کشت (جمعاً ۹ نمونه) تحت دمای ۲۰ درجه سانتیگراد کشت داده شدند (در هر نمونه ۱۰۰۰۰۰ عدد سلول). سپس تعداد سلول‌های موجود در محیط کشت‌ها بطور روزانه و طی ۵ روز با استفاده از لام هماسیتومتر شمارش شدند. به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف سرم (۱۰، ۱۵ و۲۰ درصد) موجود در محیط کشت بر رشد و تکثیر سلول‌های فولیکولی، سلول‌های فولیکولی جدا شده در محیط کشت L-15 حاوی درصدهای مختلف سرم جنین گوساله، در قالب سه گروه و هر گروه با ۳ تکرار (جمعاً ۹ نمونه) تحت دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند (در هر نمونه ۱۰۰۰۰۰ عدد سلول). تعداد سلول‌های موجود در هر نمونه به‌طور روزانه و طی پنج روز با استفاده از لام هماسیتومتر شمارش شدند. جهت بررسی تأثیر دماهای مختلف بر تکثیر و تکثیر سلول‌های فولیکولی نیز سلول‌های فولیکولی جدا شده در محیط کشت L-15 و تحت دماهای ۲۰، ۲۲ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد (تعداد سه نمونه در هر یک از دماهای مذکور) کشت داده شدند (جمعاً ۹ نمونه، در هر نمونه ۱۰۰۰۰۰ عدد سلول). طی ۵ روز متوالی، تعداد سلول‌های فولیکولی زنده در هر نمونه با استفاده از لام هماسیتومتر شمارش شدند. پس از شمارش تعداد سلول‌ها در هر نمونه و مشخص شدن میانگین تعداد سلول‌ها در هرگروه، نتایج ثبت و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۰) و انجام آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار EXCEL 2007 انجام شد.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

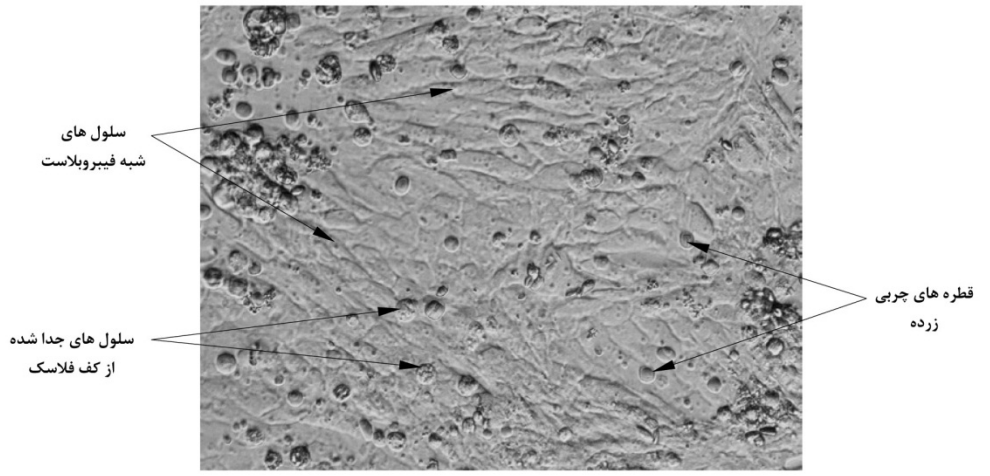
نتایج

در نتیجه تأثیر ترپسین بر تخمک‌ها، سلول‌های فولیکولی به خوبی از تخمک‌ها جدا شدند و در زیر میکروسکوپ اینورت بصورت سلول‌های انفرادی با اندازه‌های مختلف قابل مشاهده بودند (شکل ۱).

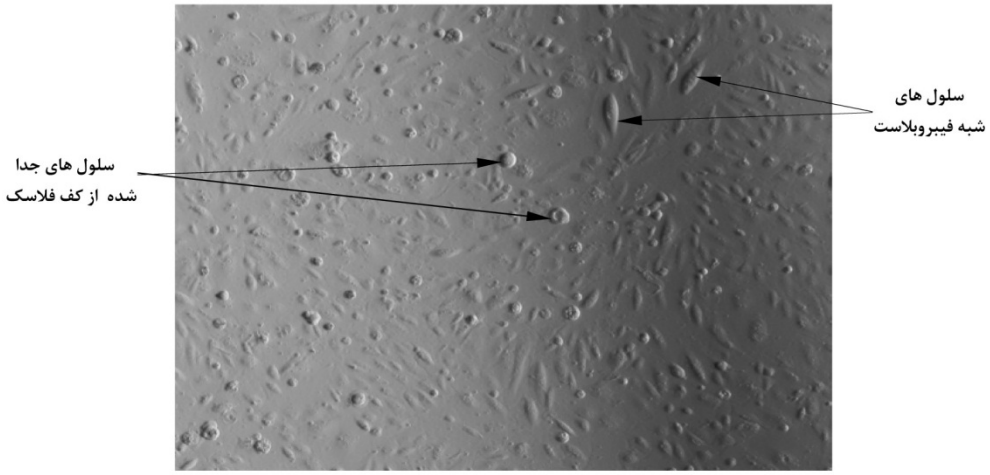
شکل ۱- سلول‌های فولیکولی جدا شده از تخمک‌های تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) مورد آزمایش (× ۱۲۰)

بررسی نمونه کشت داده شده با استفاده از میکروسکوپ اینورت حاکی از چسبیدن سلول‌های فولیکولی به کف فلاسک کشت و تکثیر سلول‌های مذکور بود. علاوه بر سلول‌های مذکور، تعدادی سلول‌های جدا شده از کف فلاسک کشت به‌صورت شناور در محیط کشت و همچنین محتویات زرده تخمک از جمله قطرات چربی نیز در نمونه کشت داده مشاهده گردید. سلول‌های حاصل از تکثیر سلول‌های فولیکولی عمدتاً سلول‌های شبه فیبروبلاستی بودند (شکل ۲). در نمونه‌های کشت داده سلول‌های حاصل از کشت اولیه سلول‌های فولیکولی (ساب کالچر اول) نیز سلول‌ها به خوبی به کف فلاسک کشت چسبیدند و تکثیر یافتند. تمامی این سلول‌ها شبه فیبروبلاست بودند. در این نمونه نیز تعدادی سلول‌های شناور مشاهده شد که در طول مدت کشت از محیط کشت خارج شدند. در این نمونه محتوی زرده مشاهد نگردید (شکل ۳).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]



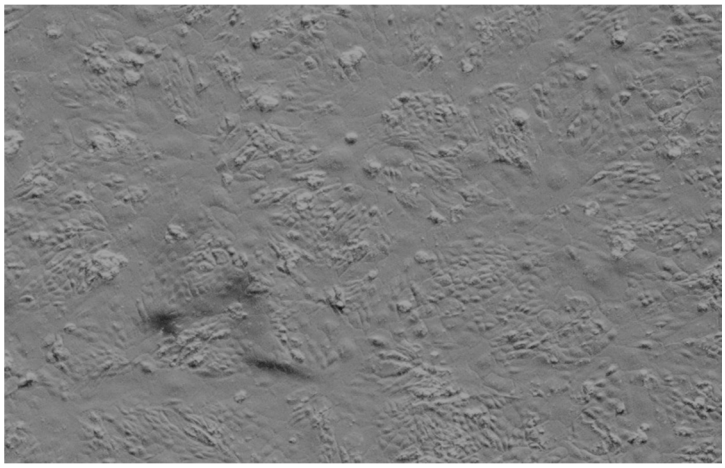
شکل ۲- سلول‌های حاصل از کشت اولیه سلول‌های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) (× ۳۰۰)



شکل ۳- سلول‌های حاصل از کشت مجدد (ساب کالچر) سلول‌های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) اول در روز سوم (× ۱۲۰)

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

با گذشت زمان از کشت مجدد اول ($subculture_1$) سلول‌های فولیکولی، تکثیر سلول‌ها افزایش یافت و پس از گذشت ۱۲ روز این سلول‌ها بیش از ۸۵ درصد سطح کف فلاسک کشت را اشغال کردند (شکل ۴).

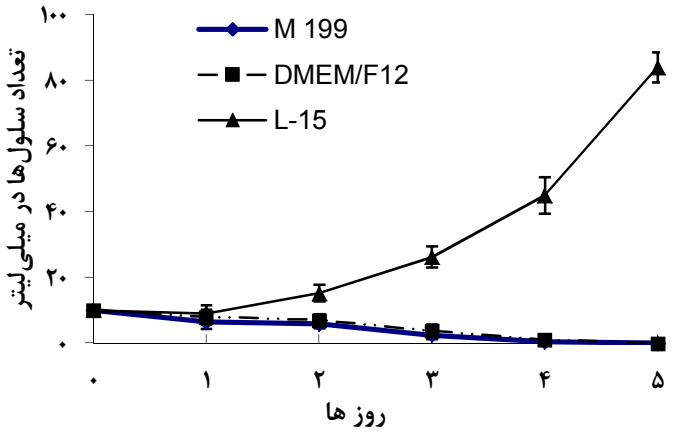


شکل ۴- سلول‌های تکثیر شده پس از کشت مجدد (ساب کالچر) سلولهای فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) اول در روز دوازدهم (۱۲۰ ×)

بررسی نمونه‌های کشت داده شده مجدد دوم ($subculture_2$) در روزهای دوم و سوم نشان داد علی‌رغم گذشت ۴۸ ساعت از زمان کشت سلول‌ها، اکثر سلول‌ها به کف ظرف کشت نچسبیدند و این وضعیت تا روز پنجم کماکان ادامه یافت. به‌نظر می‌رسید سلول‌های مذکور توانایی چسبیدن به کف فلاسک کشت را از دست داده‌اند. لذا تکثیر سلولی در نمونه کشت داده شده نیز مشاهده نگردید.

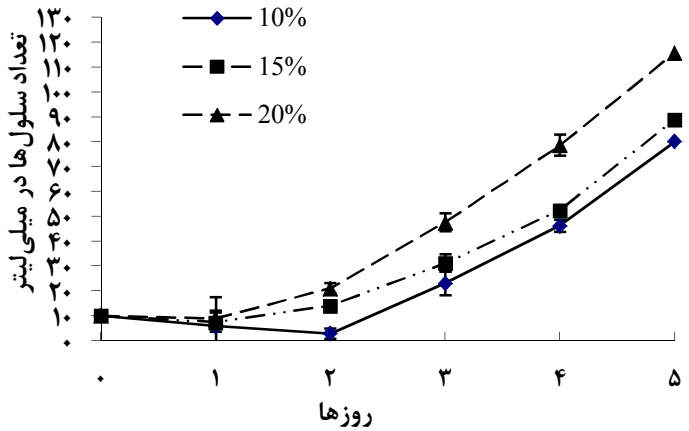
تأثیر محیط کشت پایه بر رشد و تکثیر سلول‌ها در شکل ۵ آورده شده است. سلول‌های فولیکولی در هر سه محیط کشت زنده ماندند ولی تکثیر در هر سه محیط کشت تداوم نیافت. تعداد سلول‌های موجود در محیط کشت L-15 بیش از سلول‌های موجود در محیط کشت‌های M199 و DMEM/F12 بود. یعنی رشد و تکثیر سلول‌ها در محیط کشت L-15 بیش از سایر محیط کشت‌ها بود. در محیط کشت‌های M199 و DMEM/F12 از روز دوم تغییر pH مشاهده شد و این محیط کشت‌ها قلیایی شدند و تعداد سلول‌های زنده کاهش یافت. اما در محیط کشت L-15، از روز دوم رشد و تکثیر سلول‌ها آغاز شد و در تمام طول مدت بررسی ادامه داشت و همواره افزایش یافت.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]



شکل ۵- تاثیر نوع محیط کشت بر تکثیر سلول‌های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*)

تاثیر FBS بر رشد و تکثیر سلول‌ها: سلول‌ها به هنگام استفاده از ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) در محیط کشت دارای تکثیر بودند و بیش‌ترین تکثیر سلولی زمانی مشاهده شد که ۲۰ درصد حجم محیط کشت، سرم مذکور بود (شکل ۶).

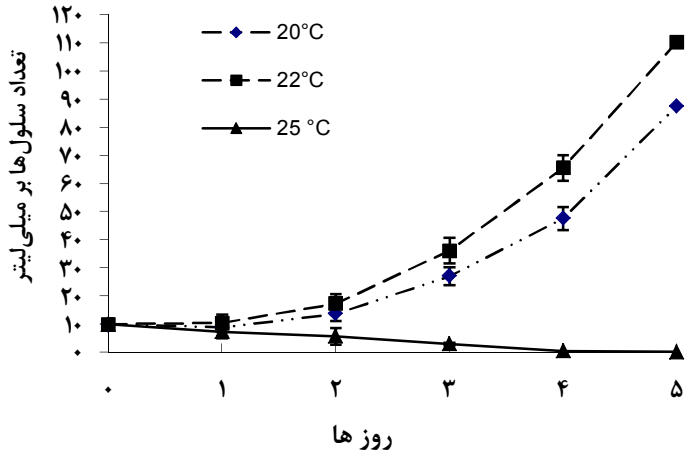


شکل ۶ – تاثیر درصد FBS بر تکثیر سلول‌های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*)

اثر دما بر رشد و تکثیر سلول‌ها: نتایج نشان داد تکثیر سلول‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ادامه نیافت و از روز دوم به بعد همواره کاهش تعداد سلول‌ها مشاهده گردید. اما رشد و تکثیر سلول‌ها در دماهای ۲۰ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت که نشان‌دهنده مناسب بودن این دماها برای تکثیر

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

سلول‌های کشت داده شده بود. همچنین میزان رشد و تکثیر سلول‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد بیش از دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۷).



شکل ۷- تاثیر دما بر تکثیر سلول‌های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*)

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی نتایج کسب شده دراین تحقیق نشان داد از بین سه محیط کشت پایه DMEM/F12، M199 و L-15 مورد استفاده، محیط کشت L-15 برای رشد و تکثیر سلول‌های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد از دو محیط کشت دیگر مناسب‌تر بود. انتخاب محیط کشت مناسب خیلی مهم است زیرا تأمین‌کننده فاکتورهای تکثیر، نمک‌های معدنی، اسیدهای آمینه، قندها، ویتامین‌ها، فشار اسمزی و pH مناسب برای رشد و تکثیر سلول‌ها است و نقش مهمی را در زنده ماندن و رشد و تکثیر سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های فولیکولی و تخمک ماهیان ایفا می‌نماید. همچنین القای رسیدگی تخمک تحت تأثیر گنادوتروپین‌ها در محیط کشت می‌تواند تحت تأثیر نوع محیط کشت قرار گیرد. لذا انتخاب محیط کشت مناسب برای بررسی وضعیت فیزیولوژیک (روند تکثیر و رسیدگی تخمک) و تأثیر هورمون‌های گنادوتروپین بر تخمک نیز بسیار مهم است (Webb *et al*., 2001). در حال حاضر محیط کشت‌های مختلفی با نام‌های تجاری مختلف وجود دارد. تفاوت این محیط کشت‌ها در نوع و مقدار مواد تشکیل‌دهنده آنها از جمله اسیدهای آمینه و نمک‌ها می‌باشد. تاکنون برای کشت سلول‌های مختلف ماهیان از محیط کشت‌های MEM (Singh *et al*., 1995; Kumar, 1998)، M199 (Galas *et al*., 1999; Crespo *et al*. 2012)، E-MEM (Fernandez *et al*., 1993)، DMEM/F12 (Wang *et al*., 2012)، DMEM (Fontana *et al*., 1997; Ciba *et al*., 2008; Grunow *et*

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

(Kumar *et al*., 2001; Lakra *et al.,* 2011; Ting-Jun *et al*., 2010) L-15 و (*al*., 2011 استفاده شده است. در مورد مناسب بودن محیط کشت‌های مذکور برای کشت سلول‌های ماهیان نظرات مختلفی وجود دارد. برخی از محققین کم بودن میزان تکثیر سلول‌های ماهی در محیط کشت DMEM را گزارش نمودند (Colyer and Boyle, 1985). فرناندز و همکاران (Fernandez *et al.,* 1993) نیز گزارش نمودند استفاده از محیط کشت M 199 برای رشد و تکثیر رده‌های سلولی آزاد ماهیان نتایج خوبی به‌دنبال نداشت. اما اغلب محققین محیط کشت L-15 را برای رشد و تکثیر سلول‌های مختلف ماهیان مناسب گزارش نمودند (Kumar *et al*., 2001; Rougée *et al*., 2007; Wang *et al*., 2012). محیط کشت L-15 بیش از سایر محیط کشت‌ها برای کشت سلول‌های ماهیان استفاده شده است (Lakra *et al*., 2011). محیط کشت L-15 برای حفظ pH محیط کشت در محدوده pH فیزیولوژیک (۷/۵-۷/۲) در شرایط عادی جو و بدون نیاز به استفاده از CO_2 طراحی شده است. این محیط کشت بجای بیکربنات سدیم دارای سدیم پیروات است و در نتیجه برای حفظ pH آن در محدوده مناسب، نیازی به استفاده از گاز CO_2 و در نتیجه دستگاه انکوباتور قابل نصب به کپسول گاز CO_2 نیست (Freshney, 2005). نتایج کسب شده در این تحقیق نیز صحت این موضوع را تأیید نمود.

دمای مناسب برای کشت سلول‌های فولیکولی تاسماهی استرلیاد دراین تحقیق ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. طبق نتایج کسب شده با کشت سلول‌های مذکور در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد طی زمان یکسان می‌توان به تعداد بیشتری سلول دست یافت. این دما اندکی از دمای مناسب برای تخم‌ریزی و انکوباسیون تخم‌های لقاح یافته یعنی ۱۶ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد (Holčík *et al*., 1989) بیشتر است. چنین وضعیتی قبلاً در مورد سایر ماهیان (Grunow *et al*., 2011; Wang *et al.*, 2012) نیز گزارش شده است. مطالعات انجام شده در مورد کشت سلول‌های ماهیان پرورشی نشان داد رشد و تکثیر مطلوب سلول‌های کشت داده شده در دمای اندکی بیش از دمای ایده‌آل برای ماهی دهنده بافت انجام می‌گیرد. یکی از دلایل آن می‌تواند مربوط به شرایط پرورش و سازش یافتن ماهی با دمای آب مورد استفاده برای پرورش باشد (Bols *et al*. 2005; Ott *et al*., 2004). دمای مناسب برای رشد و تکثیر اغلب رده‌های سلولی ماهیان سرد آبی ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای آنها نامناسب گزارش شده است (Wolf and Mann 1980; Fernandez *et al*., 1993). همچنین بیش‌ترین رشد و تکثیر رده‌های سلولی ماهیان گرمابی در محدوده دمایی ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد (Tong *et al*., 1997; Kang *et al*., 2003)، ۲۸ درجه سانتی‌گراد (Lai *et al*., 2000; Lai *et al*., 2003) و ۳۲ درجه سانتی‌گراد (Lai *et al.,* 2003) مشاهده گردید. دمای مناسب برای کشت سلول‌های مختلف تاسماهیان نیز ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد (Hedrick *et al*., 1991;

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

Fontana *et al.,* 1997; Nowruzfashkhami *et al.,* 2006) و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نامناسب (Grunow *et al*., 2011) گزارش شده است. دمای ۳۷- ۳۵ درجه سانتی‌گراد نیز برای بسیاری از ماهیان مهلک می‌باشد (Tong *et al*., 1997). علی‌رغم وجود اختلاف نظر جزئی در مورد دمای ایده‌آل برای رشد و تکثیر سلول‌های کشت داده شده ماهیان مختلف، باتوجه به هدفی که در کشت سلول‌های ماهیان دنبال می‌شود می‌توان از دماهای مختلف البته در محدوده دمایی مناسب استفاده نمود. چنانچه هدف نگهداری طولانی‌تر سلول‌ها در شرایط کشت باشد می‌توان از کمینه دمای مطلوب و به‌منظور دستیابی به تعداد زیاد سلول در مدت زمان کوتاه می‌توان از بیشینه دمای ایده‌آل استفاده نمود. اتفاق نظر محققین براین موضوع است که در صورت کشت سلول‌ها در دمای پایین‌تر از دمای ایده‌آل، تکثیر سلولی مشاهده نخواهد شد و یا میزان آن کم خواهد بود. همچنین دمای بالاتر از دمای ایده‌آل منجربه مرگ سلول‌ها خواهد شد (Ott *et al*., 2004; Bols *et al*., 2005).

در این تحقیق بیشترین تکثیر سلول‌های فولیکولی زمانی مشاهده گردید که ۲۰ درصد حجم محیط کشت سرم جنین گاو بود. سرم جنین گاو (FBS) یا گوساله جنینی (FCS) رایج‌ترین مکملی است که برای غنی‌تر نمودن محیط کشت پایه به آن اضافه می‌شود (Lakra *et al*., 2011). گرچه برخی معتقدند سرم پستانداران می‌تواند بر فیزیولوژی سلول‌های ماهی دارای اثر منفی باشد (Tocher and Dick, 1990) و باعث مسمومیت آنها گردد (Behrens *et al*., 2001). سرم دارای نقش حیاتی است زیرا دارای عوامل رشد و تکثیر سلول‌ها از جمله هورمون‌ها، چربی‌ها و مواد معدنی مورد نیاز سلول‌ها است. سرم نفوذپذیری غشای سلولی را نیز تنظیم می‌کند و ناقل چربی‌ها، آنزیم‌ها، عناصر بسیار ریز و عناصر کمیاب به داخل سلول می‌باشد. همچنین سرم نقش کلیدی را در بهتر چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف کشت و در نتیجه تکثیر آنها ایفا می‌کند (Zhou *et al.,* 2008). زیرا فیبرونکتین موجود در سرم موجب چسبیدن سلول‌های به کف ظرف کشت می‌گردد (Rathore *et al*., 2001). چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف کشت برای تکثیر یافتن سلول‌ها ضروری است. سرم دارای فعالیت آنتی‌تریپسین نیز است. غلظت‌های مختلف سرم جنین گاو برای کشت سلول‌های مختلف ماهیان استفاده می‌شود. لاکرا و همکاران (Lakra *et al.,* 2011) گزارش نمودند گرچه سلول‌های کشت داده شده ماهی باس آسیایی *Lates calcarifer* در محیط کشت‌های دارای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد FBS دارای تکثیر خوبی بودند اما زمانی‌که محیط کشت دارای ۲۵ درصد سرم جنین گاو و ۱ درصد سرم ماهی بود تکثیر به مقدار بیشینه خود رسید. بیجار و همکاران (Bejar *et al*., 1997) و برد فورد (Bradford, 1997) از ۵ درصد سرم جنین گاو، جوزف و همکاران (Joseph *et al.,* 1998) از ۱۵ درصد و لاکرا و بونده (Lakra and Bonde, 1996) از ۲۰ درصد FCS برای کشت سلول‌های ماهیان مورد مطالعه خود استفاده نمودند. برد فورد و همکاران (Bradford *et al*., 1994) اظهار داشتند

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

سلول‌ها به هنگام کشت اولیه نسبت به پاساژهای (کشت‌های مجدد) بعدی احتیاج بـه مقـدار بیشـتری سرم دارند. خمـیس و هاشـم (Khamiss and Hashem, 2012) از ۱۰ و ۲۰ درصـد FBS در محـیط کشت بترتیب برای کشت اولیه و کشت مجـدد سـلول‌هـای مـاهی تیلاپیـا *Oreochromis niloticus* استفاده نمودند. کومار و همکاران (Kumar *et al.,* 2001) برای کشت سلول‌های تخمدانی گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* از ۱۰ درصد FBS در محیط کشت استفاده کردند. پارت و همکـاران (Part *et al.,* 1993) برای کشت سلول‌های اپی تلیال آبشش قزل‌آلای رنگین‌کمـان از ۵ درصـد FBS استفاده کردنـد. فونتانـا و همکـاران (Fontana *et al.,* 1997) از ۱۵ درصـد FBS بـرای کشـت بالـه فیلمـاهی *Huso huso* ، تاسـماهی سـیبری *Acipenser baerii* و تاسـماهی سـفید *Acipenser transmontanus*، سیبا و همکاران (Ciba *et al.,* 2008) برای کشـت سـلول‌هـای کلیـه تاسـماهی سیبری، گرونو و همکاران (Grunow *et al.,* 2011) برای کشت سـلول‌هـای لارو تاسـماهی آتلانتیـک *Acipenser oxyrinchus* از ۲۰ درصد FCS استفاده کردنـد. روگـی و همکـاران (Rougée *et al.,* 2007) برای کشت سلول‌های ماهیچه‌ای و کیسه شنای ماهی طلایی *Carassius auratus*، همچنین دوایت و همکاران (Dewitte-ORR *et al.,* 2006) برای کشـت لکوسـیت‌هـای مـار مـاهی آمریکـایی *Anguilla rostrata*، ژو و همکاران (Zhou *et al.,* 2008) برای کشـت بالـه دمـی تاسـماهی چینـی *Acipenser sinensis* از ۲۰ درصد FBS استفاده کردند. غلظت سـرم جنـین گـاو در محـیط کشـت مورد استفاده معمولاً نباید بیش از ۲۰ درصد باشد زیرا شواهدی وجـود دارد کـه غلظـت زیـاد سـرم در محیط کشت ممکن است از تکثیر سـلول‌هـا جلـوگیری نمایـد (Freshney 2005; Chen and Qin, 2011).

منابع

Behrens A., Schirmer K., Bols N.C., Segner H. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. Environmental Toxicology and Chemistry, 20: 632-643.

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

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

Bols N.C., Dayeh V.R., Lee L.E.J., 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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

biology of fishes, Vol 6: Environmental toxicology. Elsevier, Amsterdam, pp: 43−84.

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

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

Bradford C.S., Sun L., Collodi P., Barnes D.W. 1994. Cell cultures from zebrafish embryos and adult tissues. Journal of Tissue Culture Methods, 16(2): 99−107.

Ciba P., Schicktanz S., Anders E., Siegl E., Stielow A., Klink E., Kruse C. 2008. Long-term culture of a cell population from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney. Fish Physiology and Biochemistry, 34(4): 367-372.

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

Colyer T.E., Boyle J.A. 1985. Optimization of conditions for production of channel catfish ovary cells and channel catfish virus DNA. Applied and Environmental Microbiology, 49: 1025-1028.

Crespo B., Zanuy S., Go´mez A. 2012. Development of an in vitro System for Functional Studies of Ovarian Follicular Cells in European Sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Cytotechnology, 65(2): 273-286.

Dewitte-Orr S.J., Lepic K., Bryson S.P., Walsh S.K., Lee L.E.J., Bols N.C. 2006. Develpoment of a continuous cell line, Pble, from an American Eel peripheral blood leukocyte preparation. In Vitro Cellular & Developmental Biology (Animal), 42(8/9): 263-272.

Doyle A., Griffiths J.B. 1998. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. John Wiley & Sons Ltd. 352P.

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: 477−488.

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

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

Freshney R.I. 2005. Culture of Animal Cells: A Manual of BasicTechnique. 5th Edition. New York, Wiley- Blackwell. 580P.

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

Galas J., Epler P., Stoklosowa S. 1999.Seasonal Response of Carp (*Cyprinus carpio*) Ovarian cells to Stimulation by Various Hormones as Measured by

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

Steroid Secretion. Tissue Culture Approach Endocrine Regulations, 33: 125-132.

Goswami M., Nagpure N.S., Jena, J.K. 2014. Fish Cell Line Repository: An Enduring Effort for Conservation. Current Science, 107: 738-739.

Goswami M., Sharma B.S., Tripathi A.K., Yadav K., Bahuguna, S.N., Nagpure N.S., Lakra W.S., Jena J.K. 2012. Development and characterization of cell culture systems from *Puntius* (Tor) *chelynoides* (McClelland). Gene, 500: 140-147.

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

Hedrick R.P., Mcdowell T.S., Rosemark R., Aronstein D., Lannan C.N. 1991. Two Cell Lines from White Sturgeon. Transactions of the American Fisheries Society, 120: 528-534.

Holčík J. 1989. The Freshwater Fishes of Europe, Vol 1, Part II. General introduction of fishes Acipenseriformes. AULA-Verlag, Wiesbaden. 447P.

Holopainen R., Tapiovaara H., Honkanen J. 2012. Expression analysis of immune response genes in fish epithelial cells following ranavirus infection. Fish and Shellfish Immunology, 32: 1095-1105.

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

Ju B., Pristyazhnyuk I., Ladygina T., Kinoshita M., Ozato K., Wakamatsu Y. 2003. Development and gene expression of nuclear transplants generated by transplantation of cultured cell nuclei into non-enucleated eggs in the medaka *Oryzias latipes*. Development, Growth & Differentiation, 45: 167–174.

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

Khamiss O., Hashem M.H. 2012. Developing a cell culture system from Nile Tilapia (*Oreochromis niliticus*, L.) ovarian tissue in Egypt. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 1(2): 8-12.

Kienzler A., Tronchère X., Devaux A., Bony S. 2012. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA, 26: 500-510.

Kojima H., Takeuchi S., Tsutsumi T., Yamaguchi K., Anezaki K., Kubo K., Iida M., Takahashi T., Kobayashi S., Jin K., Nagai T. 2011. Determination of dioxin concentrations in fish and seafood samples using a highly sensitive reporter cell line, DR-Eco Screen cells. Chemosphere, 83: 753-759.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

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

Kumar G.S., Singh I.S.B., Rosamma P., Raveendranath M., Shanmugam J. 1998. Efficacy of fish and prawn muscle extracts as supplements to development of a primary cell culture system from larval tissue of aquarium fish *Poecilia reticulata*. Indian Journal of Experimental Biology, 36: 91–94.

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

Lai, Y.S., Murali S., Ju H.Y., Wu M.F., Guo I.C., Chen S.C., Fang K., Chang C.Y. 2000. Two irridovirus 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: 379-388.

Lakra W.S., 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: 149-152.

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

Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. International Journal of Developmental Biology, 38: 217-229.

Nowruzfashkhami M.R., Safaiian S., Bahmani M., Chubian F. 2006. Karyotype analysis in ship sturgeon *Acipenser nudiventris* in the south Caspian Sea using leukocyte culture. Journal of Applied Ichthyology, 22: 97–98.

Nowruzfashkhami M.R., Sudagar M., Bahmani M., Salamat N., Mazandrani M., Yazdani Sadati M.A. 2016. Primary culture of ovarian follicular cells of Sterlet , *Acipenser ruthenus* to develop an in vitro system. Caspian Journal of Environmental Sciences, 14 (1): 55-68.

Ott T. 2004. Tissue culture of fish cell lines. National Wildlife Fish Health Survey (NWFHS) laboratory procedures manual, Vol 2. In: US Fish & Wildlife Service (Eds.). Handbook of aquatic animal health procedures and protocols, 2nd Edition, Washington DC, pp: 1−16.

Part P., Norrgren L., Bergstrom E., Sjoberg P. 1993. Primary cultures of epithelial from Rainbow trout gills. Journal of Experimental Biology, 175: 219–232.

Rathore G., Sood N., Swaminathan T.R. 2001. Primary cell culture from fish gills and kidney using fish serum. Indian Journal of Experimental Biology, 39: 936-938.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

Riede K. 2004. Global register of migratory species-from global to regional scales. Final Report of the R & D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 329P.

Rougée L., Ostrander G.K., Richmond R.H., Lu Y. 2007. Establishment, characterization, and viral susceptibility of two cell lines derived from goldfish *Carassius auratus* muscle and swim bladder. Diseases of Aquatic Organisms, 77: 127–135.

Salamat N., Erfani Majd N., Hashemitabar M., Mesbah M., Ahangarpoor A. 2010. Isolation of common carp ovarian follicular cells and evaluation of their endocrine activity in primary cell culture. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9(2): 305-314.

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: 163–183.

Singh I.S.B., Phillip R., Ravindranath M., Shanmugam J. 1995. Development of primary cell cultures from kidney of fresh water fish *Heteropneustus fossilis*. Indian Journal of . Experimental Biology, 33: 595–599.

Sobhana K.S., George K.C., Venkat Ravi G., Ittoop G., Paulraj R. 2009. Development of a Cell Culture System from Gill Explants of the Grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Shneider). Asian Fisheries Science, 22(2): 541-547.

Stoklosowa S., Epler P. 1985. The endocrine activity of isolated follicular cells of the carp vary in prime culture. General and Comparative Endocrinology, 58: 386-393.

Tafalla C., Estepa A., Coll J.M. 2006. Fish transposons and their potential use in quaculture. Journal of Biotechnology, 123: 397-412.

Thomas P. 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. General and Comparative Endocrinology, 175: 367-383.

Ting-Jun F., Bing-Xin R., Xiao-Fen G., Qiu-Tao Y., Li-Yan W. 2010. Establishment of a turbot fin cell line and its susceptibility to turbot reddish body iridovirus. Cytotechnology, 62(3): 217-223.

Tocher D.R., Dick J.R. 1990. Polyunsaturated fatty acids metabolism in cultured fish cells: incorporation and metabolism of (n-3) and (n-6) series by Atlantic salmon (*Salmo salar*) cells. Fish Physiology and Biochemistry, 8: 311-319.

Tong S., Li H., Miao H. 1997. The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line FG-9307 from the gill of flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 156: 327-333.

Unal G., Karakisi H., Elp M. 2005. Ovarian follicle ultrastructure and changes in levels of ovarian steroids during oogenesis in *Chalcalburnus tarichi* (Pallas). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29: 645-653.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

Wang X., Junxing Y., Xiaoyong C., Xiaofu P. 2012. Establishment and characterization of a fibroblast-like cell line from *Anabarilius grahami* (Cypriniformes: Cyprinidae). Zoological Research, 33: 1-9.

Webb M.A.H., Van Eenennaam J.P., Feist G.W., Linares-Casenave J., Fitzpatrick M.S., Schreck C.B., Doroshov S.I. 2001. Effects of thermal regime on ovarian maturation and plasma sex steroids in farmed white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Aquaculture, 201: 137–151.

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

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

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

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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-17]