مقاله علمی –پژوهشی:

بررسی روند تکوین PGC در جنین و لارو ماهی *Huso huso*

محمدرضا قلی سهرابی[۱]، طوبی میرزاپور[۱*]، شیرین جمشیدی[۲]، تورج سهرابی لنگرودی[۲]، هدیه فداکار[۱]

*Dr.tooba72@gmail.com

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان رشت، ایران.

۲- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۰

چکیده

در ماهیان خاویاری سلول های زایای اولیه از نیمکره گیاهی سلول تخم منشاء گرفته و به ستیغ های تناسلی در حال نمو مهاجرت کرده و در نهایت گامت‌ها را تولید می‌کنند. در مطالعه حاضر، سلول‌های زایای بدوی در لارو ماهی *Huso huso*، طی دو مرحله قبل و بعد از جذب کیسه زرده، به روش هضم آنزیمی جداسازی شده و در دو محیط کشت متفاوت DMEM و L15 به مدت سه هفته کشت داده شدند. تعداد و قطر کلونی‌ها در دو محیط کشت مختلف با یکدیگر مقایسه شد. بیان ژنهای *Nanos* و *Vasa* طی روزهای مختلف با روش qPCR سنجش شد. برای حفظ ژنوم و نگهداری طولانی مدت سلول‌های زایا، انجماد با استفاده از دو محافظ سرمایی DMSO و اتیلن گلیکول انجام گرفت. نتایج نشان داد، تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه بعد از جذب کیسه زرده در هر دو محیط کشت افزایش می‌یابد. در حضور DMSO زنده‌مانی سلول‌ها پس از ذوب نسبت به اتیلن گلیکول افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد. با در نظر گرفتن چرخه تولیدمثلی طولانی این ماهیان، با تکثیر و شناسایی موفق این سلول‌ها می‌توان در آینده از آنها برای پیوند به داخل گناد گونه‌های دارای دوره تولیدمثلی کوتاه استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی زایا، لارو فیل ماهی، کشت سلول، انجماد

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

مقدمه

در اتحادیه بین‌المللی حفاظت از محیط‌زیست، ۲۷ گونه از ماهیان خاویاری جزو فهرست گونه‌های در معرض خطر و حفاظت شده قرار گرفته‌اند. ٪۶۳ از گونه‌های مذکور در خطر انقراض جدی به علت صید بی‌رویه و تخریب محل سکونت طبیعی قرار دارند (Pšenička *et al*., 2015). احیاء جمعیت‌های این ماهیان به روش‌های معمول و طبیعی امکان‌پذیر نمی‌باشد، زیرا این ماهیان چرخه تولیدمثلی بسیار طولانی دارند و مدت زمان زیادی لازم است تا افراد جمعیت به بلوغ جنسی برسند. ۶ گونه از ۲۷ گونه مذکور اعم از فیل ماهی، استرلیاد، ازون‌برون، شیپ، تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی به صورت طبیعی در دریای خزر و رودخانه‌هایی که به آن می‌ریزند، زندگی می‌کنند. از این‌رو، دریای خزر و رودخانه‌های آن به عنوان بزرگ‌ترین زیستگاه طبیعی این ماهیان در سطح جهان شناخته می‌شود (Vecsei *et al*., 2003). فیل‌ماهی از جنس*Huso* و از خانواده *Acipenceridae* می‌باشد. گونه *Huso huso* بزرگ‌ترین ماهی آب شیرین دنیا بوده و نسبت به سایر گونه ماهیان خاویاری دیرتر به بالغ می‌شوند به‌طوری‌که ماده‌ها در سن ۱۸-۱۶ سالگی و نرها در ۱۴-۱۲ سالگی به بلوغ می‌رسند.

در داخل گناد این ماهیان سلول‌های بنیادی زایا (PGC)[1] اهمیت زیادی دارند، چون پیش‌سازهای جنینی گامت‌ها هستند و در نهایت به تولید گامت‌ها می‌انجامند. این سلول‌ها اطلاعات ژنتیکی و اپی‌ژنتیک را بین نسل‌ها منتقل کرده و موجب بقاء گونه‌ها می‌شوند. این سلول‌ها در زمان نمو از جایی که منشا گرفته‌اند، به غدد جنسی در حال نمو در مراحل بعد مهاجرت می‌کنند. روند تشکیل PGCها در ماهیان خاویاری مشابه دوزیستان بدون دم بوده و از طریق پلاسم زاینده می‌باشد، اما مسیر مهاجرت آنها با دوزیستان متفاوت است. PGCها در دوزیست زنوپوس، در قطب گیاهی تشکیل شده و از آندودرم به سمت ستیغ‌های تناسلی مهاجرت می‌کنند. این در حالی است که در ماهیان خاویاری PGCها با مکانیسم مشابهی تشکیل می‌شوند، ولی بعد از مرحله ۲۲ سلولی از طریق مزانشیم بر توده زرده و در امتداد خط‌الراس گناد مهاجرت می‌کنند (Saito *et al*., 2014).

برای جداسازی سلول‌های بنیادی زایا، روش هضم آنزیمی به طور گسترده‌ای در پستانداران و ماهیان استخوانی استفاده شده است (Kaul *et al*., 2012). این تکنیک شامل جداکردن مکانیکی غدد جنسی و به دنبال آن تجزیه سلول‌ها با آنزیم‌هاست. معمولاً آنزیم‌های کلاژناز، تریپسین-EDTA، دیسپاز و DNase استفاده می‌شوند. در ماهی‌ها تریپسین و کلاژناز متداول‌ترین آنزیم‌هایی هستند که در تجزیه غدد تناسلی به‌کار برده می‌شوند (Pšenička *et al*., 2015). Okutsu و همکاران (۲۰۰۷) در مورد محیط‌های کشت سلولی و نیز محلول سرم فیزیولوژی مورد نیاز ماهیان، توضیحات مختصری منتشر کردند. تنوع بافت‌های گوناگون برای تهیه کشت اولیه، زیاد بوده ولی بافت‌های جنینی و گنادها از بیشترین تعداد سلول‌های فعال با قابلیت تقسیم مناسب برخوردارند و دارای نتایج موفقیت‌آمیزی در کشت‌های تک لایه و رسیدن به سطح پوششی مناسب در کمترین زمان می‌باشند.

محیط کشت عامل مهمی در تکثیر سلول‌هاست. سه نوع فرمولاسیون محیط کشت شامل: Medium199، DMEM[2] و L15[3] برای تکثیر سلول‌های ماهی مورد قبول است. انتخاب ارجح اکثر محققان کشت سلول ماهی‌ها بوده است. بنابراین، تقریباً همه رده‌های سلولی موجود در ابتدا با استفاده از این محیط تکثیر می‌شدند (Fryer *et al*., 1965).

در سال‌های گذشته تحقیقات بر برخی گونه‌های ماهیان خاویاری از جمله ماهی خاویاری چینی صورت گرفته و ژن‌های مارکر سلول‌های زایا مانند *NANOS1* در سطح رونویسی و ترجمه مورد مطالعه قرار گرفته است (Ye *et al*., 2012). ژن ای *Nanos* و *Vasa* به عنوان مارکرهای رایج سلول‌های زایا در مطالعات مختلف معرفی شده‌اند (Köprunner *et al*., 2001; Ye *et al*., 2012, 2016; Xie *et al*., 2019). ژن *vasa* کد کننده یک RNA- هلیکار از پروتئین‌های خانواده جعبه DEAD است که به طور اختصاصی در دودمان سلول‌های زایا بیان می‌شود (Yoshizaki *et al*., 2000; Cao *et al*., 2012). اگرچه هنوز عملکرد محصول ژن *vasa* به طور کامل

[1] Primordial Germ Cells
[2] Dulbecco's modified Eagle's medium
[3] Leibovitz medium

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

شناخته نشده است، اما به‌نظر می‌رسد این ژن نقش مهمی در رشد و تکوین سلول‌های زایا ایفاء می‌کند.

امکان محافظت طولانی‌مدت از سلول‌های زایای ماهیان می‌تواند نقش مهمی در توسعه آبزی‌پروری داشته باشد (Rall, 1993). ازآنجایی‌که خطر انقراض بعضی از گونه‌های ماهیان مانند ماهیان خاویاری وجود دارد، به کمک انجماد می‌توان اقدام به ذخیره و حفظ ذخایر ژنتیکی این ماهیان کرد. Izadyar و همکاران (۲۰۰۲) روشی را برای انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا ارائه دادند که در آن از دی متیل سولفوکسید (DMSO)[1]برای انجماد استفاده کردند. این روش نتایج خوبی به‌دنبال داشت (Izadyar *et al*., 2002). در این مطالعه نشان داده شد که محیط حاوی ماده محافظ انجمادی DMSO نسبت به گلیسرول باعث بقاء بهتر سلول‌ها بعد از ذوب می‌شود. در این راستا، در پژوهش دیگری دی‌متیل‌سولفوکسید را برای انجماد سلول‌های اسپرماتوگونیا ماهی کپور توصیه کردند (Horváth *et al*., 2003).

همان‌طوری‌که ذکر گردید، دوره تولید مثلی فیل ماهی طولانی می‌باشد و در زمان طولانی‌تری رسیدگی جنسی در این ماهی‌ها اتفاق می‌افتد و این فرایند تولید خاویار را به عنوان یک ماده با ارزش اقتصادی، به تاخیر می‌اندازد. لذا، استخراج سلول‌های بنیادی زایا از این ماهیان، خالص‌سازی و تکثیر آنها در محیط کشت، زمینه را برای ترانسپلنت این سلول‌ها به داخل گناد ماهیان با دوره تولید مثلی کوتاه در آینده فراهم می‌کند. در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی زایا از لارو و جنین فیل ماهی (*Huso huso*) طی دو بازه زمانی قبل و بعد از جذب کیسه زرده، جداسازی و استخراج شد. سپس برای سه هفته در دو محیط کشت DMEM و L15 کشت داده شدند. بیان ژن‌های خاص سلول‌های زایا (*Vasa* و *Nanos*) در کلونی‌های حاصل از دو محیط مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت با مقایسه دو محافظ سرمایی (DMSO و اتیلن گلیکول)، بهترین شرایط جهت حفظ سلول‌های زایای این ماهی‌ها مشخص شد.

مواد و روش

گونه مورد آزمایش

در این پژوهش تعداد ۶۰ عدد لارو فیل ماهی استفاده شد که ۳۰ عدد از آنها در مرحله کمی قبل از جذب کیسه زرده و ۳۰ عدد دیگر نیز در مرحله بعد از جذب کیسه زرده قرار داشتند و از موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر تهیه شده بودند (شکل ۱).

نمونه‌برداری

بر طبق مطالعات Saito و همکاران (۲۰۱۴) و نشان‌دار کردن بلاستومرهای ایجاد کننده گنادها با FITC، محل احتمالی حضور سلول‌های بنیادی زایا، در ناحیه خلفی کیسه زرده به سمت شروع دم، در عقب لوله گوارش خلفی تعیین شده بود (شکل ۲). بنابراین، در این مطالعه، نمونه‌های لارو پس از بیهوشی با عصاره گل میخک، درون PBS حاوی پن استرپ ۱درصد (پنی سیلین + استرپتومایسین) شست و شو داده شدند و سپس به‌وسیله اسکالپل از ناحیه خلفی آبشش و دو سوم انتهایی دم، برش زده شدند. قسمت میانی بدن که شامل دستگاه گوارش نیز می‌شود، تخلیه شد و برای استخراج سلولی مورد استفاده قرار نگرفت. در لاروهای حاوی کیسه‌زرده، ناحیه زرده تخلیه شد تا در مراحل کشت موجب آلودگی محیط نشود و در کار کشت اختلال ایجاد نکند.

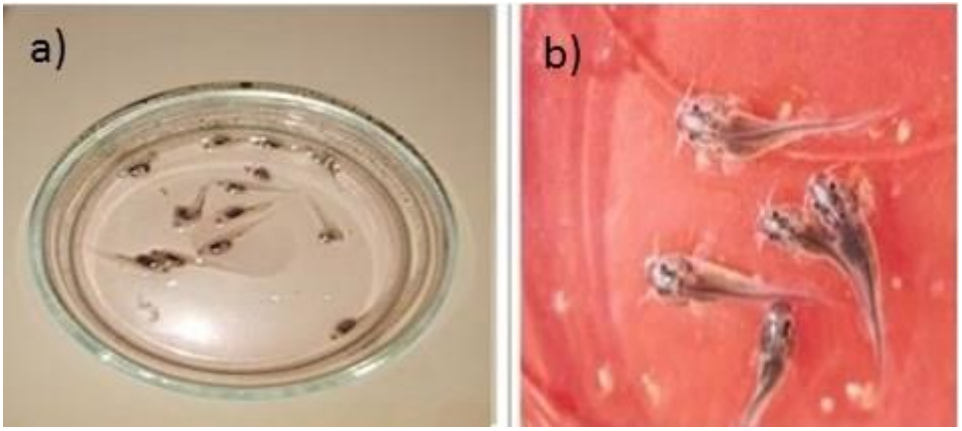
استخراج سلول از بافت و هضم آنزیمی

قطعه میانی جدا شده از لارو فیل ماهی به پلیت استریل حاوی PBS که قبلاً به آن آنتی بیوتیک‌های پن استرپ ۱ درصد و نیز قارچ‌کش آمفوتریپسین B (با غلظت ۱µg/ml) اضافه شده بود، منتقل شدند. بعد از شست و شو، بافت‌ها پس از تکه شدن با تیغ جراحی در معرض آنزیم تریپسین (با غلظت mg/ml ۰/۵) و کلاژناز نوع I (با غلظت ۱mg/ml) قرار گرفتند. طی مدت زمان هضم، پلیت حاوی نمونه‌ها هر ۵ دقیقه یک بار از انکوباتور خارج شده و در زیر هودلامینار در شرایط استریل پیپتاژ شدند. این کار به جدا شدن سلول‌ها از بافت کمک می‌کند. پس از کامل شدن هضم آنزیمی، با افزودن محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS، غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها انجام گرفت.

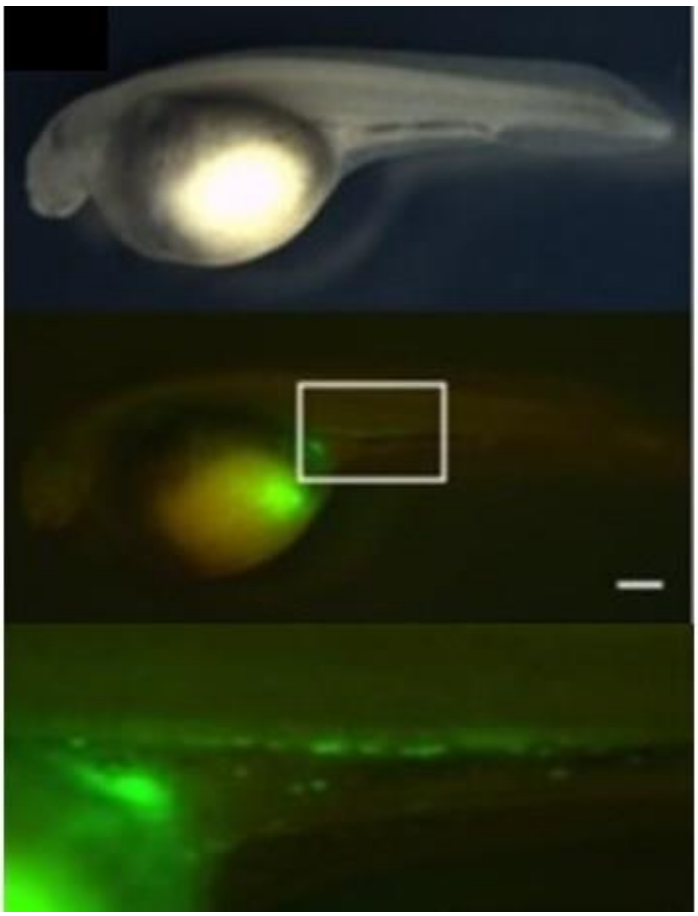
[1] Dimethyl sulfoxide

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده از داخل فیلتر با ضخامت ۴۰µm عبور داده شد تا جمعیت خالص‌تری از سلول‌ها حاصل شود. سلول‌های زنده پس از رنگ‌آمیزی با رنگ حیاتی تریپان بلو به‌وسیله لام هموسیتومتر شمارش شدند.



شکل ۱: نمونه لاروهای استفاده شده برای استخراج سلولهای زایا. a) قبل از جذب کیسه زرده. b) بعد از جذب کیسه زرده



شکل ۲: بلاستومرهای نشاندار شده با FITC در لارو در مرحله قبل از جذب کیسه زرده. ناحیه نشاندار در موقعیت هایی قرار دارد که انتظار می‌رود غدد تناسلی در آنها ایجاد شوند. شکل بالا نمای روشن و شکل پایین نمای با فلورسنت را نشان می‌دهد .(Saito *et al*., 2014)

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

کشت سلول‌های زایا و سلول‌های حمایت‌کننده

از آن‌جایی‌که تکثیر و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی زمینه را برای ترانس پلنت سلول‌ها در آینده فراهم می‌کند، در این پژوهش سعی شد تا محیط کشت بهینه برای رشد این سلول‌ها معرفی گردد. بنابراین، سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده از هر دو گروه لارو (قبل و بعد از جذب کیسه زرده) به دو محیط متفاوت DMEM و L15 منتقل شده و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. برای کشت سلول‌ها در محیط DMEM، برای ثابت ماندن pH محیط، از انکوباتور CO_2 دار با غلظت ۵ درصد CO_2 استفاده شد. هر سه روز یک‌بار، محیط کشت تعویض شد تا سلول‌های خونی که چسبندگی نداشتند، حذف گردند. سلول‌های بنیادی زایا و نیز سلول‌های حمایت‌کننده بعد از ۴۸ ساعت به کف پلیت چسبیدند و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی آغاز شد. قدرت کلونی‌زایی و تکثیر سلول‌ها در دو محیط با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کلونی‌های ظاهر شده در پلیت‌های کشت در هر دو محیط طی روزهای ۴، ۶، ۱۱، ۱۳ و ۲۰ کشت با روش کلنی کانتر دستی شمارش شد. قطر کلونی‌ها نیز با استفاده از برنامه image J مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده مورد آنالیز آماری قرار گرفت تا برای مقایسه تاثیر دو محیط کشت متفاوت بر تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی زایا طی روزهای مختلف کشت مورد استفاده قرار گیرد.

بررسی بیان ژن‌های نشانگر سلول‌های زایا با تکنیک Real time PCR

برای اثبات حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت بیان ژن‌های نشانگر سلول‌های زایا (*Nanos* و *Vasa*)، طی روزهای ۱۱، ۱۳، ۱۸ و ۳۳ کشت با تکنیک‌های RT-PCR[1] و Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. استخراج RNA از بافت گناد به عنوان نمونه کنترل و سلول‌های کشت شده با استفاده از پروتکل کیت شرکت کیاژن[2] انجام گرفت. سپس کمیت RNA استخراجی با دستگاه نانودراپ و کیفیت آن به‌وسیله ژل الکتروفورز سنجیده شد. به منظور تکثیر هر قطعه ژنی، یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر ژن انتخاب و طراحی شد. این آغازگرها برای ژن *Nanos*-1 شامل آغازگر راست (GGATCCTTGAATGCTGGAAACTCT) و آغازگر چپ (CTCCGAGTCTCTACCCCCAACT) و برای ژن *Vasa* شامل آغازگر راست (AGAGGGAAAGGGAGCAAGCACTTGGA) و چپ (AACTATTGGAATGCCATGCTTCTGAAC) می‌باشد. ابتدا RNA از سلول‌ها استخراج شد و به کمک آنزیم رونوشت‌بردار معکوس [3] از RNA مولکول cDNA ساخته شد. cDNA حاصل با روش Real-Time PCR تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. واکنش PCR برای هر کدام از ژن‌ها سه بار و طی ۳۰ سیکل انجام شد. سیکل‌های واکنش شامل: دمای باز شدن رشته‌های DNA ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه دمای مربوط به آنلینگ ۵۸-۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و دمای طویل شدن رشته‌ها ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه بود. در مطالعه حاضر، ژن بتا اکتین تحت عنوان ژن مرجع[4] در نظر گرفته شده است. برای هر بار ران دستگاه، تعداد مشخص میکروتیوب‌های مخصوص مهیا شده و در هر کدام آنها، بر اساس نوع پرایمر، حجم مشخصی از cDNA و پرایمر اضافه شد. SYBER Green Master mixبه میزان ثابت ۱۲/۵ میکرولیتر برای تمام نمونه‌ها اضافه شد و مابقی حجم تا ۲۵ میکرولیتر از طریق DEPC water تامین شد. سپس در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems. Foster City, CA) قرار داده شد. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: Ct) مورد ارزیابی قرار گرفت. ا استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های ΔΔCt و $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شد.

انجماد و ذوب سلولها

در این تحقیق برای نگهداری طولانی مدت سلول‌ها از روش انجماد استفاده شد. برای این کار، ابتدا سوسپانسیون سلولی مورد شمارش قرار گرفت و سلول‌ها با غلظت دلخواه [5] ۱۰ × ۴

[1] Reverse transcriptase polymerase chain reaction
[2] QIA Gen
[3] Reverse transcriptase
[4] House keeping

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

سلول در محیط به حجم نیم سی‌سی به کرایوویال‌های انجمادی که روی یخ قرار داشتند، منتقل شدند. سپس دو نوع محلول انجمادی مورد استفاده در این پژوهش به حجم نیم سی سی قطره قطره به کرایو ویال‌ها اضافه شد تا میزان زنده‌مانی سلول‌ها در این دو محیط پس از فرایند ذوب مورد مقایسه قرار گیرد. دو نوع محلول انجمادی عبارت بودند از گروه اول شامل: ۱۰٪ اتیلن گلیکول و ۹۰٪ FBS و گروه دوم شامل ۱۰٪ دی متیل سولفوکسید (DMSO) و ۹۰٪ FBS. کرایوویال‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند و سپس به فریزر با دمای ۷۵- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از گذشت یک شبانه‌روز، کریوویال‌ها به نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منتقل و برای حدود یک ماه نگهداری شدند.

برای فرایند ذوب، کرایو ویال‌ها از نیتروژن مایع خارج شده و به حمام آب ۳۷ درجه منتقل شدند. پس از یک دقیقه، محتویات کرایوویال‌ها در زیر هود، به لوله فالکون منتقل شد و هم‌حجم آن، محیط کشت تازه اضافه گردید. سپس سلول‌ها در دور ۱۵۰۰ برای ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و به سلول‌های به‌جا مانده یک سی سی محیط کشت تازه اضافه گردید. سلول‌ها به پلیت‌های مخصوص کشت منتقل شدند و زنده‌مانی سلول‌ها بعد از انجماد، از طریق شمارش سلولی با لام هموسیتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

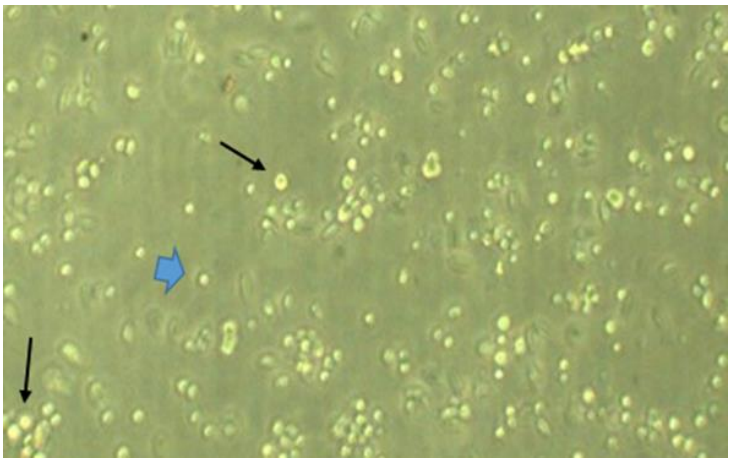
روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت محاسبات آماری از برنامه spss نسخه ۱۸، برای آزمودن نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنف و برای مقایسه بین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه استفاده شد (one way ANOVA). برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون توکی در سطح ۹۵ درصد اطمینان و برای رسم نمودار از برنامه Graph Pad Prism 6 استفاده گردید. معنی‌داری در سطح $P\leq0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج هضم آنزیمی

پس از هضم آنزیمی، سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده از هر دو نوع لارو، حاوی دو نوع سلول مختلف بود. سلول‌های درشت‌تر سلول‌های بنیادی زایا بودند که قطری حدود ۲±۱۱/۴ میکرون داشتند و پس از گذشت دو روز از کشت به شکل کلونی‌هایی در محیط کشت ظاهر شدند. سلول‌های کوچکتر قطری حدود ۲/۵±۷/۱ داشتند و به عنوان سلول‌های حمایت‌کننده اطراف کلونی‌های سلول‌های بنیادی ظاهر شدند. احتمالاً در جنس نر این سلول‌ها، سلول‌های حمایت کننده سرتولی هستند و در جنس ماده این سلول‌ها، سلول‌های حمایت کننده فولیکولی می‌باشند (شکل ۳).



شکل ۳: سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده از هضم آنزیمی. سلول‌هایی که با پیکان سیاه نشان داده شده‌اند، سلول‌های بنیادی زایا و سلول‌های با پیکان آبی سلول‌های حمایت کننده می‌باشند. بزرگنمایی ۴×

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

نتایج کشت سلول

کشت سلول‌های زایای استخراجی از لاروها در مرحله قبل از جذب کیسه زرده طی روزهای مختلف کشت نشان داد که با افزایش روزهای کشت، سلول‌ها یکدیگر را پیدا کردند و به شکل تجمعاتی دور یکدیگر جمع شدند و هسته ایجاد کلونی‌ها که از خصوصیات سلول‌های بنیادی می‌باشد، فراهم کردند. با گذشت زمان تعداد و قطر کلونی‌ها افزایش یافت. بیشترین تعداد کلنی‌ها در محیط DMEM پس از گذشت ۱۳ روز از کشت مشاهده شد. پس از این زمان تعداد کلونی‌ها کاهش یافت، اما قطر کلونی‌ها همچنان در حال افزایش بود. کاهش تعداد کلونی در محیط DMEM می‌تواند احتمالاً به این دلیل باشد که کلونی‌های کوچک، سلول‌های حمایت کننده کمتری دارند. به دلیل مصرف مواد غذایی محیط کشت، تجمع مواد سمی، نرسیدن مواد لازم به کلونی‌های کوچک و خارج شدن آنها از فاز لگاریتمی رشد، آنها شروع به تحلیل رفتن می‌کنند. اما در مورد کلونی‌های بزرگ چون تعداد سلول‌ها بیشتر است، به دلیل اینتراکشن‌های بین سلول‌های زایا و سلول‌های حمایت‌کننده که نقش تغذیه‌ای نیز دارند، همچنان رشد ادامه می‌یابد و افزایش قطر مشاهده می‌شود.

در محیط L15 بیشترین تعداد کلنی‌ها پس از گذشت ۲۰-۱۳ روز از کشت مشاهده می‌شود. با افزایش روزهای کشت، تعداد و قطر کلونی‌ها در حال افزایش است. احتمالاً محیط کشت L15 چون به تغییرات pH حساس نیست، شرایط بهتری برای رشد سلول‌های لارو فراهم می‌کند به‌طوری‌که در روز ۲۰ کشت، تعداد و قطر کلونی‌ها افزایش یافته است. کشت سلول‌های زایای استخراجی از گروه لاروهای قبل از جذب کیسه زرده، در دو محیط کشت متفاوت و مقایسه تعداد آنها نشان داد که در محیط DMEM، با گذشت روزهای کشت، کلونی‌های کوچکتر به تعداد زیاد مشاهده می‌شود (جداول ۱ و۲). البته تفاوت قطر کلونی‌ها در دو محیط مختلف DMEM و L15 در تمام روزهای کشت معنی‌دار نمی‌باشد ($P>0/05$). در مقابل از لحاظ تعداد کلونی‌ها اختلاف معنی‌داری در تمام روزهای کشت بین دو محیط DMEM و L15 مشاهده می‌شود ($P<0/05$).

جدول ۱: مقایسه تعداد کلونی‌های مشاهده شده در روزهای مختلف کشت در دو محیط DMEM و L15 در گروه لاروهای قبل از جذب کیسه زرده

نوع محیط/روز کشت	روز ۴ کشت	روز ۶ کشت	روز ۱۱ کشت	روز ۱۳ کشت	روز ۲۰ کشت
DMEM	۲۶	۵۵	۷۱	۸۰	۷۶
L15	۱۰	۱۹	۲۲	۲۵	۳۱

جدول ۲: مقایسه قطر کلونی‌های مشاهده شده (میکرومتر) در روزهای مختلف کشت در دو محیط DMEM وL15 در گروه لاروهای قبل از جذب کیسه زرده

نوع محیط/روز کشت	روز ۴ کشت	روز ۶ کشت	روز ۱۱ کشت	روز ۱۳ کشت	روز ۲۰کشت
DMEM	۱۲/۲۷	۱۶/۵۰	۲۰/۶۸	۲۳/۸۶	۲۶/۷۱
L15	۸/۱۲	۱۲/۲۰	۱۶/۹۰	۲۰/۹۳	۲۹/۹۳

کشت سلول‌های زایای استخراجی از لاروها در مرحله بعد از جذب کیسه زرده طی روزهای مختلف کشت نشان داد که در محیط DMEM با افزایش روزهای کشت، تعداد و قطر کلونی‌ها افزایش یافت. بیشترین تعداد کلونی‌ها پس از گذشت ۱۱ روز از کشت مشاهده شد. پس از این زمان، تعداد کلونی‌ها کاهش یافت، اما قطر کلنی‌ها همچنان در حال افزایش بود. در محیط L15 با افزایش روزهای کشت، تعداد و قطر کلونی‌ها افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین تعداد و قطر کلونی‌ها پس از گذشت ۲۰ روز از کشت مشاهده شد. احتمالاً محیط کشت L15 چون به تغییرات pH حساس نیست، شرایط بهتری برای رشد سلول‌های لارو فراهم می‌کند به‌طوری‌که در روز ۲۰ کشت، تعداد و قطر کلونی‌ها افزایش یافته است (جداول ۳ و ۴). از لحاظ تعداد کلونی‌ها، اختلاف معنی‌داری در تمام روزهای کشت بین دو محیط DMEM و L15 مشاهده می‌شود. اما تفاوت قطر کلونی‌ها در دو محیط مختلف DMEM و L15 در تمام روزهای کشت معنی‌دار نمی‌باشد.($P>0/05$)

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]

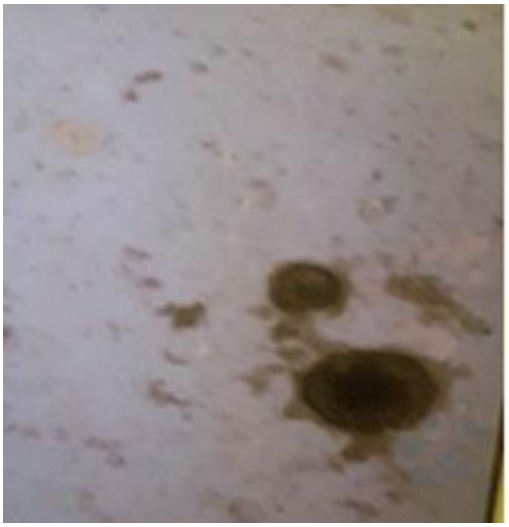
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

جدول ۳: مقایسه تعداد کلونی‌های مشاهده شده در روزهای مختلف کشت در دو محیط DMEM و L15 در گروه لاروهای بعد از جذب کیسه زرده

نوع محیط / روز کشت	روز ۴ کشت	روز ۶ کشت	روز ۱۱ کشت	روز ۱۳ کشت	روز ۲۰ کشت
DMEM	۳۲	۶۵	۹۱	۸۳	۵۵
L15	۳۱	۴۵	۵۲	۵۸	۶۹

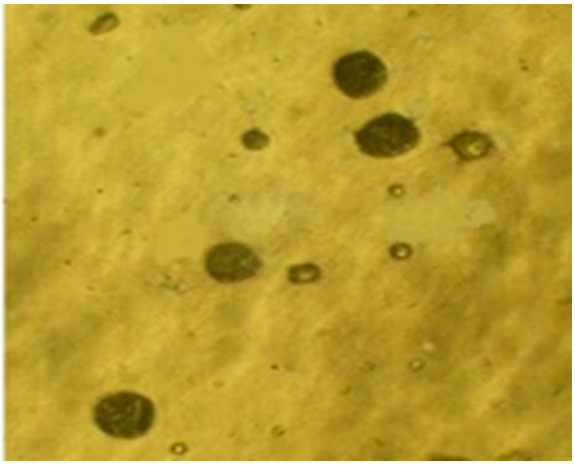
جدول ۴: مقایسه قطر کلونی‌های مشاهده شده در روزهای مختلف کشت در دو محیط DMEM و L15 در گروه لاروهای بعد از جذب کیسه زرده

نوع محیط/روز کشت	روز ۴ کشت	روز ۶ کشت	روز ۱۱ کشت	روز ۱۳ کشت	روز ۲۰ کشت
DMEM	۱۴/۸۰	۱۷/۵۳	۲۱/۶۸	۲۳/۷۱	۲۷/۴۵
L15	۱۴/۳۵	۱۶/۳۵	۲۶/۸۹	۲۷/۱۳	۳۸/۴۰



شکل ۴: نمونه‌ای از کلونی‌های سلول‌های زایای بدوی پس از گذشت ۶ روز از کشت در محیط L15 (بزرگنمایی ۱۰x)

مقایسه تعداد و قطر کلونی‌ها در دو مرحله قبل و بعد از جذب کیسه زرده نشان داد که پس از جذب کیسه زرده، به دلیل فقدان ترکیبات زرده‌ای که در کار کشت سلول‌ها تداخل ایجاد کرده و جمعیت سلولی را کاهش داده است، کلونی‌های بزرگتر و به تعداد زیادتر در محیط کشت مشاهده می‌شود. از نظر تعداد کلونی‌ها، بین دو گروه از لاروها در هر دو محیط کشت DMEM و L15 در بیشتر روزهای کشت اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود. به عبارت دیگر، بعد از جذب کیسه زرده، تعداد سلول‌های کشت و به دنبال آن کلونی‌های تشکیل شده افزایش معنی‌دار می‌یابند ($P<0/05$).



شکل ۵: نمونه ای از کلونی‌های سلول‌های بنیادی زایا پس از گذشت ۶ روز از کشت در محیط DMEM (بزرگنمایی ۱۰x)

نتایج انجماد سلولی

سلول‌هایی که دو هفته پس از کشت با محلول انجمادی DMSO فریز شده بودند، پس از ذوب ۸۱ درصد از آنها زنده ماندند (جدول ۵) درحالی‌که سلول‌های فریز شده با اتیلن گلیکول پس از ذوب، تنها ۶۵/۸ درصد سلول‌ها حیات خود را حفظ کردند (جدول ۶) که عدد به‌دست آمده، اختلاف معنی‌داری با گروه فریز شده با محلول انجمادی DMSO داشت ($P<0/05$).

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

جدول ۵: درصد زنده مانی سلول‌ها پس از انجماد با ماده انجمادی و سپس ذوب سلول DMSO

	پس از اضافه کردن ماده فریز (تست سمیت)	فریز- ذوب شده بعد از گذشت دو هفته از کشت
درصد سلول‌های زنده	٪۸۸	٪۸۱

جدول ۶: درصد زنده مانی سلول‌ها پس از انجماد با ماده انجمادی اتیلن گلیکول و سپس ذوب سلول‌ها

	پس از اضافه کردن ماده فریز (تست سمیت)	فریز- ذوب شده بعد از گذشت دو هفته از کشت
درصد سلول‌های زنده	٪۸۸	٪۶۵/۸

نتایج تغییرات کمی بیان ژن *Vasa* و *Nanos* در محیط DMEM و L15

تغییرات کمی بیان ژن *Nanos* در مقایسه با ژن کنترل داخلی بتا اکتین در لاروهای بعد از جذب کیسه زرده در دو محیط کشت طی روزهای مختلف نشان داد که در ابتدای کشت (گذشت ۶ روز از کشت)، بیان ژن *Nanos* بالاست. در اواسط کشت، میزان بیان در محیط DMEM پایین آمده ولی با گذشت روزها و سازش یافتن سلول‌ها با شرایط کشت، بیان ژن *Nanos* نیز بالاتر رفته است به‌طوری‌که بالاترین بیان پس از گذشت ۳۱ روز از کشت در محیط DMEM مشاهده شد. در محیط L15 نیز پس از گذشت ۲۷ روز از کشت، میزان بیان این ژن در تکرارهای مختلف افزایش داشت. از نظر آماری، اختلاف معنی‌داری در بیان این ژن در روزهای انتهایی کشت بین دو محیط مشاهده نشد ($P > 0/05$).

تغییرات کمی بیان ژن *vasa* در مقایسه با ژن کنترل داخلی بتا اکتین در لاروهای بعد از جذب کیسه زرده در دو محیط کشت طی روزهای مختلف نشان داد که در ابتدای کشت (گذشت ۶ روز از کشت)، بیان ژن *Vasa* پایین است. با افزایش روزهای کشت میزان بیان نیز بالا رفته است به‌طوری‌که بالاترین بیان پس از گذشت ۳۱ روز از کشت مشاهده شد. از نظر بیان ژن *Vasa* بین دو محیط DMEM و L15 در روزهای آخر، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$).

بحث

ماهیان خاویاری یکی از قدیمی‌ترین خانواده‌های ماهی‌ها هستند که در دنیا ارزش زیادی دارند. این ماهی‌ها نمایانگر گروهی از گونه‌های در خطر انقراض نیز به‌حساب می‌آیند. چرخه تولیدمثلی ماهیان خاویاری طولانی است و انجماد تخمک یا جنین به دلیل محتوای زیاد زرده و نفوذپذیری کم غشاء ماهی معمولاً موفقیت‌آمیز نبوده است. ازآن‌جایی‌که چندین گونه از ماهیان خاویاری در معرض انقراض هستند، یک استراتژی حفاظت کارآمد مورد نیاز می‌باشد. بر طبق مطالعات جدید، سلول‌های بنیادی زایا می‌توانند برای ذخیره و بازسازی طولانی‌مدت اطلاعات ژنتیکی با استفاده از تولیدمثل جایگزین استفاده شوند (Zhang *et al*., 2007). در این تحقیق، ناحیه گناد لاروهای گونه *Huso huso* (در دو گروه قبل و بعد از جذب کیسه زرده)، با استفاده از آنزیم‌های هضم سلولی کلاژناز و تریپسین مورد هضم واقع شده و در دو محیط کشت DMEM و L15 برای مقایسه تعداد و قطر کلنی‌ها مورد کشت قرار داده شدند.

برای جداسازی سلول‌های بنیادی زایا هضم آنزیمی به طور گسترده‌ای در ماهیان استخوانی استفاده شده است (Kaul *et al*., 2012). این تکنیک شامل جداکردن مکانیکی غدد جنسی و به دنبال آن تجزیه سلول‌ها با آنزیم‌هاست. معمولاً آنزیم‌های کلاژناز، تریپسین-EDTA، دیسپاز و DNase استفاده می‌شوند. در ماهی‌ها، تریپسین و کلاژناز متداول‌ترین آنزیم‌هایی هستند که در تجزیه غدد تناسلی به‌کار برده شده‌اند (Pšenička *et al*., 2016). Okutsu و همکاران (۲۰۰۷) استفاده از ۰/۵ درصد تریپسین برای هضم بیضه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان را گزارش کردند. در این گزارش، اسپرماتوگونی‌های به‌دست آمده هنگام پیوند به لاروهای ماهی قزل‌آلا، لاروهای زنده‌ای تولید کردند (Okutsu *et al*., 2007). Pšenička و همکاران (۲۰۱۵) از ۰/۳٪ تریپسین در PBS در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد برای تجزیه سلول‌های بیضه و تخمدان ماهی خاویاری سیبری استفاده کردند (Pšenička *et al*., 2015). در مقابل Shikina و همکاران (۲۰۱۳) اختلال در برخی

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

پروتئین‌های غشایی به‌وسیله تریپسین را گزارش کردند که باعث کاهش برگشت‌پذیر تقسیم میتوز و کاهش چسبندگی سلول‌ها می شود. در مطالعه آنها سلول‌های گنادی هضم شده با تریپسین سرعت رشد بالاتری نسبت به کلاژناز و تریپسین-EDTA نشان دادند، اما عملکرد سلول‌های تفکیک شده با سایر آنزیم‌ها با توجه به گونه و مرحله تناسلی تغییرات جزئی را نشان داد. در پژوهشی دیگر، برای بهبود قابلیت پیوند سلول‌های اسپرماتوگونیای نوع A در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Rainbow trout)*، سلول‌های اسپرماتوگونیای جدا شده از بیضه، خالص‌سازی شده و در محیط کشتL_{15} به همراه آمینواسیدها و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. نتایج حاکی از بهبود قابلیت پیوند سلول‌های اسپرماتوگونیا و بازسازی تخریب‌های به‌وجود آمده طی فرایند جداسازی و خلوص بود. این بدین‌معناست که کشت کوتاه‌مدت سلول‌ها، می‌تواند تخریب‌های ایجاد شده طی فرایند هضم آنزیمی را ترمیم کند (Shikina *et al*., 2013). در مطالعه حاضر، از تریپسین ۰/۵٪ و کلاژناز ۱mg/ml در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای جداسازی سلول‌های زایای لارو فیل ماهی استفاده شد تا با حداقل زمان ممکن، کمترین آسیب به سلول‌ها در حین جداسازی وارد شود. البته برای تأیید تاثیر تریپسین در جداسازی سلول‌های زایا به‌طوری‌که بر توانایی مهاجرت آنها پس از کشت کوتاه مدت تاثیری نداشته باشد، مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

استفاده از محیط کشت مناسب یکی از عوامل دخیل در رشد موفق سلول‌هاست. اما مهم‌ترین عامل، خود سلول است. سلول‌ها عملکرد، مورفولوژی و میزان تکثیر خود را در حین کشت تغییر می‌دهند (Fryer *et al*., 1965; Fernandez *et al*., 1993). در راستای پژوهش‌های صورت گرفته در محیط DMEM، در تحقیقی سلول‌های زایای موش بعد از جداسازی و خلوص در محیط کشتی بر پایه Dulbecco's (DMEM) کشت داده شدند. به محیط کشت پایه مقادیر اضافی گلوکز، Pyruvate، L-glutamine و ... اضافه شد. در نهایت، مشخص شد DMEM می‌تواند میزان تقسیمات را در PGCها افزایش دهد (Makoolati *et al*., 2016).

در مطالعات دیگر، از DMEM برای کشت سلول‌های ماهیان خاویاری استفاده شد. برای مثال، در مطالعه‌ای برای کشت سلول‌های ماهی خاویاری آتلانتیک (*Atlantic sturgeon*) از DMEM به همراه ٪10 Fetal calf serum (FCS) و نیز DMEM به همراه ٪20 FCS درغلظت‌های مختلف CO_2 استفاده شد. نتایج نشان داد تغییر محیط کشت از ٪20 DMEM-FCS به DMEM-FCS%10 تاثیری در روند رشد و تقسیم یا تمایز این سلول‌ها ندارد (Grunow *et al*., 2011). اما در خصوص محیط L15 که در مطالعه حاضر نیز نتایج بهتری در قطر کلونی‌ها در مقایسه با محیط DMEM به‌دست آمد، در سال‌های اخیر برای کشت سلول ماهی بیشتر از محیط L-15 استفاده شده است، چون این محیط کشت فاقد بی‌کربنات سدیم و دارای پیروات می‌باشد و هنگام استفاده از این محیط کشت، نیاز به افزودن گاز CO_2 به محیط کشت و در نتیجه انکوباتور CO_2 دار نمی‌باشد. سلول‌های ماهی در محیط کشت L-15 به‌خوبی رشد می‌کنند (Leibovitz, 1963). Riesco و همکاران (۲۰۱۴) برای تولید سلول‌های زایای بدوی، از سلول‌های بنیادی جنینی زبرافیش در شرایط *In vitro*، از محیط کشت تنظیم شده بر پایه L-15 استفاده کردند. بدین‌صورت که ٪۸۰ محیط کشت شامل L-15 بود که به آن آلبومین سرم گاوی[1] و آنتی‌بیوتیک و آمینواسید اضافه شده بود. در نهایت با استفاده از فاکتورهای رشدی همچون *EGF*، *BMP4* و *RA*، سلول‌های زایای بدوی زبرافیش در محیط کشت، از سلول‌های بنیادی جنینی تمایز یافتند که این نشان از اثر مثبت محیط L15 است (Riesco *et al*., 2014).

کشت سلول‌های بنیادی زایا بعد از جذب کیسه زرده در دو محیط مختلف و مقایسه آنها نشان داد که در محیط DMEM با گذشت روزهای کشت، کلونی‌ها کوچکتر شدند، اما در محیط L-15، قطر کلونی‌ها با افزایش روزهای کشت سیر صعودی داشت. به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت افزایش تعداد و قطر کلنی‌ها در گروه بعد از جذب کیسه زرده در هر دو محیط L-15 و DMEM، نشان می‌دهد که کشت لاروهای بعد از جذب کیسه زرده، سلول‌های زایای بیشتری به شکل کلونی تولید می‌کند. یک راه برای افزایش خلوص سلول‌های زایا، استخراج و کشت آنها در مراحل لاروی می‌باشد. زیرا تنوع سلولی زیادی

[1] Bovine serum albumin

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

در گنادها وجود ندارد. تعویض‌های متوالی محیط کشت به فاصله هر سه روز یک‌بار، سلول‌های غیر بنیادی که خاصیت چسبندگی ندارند، خارج می‌کند. در نهایت سلول‌های باقی‌مانده خالص‌تر می‌شوند و در اثر اینتراکشن‌های سلولی و رد و بدل کردن پیام‌های سلولی و نیز به‌واسطه خاصیت چسبندگی، قادر به ایجاد کلونی‌ها در اندازه‌های مختلف می‌باشند.

در راستای نتایج پژوهش حاضر، Grunow و همکاران (۲۰۱۱) مطالعه‌ای در ارتباط با قطر و اندازه سلول‌ها پس از کشت انجام دادند. آنها سلول‌های زایای ماهی خاویاری آتلانتیک را به روش هضم آنزیمی جدا کردند و در محیط کشت DMEM کشت دادند. پس از تجزیه و تحلیل دریافتند که اندازه کلونی‌ها در طول زمان تغییر کرده است. در واقع، سلول‌ها در پاساژهای اولیه نسبت به سلول‌های واقع در پاساژهای بالاتر، اندازه‌های کوچکتری داشتند (Grunow *et al*., 2011).

امکان محافظت طولانی‌مدت از سلول‌های جنسی ماهیان می‌تواند نقش مهمی در توسعه آبزی‌پروری داشته باشد (Rall, 1993). یک راه‌حل، کشت کوتاه‌مدت و طولانی‌مدت این سلول‌هاست که در مطالعات متعددی گزارش شده است (Aponte *et al*., 2005). راه‌حل دیگر، انجماد است. به کمک انجماد می‌توان اقدام به ذخیره و حفظ ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری کرد. Izadyar و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که محیط حاوی ماده محافظ انجمادی DMSO نسبت به گلیسرول سبب بقاء بهتر سلول‌ها بعد از ذوب می‌شود. در همین راستا، در پژوهش دیگری دی‌متیل‌سولفوکسید را برای انجماد سلول‌های اسپرماتوگونیا ماهی کپور توصیه کردند (Horváth *et al*., 2003) . به دنبال تحقیقات بر ماهی کپور، آزمایش دیگری با استفاده از ماده انجمادی دی‌متیل سولفوکسید و اتیلن گلیکول (EG) بر این ماهی انجام شد. گزارش‌ها حاکی از این بود که در غلظت ۱/۴ M DMSO در مقایسه با EG، میزان زنده‌مانی سلول‌های زایا به بیش از ۸۰ درصد رسیده است (Patra *et al*., 2016). در پژوهشی دیگر، نشان داده شد که جنین تاس‌ماهی ایرانی نمی‌تواند غلظت‌های مختلف اتیلن گلیکول را تحمل کند (Keivanloo and Sudagar, 2013) . در سایر گزارش‌ها، اتیلن گلیکول با غلظت ۱/۵ M به عنوان موثرترین ماده انجمادی برای حفظ سلول‌های زایای ماهیان خاویاری سیبری معرفی شده است. در راستای همین تحقیقات، Kobayashi و همکاران (۲۰۰۳) ماده انجمادی اتیلن گلیکول با غلظت ۱/۸ M را معرفی کردند که منجر به بالاترین میزان زنده‌مانی سلول‌های زایای اولیه پس از ذوب شدن در قزل‌الای رنگین‌کمان شد (Kobayashi *et al*., 2003). نتایج تحقیقات ما نشان داد، ۸۱ درصد سلول‌های زایا پس از انجماد با DMSO در مقایسه با اتیلن گلیکول (۶۵/۸ ٪) حیات خود را پس از ذوب حفظ کردند.

یک مرحله مهم در تحقیقات زیست‌شناسی تولیدمثل، بررسی بیان ژن‌ها و تعیین نشانگرهای اختصاصی برای شناسایی انواع سلول‌های زایا می‌باشد. ژن‌های *Nanos* و *Vasa* به عنوان مارکرهای رایج سلول‌های زایا در مطالعات مختلف معرفی شده‌اند. در این مطالعه برای اثبات حضور سلول‌های بنیادی زایا بیان ژن‌های خاص سلول‌های بنیادی (*Nanos, Vasa*) با روش Real-time PCR به شکل کمی مورد مقایسه قرار گرفت. در مطالعه Poursaeed و همکاران (۱۹۷۰) با استفاده از تکنیک In situ hybridization، رونوشت *vasa* در سلول‌های زایای بافت بیضه ماهی آزاد نیز بیان گردید. به طور کلی، نتایج آنها بیانگر این بود که که ژن *vasa* به عنوان نشانگر اختصاصی برای سلول‌های زایا در این ماهی و شیوه دورگه‌سازی در محل به عنوان یک عامل کاوشگر به منظور بررسی مکان و شدت بیان رونوشت ژن‌ها با حفظ ظاهر سلول‌ها در بافت بیضه ماهی آزاد قابل معرفی است (Poursaeed *et al*., 1970). *Vasa* یک پروتئین سیتوپلاسمی و حاصل بیان ژن *vasa* است. این ژن در سلول‌های زایا به صورت اختصاصی بیان می‌شود (Shinomiya *et al*., 2000). برای اثبات اختصاصی بودن ژن *vasa* مطالعات فراوانی صورت گرفته است. در این مطالعات با استفاده از تکنیک RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *vasa* بیان این ژن در ماهی‌های کپور، قزل‌آلای رنگین‌کمان و کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد که ژن *vasa* به طور اختصاصی در گنادها بیان می‌شوند. عمکرد دقیق این ژن هنوز مشخص نشده است، اما عنوان می‌شود که در تشکیل سلول‌های زایای بدوی نقش دارد و بر مهاجرت این سلول‌ها به ستیغ تناسلی و تکوین آنها تاثیرگذار است. در ماهی Medaka، ژن *vasa* برای مهاجرت سلولهای زایا به سمت گنادها ضروری است (Li *et al*., 2009) درحالی‌که در گورخر ماهی ژن *vasa* برای تمایز سلول‌ها بسیار

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

مهم است (Hartung *et al*., 2014). بیان اختصاصی ژن *vasa* در سلول‌های زایا، معمولاً در ماهیان استخوانی حفاظت شده است. در بسیاری از ماهی‌ها ، سیگنال ژن *vasa* در اووگونیا و تخمک‌های اولیه قوی است، اما با رشد تخمک کاهش‌می‌یابد. ژن‌های مرتبط با *Nanos* نیز در مهره‌داران مختلف گزارش شده است. *nas 1* و *nas2* در گورخرماهی (Haraguchi *et al*., 2003) و *nanos2*, *nanos1* و *nanos3* در موش وجود دارند (Tsuda *et al*., 2003). اگرچه بیان ژن *nanos1* در سلول‌های زایای موش تشخیص داده نشد (Haraguchi *et al*., 2003) ولی *nanos2* و *nanos3* به صورت متفاوتی در سلول‌های زایای آنها بیان می‌شوند. *nanos2* به‌طور عمده در سلول‌های زایانر بیان می‌شود و حذف این ژن منجر به از بین رفتن کامل سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود. *nanos3* در مهاجرت سلول‌های زایا نقش دارد و حذف این عامل منجر به از بین رفتن کامل سلولهای زایا در هر دو جنس می شود (Tsuda *et al*., 2003). در تحقیقات دیگری که بر ماهیان خاویاری صورت گرفته، نشان داده شده است که *nanos1* در گنادها بیان می‌شود به‌طوری‌که *nanos1* را در سیتوپلاسم اووسیت اولیه و در سیتوپلاسم اسپرماتوسیت اولیه می‌توان تشخیص داد (Ye *et al*., 2016). در مطالعه حاضر، در توافق با مطالعات پیشین، بیان mRAN ژن‌های *vasa* و *nanos* در سلول‌های زایا استخراجی از گناد لارو ماهی *Huso huso* در دو محیط کشت DMEM و L15 با گذشت زمان روند صعودی داشت. بدیهی است مطالعات بیشتر در مورد افزودن فاکتورهای رشد مختلف به محیط کشت این سلول‌ها، طراحی محیط‌های کشت مناسب برای این سلول‌ها و نیز استفاده از مطالعات ایمنوسیتوشیمی و فلوسیتومتری جهت شناسایی دقیق مارکرهای سلولی و اثبات حضور این سلول‌ها در محیط کشت، در آینده ضروری می‌باشد و زمینه را برای ترانسپلنت موفق این سلول‌ها به گناد ماهیان با دوره تولید مثلی کوتاه فراهم می کند.

تشکر و قدردانی

از مدیران و معاونین گرانقدر دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه و انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری (رشت) که زمینه انجام این پژوهش را فراهم نمودند و نیز پرسنل محترم مجموعه مذکور جهت همکاری بی‌دریغ‌شان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Aponte, P.M., Van Bragt, M.P.A., De Rooij, D.G. and Van Pelt, A.M.M., 2005. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*, 113, 727–742.

Cao, M., Yang, Y., Xu, H., Duan, J., Cheng, N., Wang, J., Hu, W. and Zhao, H., 2012. Germ cell specific expression of Vasa in rare minnow, Gobiocypris rarus. Comp. Biochem. *Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 162, 163–170.

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

Fryer, J.L., Yusha, A. and Pilcher, K.S., 1965. The in vitro cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. *Annals of the New York Academy* of *Sciences*, 126, 566–586.

Grunow, B., Noglick, S., Kruse, C. and Gebert, M., 2011. Isolation of cells from atlantic sturgeon acipenser oxyrinchus oxyrinchus and optimization of culture conditions. *Aquatic Biology*, 14, 67–75. https://doi.org/10.3354/ab00383

Haraguchi, S., Tsuda, M., Kitajima, S., Sasaoka, Y., Nomura-Kitabayashid, A., Kurokawa, K. and Saga, Y., 2003. nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

the atmosphere. *American Journal of Tropical Medicine and* Hygiene, 78, 173–180.

Li, M., Hong, N., Xu, H., Yi, M., Li, C., Gui, J. and Hong, Y., 2009. Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, 126, 366–381.

Makoolati, Z., Movahedin, M. and Forouzandeh-Moghadam, M., 2016. Proliferation in culture of primordial germ cells derived from embryonic stem cell: induction by retinoic acid. *Bioscience Reports*, 36, e00428.

Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y. and Yoshizaki, G., 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* , 317, 1517.

Patra, S., Mishra, G., Dash, S.K., Verma, D.K., Nandi, S., Jayasankar, P. and Routray, P., 2016. Transplantation worthiness of cryopreserved germ cells of Indian major carp rohu, Labeo rohita. *Current Science*, 739–746.

Poursaeed, S., Kalbassi, M.R., Hassani, S.N., Yushizaki, G. and Baharvand, H., 1970. Localization of Vasa mRNA in testicular tissue of Caspian trout (Salmo caspius) using in situ hybridization. *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 7, 23–39.

Pšenička, M., Saito, T., Linhartová, Z. and Gazo, I., 2015. Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology*, 83, 1085–1092. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.010

Pšenička, M., Saito, T., Rodina, M. and Dzyuba, B., 2016. Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon Acipenser baerii germ cells, *Mechanisms of Development*, 120, 721–731.

Hartung, O., Forbes, M.M. and Marlow, F.L., 2014. Zebrafish vasa is required for germ-cell differentiation and maintenance. Mol. Reprod. Dev. 81, 946–961.

Horváth, Á., Miskolczi, E. and Urbányi, B., 2003. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*, 16, 457–460.

Izadyar, F., Matthijs-Rijsenbilt, J.J., Den Ouden, K., Creemers, L.B., Woelders, H. and de ROOIJ, D.G., 2002. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *Journal of Andrology*, 23, 537–545.

Kaul, G., Kumar, S. and Kumari, S., 2012. Enrichment of CD9+ spermatogonial stem cells from goat (Capra aegagrus hircus) testis using magnetic microbeads.

Keivanloo, S. and Sudagar, M., 2013. Preliminary studies on the cryopreservation of Persian Sturgeon (Acipenser persicus) embryos. *Open Access Scientific Reports*, 2, 674.

Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G. and Takeuchi, T., 2003. Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiology and Biochemistry*, https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030634.37486.fa

Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E., 2001. A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes & Development*, 15, 2877–2885. https://doi.org/10.1101/gad.212401

Leibovitz, A., 1963. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

comparison of whole tissue and dissociated cells. *Cryobiology*, 72, 119–122. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.005

Rall, W.F., 1993. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for application to the conservation of salmonid fishes, in: Genetic Conservation of Salmonid Fishes. Springer, pp. 137–158.

Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Alfonso, J., Herráez, M.P. and Robles, V., 2014. In vitro generation of zebrafish PGC-like cells. *Biology of Reproduction*, 91, 111–114.

Saito, T., Pšenička, M., Goto, R., Adachi, S., Inoue, K., Arai, K. and Yamaha, E., 2014. The Origin And Migration Of Primordial Germ Cells In Sturgeons. *PLoS One*, 9, e86861. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086861

Shikina, S., Nagasawa, K., Hayashi, M., Furuya, M., Iwasaki, Y. and Yoshizaki, G., 2013. Short-term in vitro culturing improves transplantability of type A spermatogonia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development*, 80, 763–773.

Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Hamaguchi, S., 2000. The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, Oryzias latipes. *Development, Growth & Differentiation*, 42, 317–326.

Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S. and Saga, Y., 2003. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*, 301, 1239–1241.

Vecsei, P., Litvak, M.K., Noakes, D.L.G., Rien, T. and Hochleithner, M., 2003. A noninvasive technique for determining sex of live adult North American sturgeons. *Environmental Biology of Fishes*, 68, 333–338. https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000005732.98047.f3

Xie, X., Li, P., Pšenička, M., Ye, H., Steinbach, C., Li, C. and Wei, Q., 2019. Optimization of in vitro culture conditions of sturgeon germ cells for purpose of surrogate production. *Animals*, 9. https://doi.org/10.3390/ani9030106

Ye, H., Chen, X., Wei, Q., Zhou, L., Liu, T., Gui, J., Li, C. and Cao, H., 2012. Molecular and expression characterization of a nanos1 homologue in Chinese sturgeon, Acipenser sinensis. *Gene*, 511, 285–292. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.005

Ye, H., Yue, H.M., Yang, X.G., Li, C.J. and Wei, Q.W., 2016. Identification and sexually dimorphic expression of vasa isoforms in Dabry′s sturgeon (Acipenser dabryanus), and functional analysis of vasa 3′-untranslated region. *Cell and Tissue Research*, 366, 203–218. https://doi.org/10.1007/s00441-016-2418-6

Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H. and Takeuchi, T., 2000. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Molecular Reproduction and Development*, 55, 364–371.

Zhang, T., Rawson, D.M., Pekarsky, I., Blais, I. and Lubzens, E., 2007. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes, in: The Fish Oocyte. Springer, pp. 411–436.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]

An investigation of primordial germ cell development in embryo and larvae of *Huso huso*

Sohrabi M.R.Gh.[1]; Jamshidi Sh.[2]; Mirzapour T.[1*]; Sohrabi Langaroudi T.[2]; Fadakar H.[1]

[*]t.mirzapoor@guilan.ac.ir

1- Department of biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- International Caspian Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Rasht, Iran.

Abstract

In sturgeons, Primordial Germ Cells originate from vegetal pole of the egg. They migrate toward genital ridges during developmental stages and finally differentiate into gametes (the only cells that transmit genetic information). In this study, the cells were isolated from place of migration of primordial germ cells in *Huso huso's* larvae during two stages before and after absorption of the yolk sac by enzymatic digestion. The obtained cell suspensions were cultured for three weeks in L-15 and DMEM medium. The number and diameter of colonies was compared in two culture system. Expression of *Nanos* and *Vasa* genes was measured during different days of culture by qPCR method. To preserve PGCs for a long time, cryopreservation was operated by Dimethyl Sulfoxide and Ethylene glycol. The results showed that the number and diameter of colonies increased in the group after absorbed yolk sac in both L-15 and DMEM medium. The chance of survival for the cells after melting was significantly higher in the presence of DMSO rather than presence of EG. Given the long reproductive cycle and the long time it takes to reach sexual maturity, this method can be used to transplant cultured PGCs into the gonad of species with a short reproductive cycle.

Keywords: Primordial Germ Cell, *Huso huso* larvae, Cell Culture, Cryopreservation

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1401.9.1.7.8]