فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال پنجم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۶

بررسی اثر تغییرات دما و غلظت سرم جنین گاوی بر روند رشد و تکثیر سلول‌های تخمدانی کشت داده شده ماهی مید (*Liza klunzingeri*)

زهرا شیبانی[۱،۲]، عبدالعلی موحدی‌نیا[۳،۴]*، نگین سلامات[۴]، محمود هاشمی‌تبار[۵]، وحید بیاتی[۶]

تاریخ دریافت: آذر ۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۹۵

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، بررسی تاثیر میزان درصد سرم جنین گاوی (FBS) و تغییرات دمایی در کشت اولیه سلول‌های تخمدانی ماهی مید (*Liza klunzingeri*) بود. به همین منظور تعداد ۱۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۴۵ تا ۵۰ گرم صید و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از ضدعفونی کردن بدن ماهی‌ها توسط الکل اتانول ٪۷۰، بافت تخمدان از بدن خارج و توسط قیچی به قطعات ریز تقسیم شد. سلول‌های تخمدانی با استفاده از آنزیم تریپسین جداسازی و در فلاسک‌های حاوی محیط کشت L-15 در شرایط متفاوت دمایی (۲۰، ۲۵، ۲۸، ۳۰ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد) و میزان سرم جنین گاوی (۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) کشت شدند. شمارش سلول‌ها نشان داد که رشد سلول‌های تخمدانی ماهی مید در محیط کشت دارای FBS ۱۵ درصد به حداکثر خود رسید، در حالی که تغییرات دمایی تاثیر چندانی بر رشد سلول‌های این ماهی نداشت. در مجموع، مناسب‌ترین شرایط برای کشت سلول‌های تخمدانی ماهی مید، استفاده از FBS ۱۵ درصد و دمای بالاتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد است.

واژگان کلیدی: *کشت سلول*، Liza klunzingeri، *FBS*، *دما*.

۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
۲- مربی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
۵- دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران.
۶- استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران.
* نویسنده مسئول: amovahedinia@yahoo.com

مقدمه

برای اولین بار در سال ۱۹۶۲ میلادی تکنولوژی تولید رده سلولی توسط Wolf و Quimby به جهان علم معرفی شد (Bain et al., 2013) و از آن زمان به بعد به عنوان ابزاری برای مطالعات زیست‌شناختی به کار گرفته شد (Zhou et al., 2005). تاکنون بیش از ۲۸۳ رده سلولی از ماهیان منتشر شده است (Lakra et al., 2011) که بیشتر آن‌ها از بافت‌هایی مانند باله، کلیه، عضله و کبد به دست آمده‌اند (Zhou et al., 2005).

کشت سلولی، بیشتر در مورد سلول‌های جانوری کاربرد دارد و به کشت کنترل شده سلول‌های پروکایوتی و یوکاریوتی در شرایط آزمایشگاهی و محیط کشت اطلاق می‌شود. این روش آسان است و قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد. اصلی‌ترین دلیل استفاده از روش کشت سلولی، کاهش استفاده از موجود زنده و عدم آلودگی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی است، ضمن این که در این روش، مواد سمی کمتری وارد محیط زیست می‌شود و نتایج بررسی‌ها نیز با سرعت بیشتر و هزینه کمتری به دست می‌آید (Fent, 2001).

کشت سلول‌های آبزیان دارای مزایای بیشتری نسبت به کشت سایر گروه‌های جانوری است که از جمله می‌توان به کشت سلول‌ها در دامنه وسیع دمایی ۱۶ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد اشاره کرد (Wolf and Quimby, 1976; Fryer and Lannan, 1994). فرآیند تنظیم دما، یکی از فرآیندهای فیزیولوژیکی- حیاتی در جانداران است، به طوری که برای ادامه حیات، انجام فعالیت‌های سلولی و واکنش‌های درون سلولی به دمای مناسب احتیاج است. علاوه بر دمای مناسب، برای کشت سلول‌ها، به فاکتورهای مکمل رشد که از سرم خون جانوران تهیه می‌شود نیز احتیاج است. سرم جنین گاو (FBS)[1] بهترین سرم شناخته شده برای کشت سلولی و ویروسی است. تاکنون دیگر سرم‌های ساخته شده و مواد مصنوعی نتوانسته‌اند جایگزین مناسبی برای این ماده باشند (Zhou et al., 2005). این سرم به علت داشتن مواد طبیعی لازم برای رشد و بقای سلول‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است و برای رشد اکثر سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در این مطالعه، به منظور تعیین روش بهینه، برای کشت سلول‌های تخمدانی که نقش به

1 Fetal Bovine Serum

سزایی در زاد و ولد و بقای نسل موجود زنده دارند، از ماهی *Liza klunzingeri* استفاده شد. با کشت سلول‌های تخمدانی، از کشته شدن تعداد زیادی ماهی مولد برای انجام مطالعات تحقیقاتی جلوگیری خواهد شد و بررسی اثر مستقیم مواد و عوامل مختلف از جمله هورمون‌ها و مواد آلاینده بر سلول‌های تخمدانی میسر خواهد شد. ماهی *L. klunzingeri* از خانواده Mugilidae است که پراکنشی جهانی دارد و در اقیانوس هند از دریای سرخ تا بمبئی (هند)، در خلیج فارس و همچنین در ژاپن و سواحل چین نیز گزارش شده است. زیستگاه طبیعی این ماهی آب‌های ساحلی با بسترهای مختلف، آب‌های لب‌شور و تالاب‌هایی با شوری بالا است (Ameida, 2003). این ماهی از انواع تک سلولی‌ها، جلبک‌ها، سخت‌پوستان، نرمتنان و حشرات تغذیه می‌کند (Cardona, 2001; Laffaille et al., 2002; Almeida, 2003) و به علت عادت غذایی بنتیک‌خواری، مواد آلاینده در بدن آن‌ها انباشته می‌شود (Pastoret et al., 1996; Yilmaz, 2009) به همین دلیل شاخص زیستی مناسبی برای بررسی آلودگی آب محسوب می‌شود (Boglion et al., 2006;An et al., 2011). بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین بهترین شرایط دمایی و تغذیه‌ای کشت سلول‌های تخمدانی این ماهی در محیط آزمایشگاه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، به منظور بررسی اثر میزان غلظت سرم جنین گاوی (FBS) و تغییرات دمایی بر روند رشد و افزایش تعداد سلول‌های تخمدانی کشت داده شده، ۱۰ قطعه ماهی مید (*Liza klunzingeri*) ماده بالغ با وزن تقریبی ۴۵ تا ۵۰ گرم، از منطقه خورموسی واقع در شمال خلیج فارس (خوزستان، ایران) صید و به صورت زنده به آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه جندی شاپور اهواز منتقل شد. بررسی رشد و تکثیر سلول‌های تخمدانی توسط آزمایشی با ۵ تکرار شامل ۴ غلظت مختلف FBS (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) همراه با یک تیمار شاهد (فاقد FBS) و ۵ تیمار متفاوت دمایی شامل ۲۰، ۲۵، ۲۸، ۳۰ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

ابتدا ماهیان توسط ۲- فنوکسی اتانول (۰/۲ درصد) بیهوش و به طور کامل توسط الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند (Wen et al.,2008). سپس بافت تخمدان هر یک از ماهیان در شرایط کاملا استریل از بدن آن‌ها خارج شد و به طور جداگانه به لوله‌های فالکن ۵۰ میلی‌لیتر حاوی بافر فسفات نمکی (۴۰۰ واحد در میلی‌لیتر

پنی‌سیلین و ۴۰۰ واحد در میلی‌لیتر استرپتومایسین) منتقل شد (Part et al., 1993). پس از شستشوی اولیه نمونه‌ها در بافر، هر تخمدان توسط قیچی به تکه‌های کوچک (۱-۰/۵ سانتی‌متر مربع) تقسیم شد و به لوله‌های فالکن حاوی ۴ میلی‌لیتر آنزیم تریپسین (۰/۰۵ درصد) منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شدند تا کلیه قطعات بافت هضم شود. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر، به منظور توقف عمل هضم سلولی و خنثی کردن عمل آنزیم تریپسین، هم حجم آن محیط کشت L-15 (حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین) به همراه FBS ۲۰ درصد به آن اضافه شد. FBS موجود در محیط کشت باعث غیرفعال شدن آنزیم تریپسین می‌شود. محلول به دست آمده سپس از فیلتری با منافذ ۷۰ میکرونی عبور داده شد. بدین ترتیب سلول‌ها از یکدیگر جدا شدند و محیط همگنی به دست آمد. در مرحله بعد محلول به دست آمده به مدت ۷ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریوفوژ (EBA200، Hettich، آلمان) قرار داده شد و سپس محلول رویی (سوپرناتانت) آن حذف شد. به رسوب سلولی به دست آمده ۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و به وسیله پیپتاژ، سوسپانسیون ایجاد شد. در نهایت، سلول‌های تخمدانی به دست آمده با تراکم ۴×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر به همراه مقادیر مختلف FBS (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) به ظروف کشت ۲۵ سانتی‌متر مربعی منتقل شد تا بهترین غلظت FBS برای رشد سلول‌ها تعیین شود. ظروف کشت حاوی سلول‌ها سپس در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا بهترین شرایط دما و FBS در کشت سلول‌های تخمدانی ماهی *L. klunzingeri* مشخص شود.

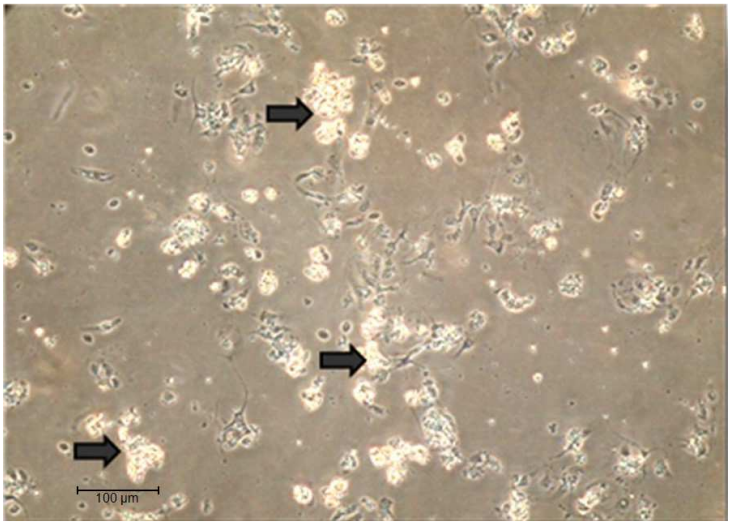
این پژوهش به مدت ۱۵ روز به طول انجامید و سلول‌ها در روزهای ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ توسط لام نئوبار شمارش شدند. در تمامی آزمون‌ها ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین شد. به منظور رسم نمودارها و جدول‌ها از نرم‌افزار Excel 2013 Microsoft Office استفاده شد. کلیه داده‌های موجود در مطالعه حاضر (تعداد سلول‌ها در تیمارهای مختلف) نیز با ۵ بار تکرار و به صورت میانگین در هر گروه متغیر ارائه شد.

نتایج

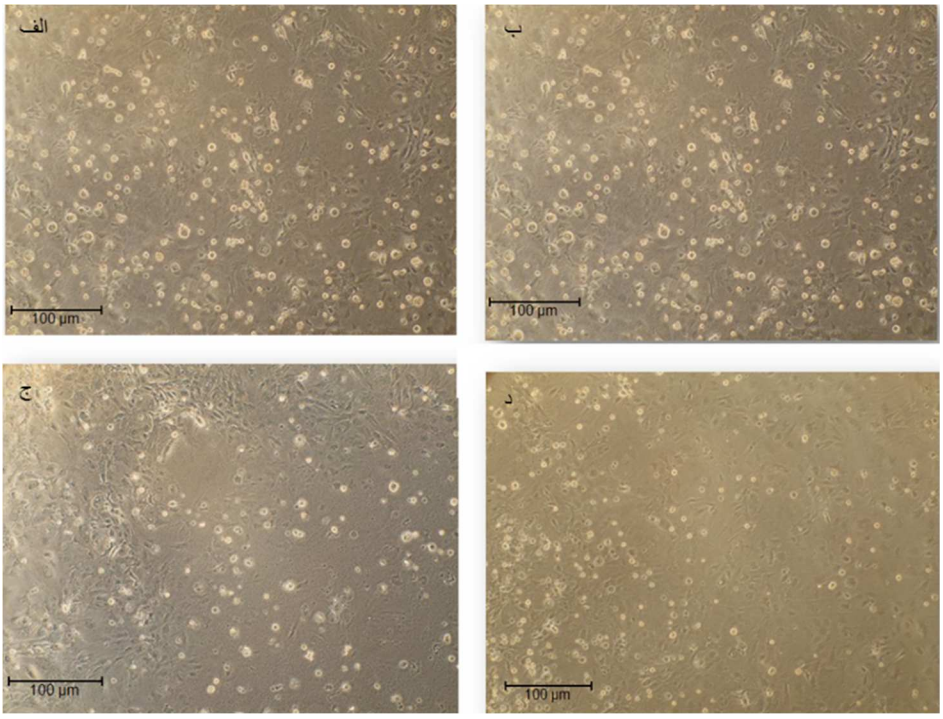
بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت اولیه، سلول‌های تخمدانی جداسازی شده از ماهی

مید، به صورت جمعیت‌های کوچک تک‌سلولی به کف فلاسک چسبیدند. سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند در پایان ۷۲ ساعت انکوباسیون با تعویض محیط کشت حذف شدند. اکثر سلول‌ها، کلونی‌های فیبروبلاستی‌شکل تشکیل داده بودند که در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده بود (شکل ۱).

ارزیابی تاثیر غلظت‌های مختلف FBS بر رشد سلول‌ها مشخص کرد که در صورت عدم وجود سرم جنین گاوی در محیط، سلول‌ها هیچ گونه رشدی (افزایش تعداد سلول) از خود نشان نمی‌دهند. اما با افزایش میزان FBS رشد و تکثیر سلول‌ها به سرعت زیاد شد و حداکثر رشد سلول‌ها در محیط کشت حاوی FBS ۱۵ درصد مشاهده شد (شکل ۲ ج). با این وجود، افزایش تعداد سلول در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ درصد در پایان دوره آزمایش (روز ۱۵) تفاوت معنی‌داری نشان نداد و افزایش بیشتر غلظت FBS تاثیر معنی‌داری در روند رشد سلول‌ها نداشت (شکل ۲).



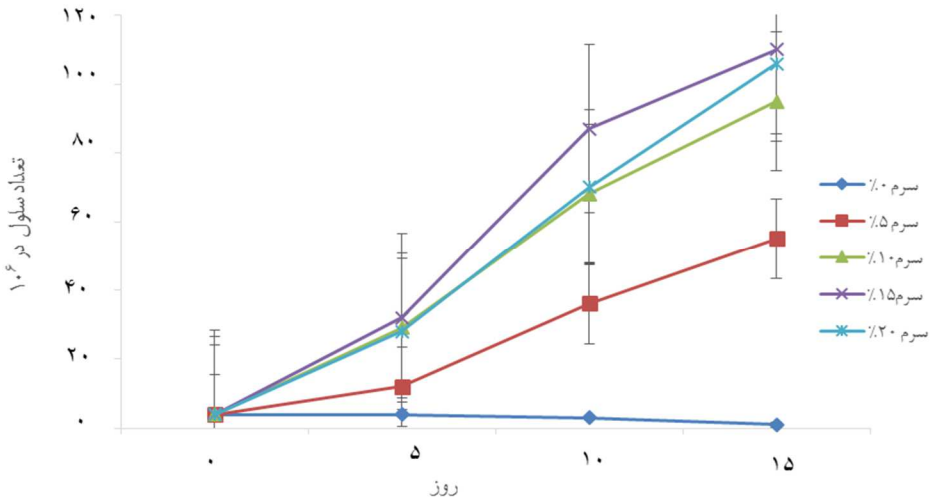
شکل ۱: سلول‌های تخمدانی کشت داده شده ماهی مید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بعد از گذشت ۲۴ ساعت. پیکان‌های سیاه کلنی‌های سلولی را نشان می‌دهند.



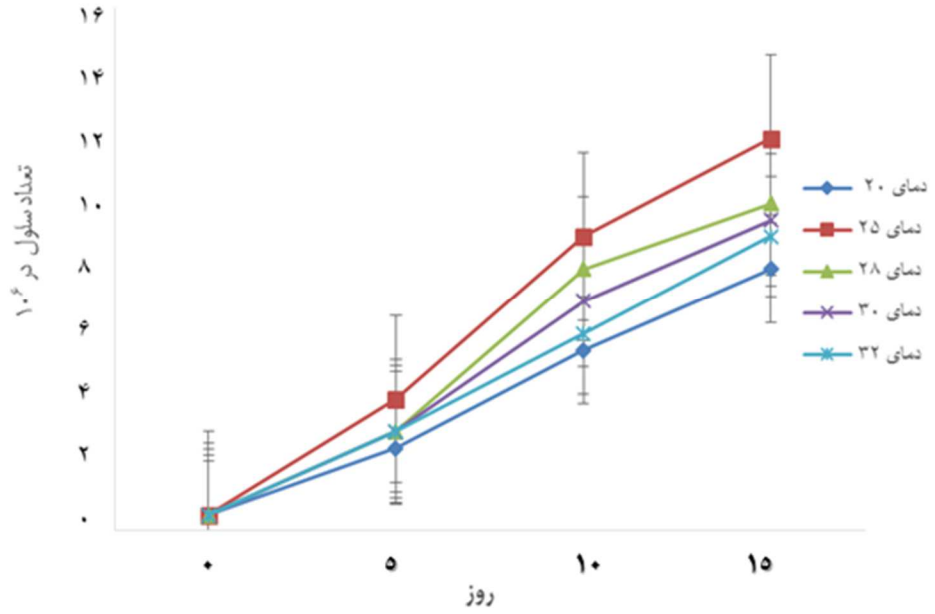
شکل ۲: سلول‌های کشت داده شده تخمدان ماهی مید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف FBS. سلول‌های کشت داده شده در (الف) محیطی فاقد FBS، (ب) محیط حاوی FBS ٪۱۰، (ج) محیط حاوی FBS ٪۱۵ و (د) محیط حاوی FBS ٪۲۰.

همانگونه که در نمودار شکل ۳ نشان داده شده است، هنگامی که محیط فاقد سرم جنین گاوی بود، تعداد سلول‌ها افزایش معنی‌داری مشاهده نشد. اما با افزایش این سرم در محیط کشت تا غلظت ٪۲۰، تعداد سلول‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت.

در این مطالعه، علاوه بر اثر FBS، اثر دما نیز بر میزان تکثیر سلول‌ها بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش دمای محیط تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد تعداد سلول‌ها در نتیجه تقسیم سلولی به طور معنی‌داری افزایش یافت، ولی افزایش دما به بیش از ۲۵ درجه سانتی‌گراد اثر معنی‌داری بر رشد سلول‌های تخمدانی در این گونه ماهی نداشت. در دمای پایین‌تر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد رشد سلول‌ها بسیار کم بود و در دماهای ۲۵، ۲۸، ۳۰ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد تعداد سلول‌ها در پایان روز پانزدهم تغییر کمی را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۳: مقایسه تعداد سلول‌های تخمدان ماهی مید در غلظت‌های مختلف FBS



شکل ۴: تاثیر دما بر تعداد سلول‌های تخمدان ماهی مید

بحث

امروزه می‌توان نیاز به کشت و توسعه کشت‌های سلولی را به دو دسته روش‌شناسی و زیست‌شناسی تقسیم کرد. در بسیاری از موارد جدا کردن این دو از یکدیگر کار بسیار سختی است. به نظر می‌رسد مهمترین مساله در رابطه با کشت سلول مستقل، مطالعه فیزیولوژی، متابولیسم و مواد مغذی مورد نیاز آن رده سلولی است (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۳).

بررسی‌های مختلفی توسط پژوهشگران در ارتباط با کشت سلول‌های تخمدانی و اثر عوامل مختلف بر تخمک‌ها در شرایط آزمایشگاهی در مورد تعدادی از ماهیان از جمله ماهی قرمز *Carassius auratus* (McMaster et al., 1995) و ماهی کپور معمولی (Salamat et al., 2010) صورت گرفته است. پژوهشگران مانند Kumar و همکارانش (۱۹۹۸) برای کشت سلول‌های جنینی *Poecilia reticulata* از FBS ۱۰ درصد استفاده کردند. در مطالعه مشابهی توسط Sunil Kumar و همکارانش در سال ۲۰۰۱ برای کشت سلول‌های ماهیچه‌ای و سلول‌های تخمدانی ماهی *Clarias gariepinus* صورت گرفت، از فاکتور رشد FBS ۲۰ درصد و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال سلول‌ها به کف فلاسک استفاده شد. Khamis و Hashem (۲۰۱۲) FBS ۲۰ درصد و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد را بهترین شرایط برای کشت سلول‌های تخمدانی ماهی *Oreochromis niloticus* اعلام داشتند. Roy و همکارانش (۲۰۱۶) نیز طی مطالعاتی که بر روی بافت تخمدان ماهی *Sebastes schlegelii* انجام دادند دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و FBS ۱۵ درصد را بهترین شرایط برای رشد این سلول‌ها گزارش دادند.

اکثر رده‌های سلولی ماهیان گرمسیری در دامنه دمایی ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند (Wen et al., 2008) در مطالعه حاضر نیز دامنه تغییرات بین ۲۰ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد که به نظر می‌رسد با توجه به تفاوت تعداد سلول‌ها در زمان‌های مختلف، تغییرات دمایی در محدوده مورد آزمایش تاثیر زیادی بر رشد و تکثیر سلول‌های تخمدانی نداشته است. از طرفی با افزایش غلظت FBS تا حد ۱۵ درصد رشد سلول‌ها در مدت زمان مورد مطالعه به میزان قابل توجهی افزایش یافت ولی افزایش بیشتر FBS تاثیر به سزایی در رشد آن‌ها نداشت. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، مناسب‌ترین دما برای رشد سلول‌های تخمدانی ماهی مید در محدوده دمایی ۲۰ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد با

میزان FBS ۱۵ درصد است. از این رو، پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی که در رابطه با این گونه صورت می‌گیرد، از این شرایط دمایی و غلظتی استفاده شود. لازم به ذکر است که روش کشت سلول‌های تخمدانی در خارج از بدن موجود زنده باید بیشتر توسعه یابد زیرا با این کار انجام مطالعات مختلف از جمله مطالعات اندوکرینولوژی و ژنتیک مانند بررسی ژن‌های مختلف بر ترشح هورمون‌های موثر در رشد و رسیدگی فولیکول‌های تخمدانی در شرایط آزمایشگاهی، در تمام طول سال حتی خارج از فصل تکثیر امکان پذیر است که این موضوع ضرورت محدود شدن این مطالعات به مقطع زمانی خاص را منتفی می‌سازد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه جندی‌شاپور اهواز به ویژه آقای مهندس صارمی کمال تشکر و سپاسگزاری را دارند.

منابع

نوروزی ک.، کلباسی م.، فرزانه پ.، شاهزاده فاضلی س.، فرقدان م.، نسیمیان ا.، ایزدپناه م.، آشوری موثق س.، محمدی ش.، مرادمند ز. و فرهنگ‌نیا م. ۱۳۹۳. تولید و ارزیابی رده سلولی اپتیلیایی‌شکل بافت باله ماهی آزاد دریای خرز (*Salmo trutta caspius*). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۲(۳): ۸۸-۶۹.

Almeida P.R. 2003. Feeding ecology of *Liza ramada* (Risso, 1810) (Pisces, Mugilidae) in a south-western estuary of Portugal. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 57: 313–323.

Ameida P.R. 2003. Feeding ecology of *Liza ramada* (Risso, 1810) (Pisces, Mugilidae) in a south-western estuary of Portugal. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 57: 313–323.

An L., Hu J., Yang M., Zheng B., Wei A., Shang J. and Zhaho X. 2011. CYP1A mRNA expression in redeye mullets (*Liza haematocheila*) from Bohai Bay. Marine Pollution Bulletin, 62(4): 718–725.

Bain P.A., Hutchinson R.G., Marks A.B., Crans M.J. and Schuller K.A. 2013. Establishment of a continuous cell line from south bluefine tuna (*Thunnus maccoyii*). Aquaculture, 59(3): 59–63.

Boglion C., Costa C., Giganti M., Cecchetti M., Di Dato P., Scardi M. and Cataudell S. 2006. Biological monitoring of wild thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*), golden grey mullet (*Liza aurata*), thinlip mullet (*Liza ramada*) and flathead mullet (*Mugil cephalus*) (Pisces: Mugilidae) from different Adriatic sites: meristic counts and skeletal anomalies. Ecological Indicators, 6(4): 712–732.

Cardona L. 2001. Non-competitive coexistence between Mediterranean grey mullet: Evidence from seasonal changes in food availability, niche breadth and trophic overlap. Journal of Fish Biology, 59: 729–744.

Fent K. 2001. Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). Marine Environmental Research, 42: 377–382.

Fryer J.L. and Lannan C.N. 1994. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fish. Journal of Tissue Culture Methods, 16: 87–94.

Khamis O. and Hashem M.H. 2012. Developing a cell culture system from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus,* L.) ovarian tissue in Egypt.

IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 2: 8–12.

Kumar A., Sharma B. and Pandey R.S. 1998. Assessment of stress in effect to pyrethroid insecticides, λ-cyhalothrin and cypermethrin, in a freshwater fish, *Poecilia reticulata* (Bloach). Cellular and Molecular Biology Letters, 58: 153–159.

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

Laffaille P., Feunteun P., Lefebvre C., Radreau A., Sagan G. and Lefeuvre J.C. 2002. Cthin- lipped mullet directly exploit the primary and detritic production of European macrotidal salt marshes? Estuarine, Coastal and Shelf Science, 54(4): 729–739.

McMaster M.E., Munkittrick K.R., Jardine J.J., Robinson R.D. and Van Der Kraak G.J. 1995. Protocol for measuring in vitro steroid production by fish gonadal tissue. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1961. 78P.

Pastor D., Boix J., fernandes V. and Albaiges J. 1996. Bioaccumulation of organachlorinated contaminants in three estuarine fish speciel (*Mullus barbatus*, *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax*). Marine pollution Bulletin, 32(3): 257–262.

Part P., Morrghan L., Bergsrom E. and sjoberg P. 1993. Primary cultures of epithelial cells from rainbow trout gills. Indian Journal of Experimental Biology, 175: 219–233.

Roy S. and Bhattacharya S. 2016. Arsenic-induced histopathology and synthesis proteins in ovary and kidney of *Channa punctatus*. Ecotoxicology and Environment Safety, 65(2): 218–229.

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

Sunil Kumar G., Bright Singh I.S. and Philip R. 2001. Development of a cell culture system from the ovarian tissue of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture, 194(1–2): 51–62.

Wen C.M., Lee C.W., Wang C.S., Cheng Y.H. and Huang H.Y. 2008. Development of two cells from *Epinephelus coioides* brain tissue for characterization of betanodavirus and megalocytivirus infectivity and propagation. Aquaculture, 278: 14–21.

Wolf K. and Quimby M.C. 1976. Primary monolayer culture of fish cells initiated from minced tissue.

Tissue Culture Associated Manual, 2(4): 445–448.

Yilmaz F. 2009. The comparison of heavy metal concentrations (Cd, Cu, Mn, Pb, and Zn) in tissues of three economically important fish (*Anguilla anguilla*, *Mugil cephalus* and *Oreochromis niloticus*) inhabiting, Koycegiz Lake- Mugla (Turkey). Turkish Journal of Science and Technology, 4(1): 7–15.

Zhou B., Liu W., Wu R.S.S. and Lam P.K.S. 2005. Culture gill epithelial cells from tilapia (*Oreochromis niloticus*): A new in vitro assay for toxicants. Aquatic Toxicology, 71: 61–72.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 5, No. 4, Winter 2018

The effect of temperature changes and fetal bovine serum concentration on the growth of cultivated ovarian cells of *Liza klunzingeri*

Zahra Shaibani[1,2], Abdolali Movahedinia[3,4*], Negin Salamat[4], Mahmoud Hashemitabar[5], Vahid Bayati[6]

Received: December 2016 Accepted: March 2017

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of fetal bovine serum (FBS) and temperature changes on the cultivated ovarian cells of *Liza klunzingeri*. For this purpose, 10 fish weighing 45 to 50 grams were caught and transferred to the laboratory. After disinfecting the body of the fish with 70% ethanol, the ovarian tissue was removed from the body and divided by scissors into small pieces. The ovarian cells were aspirated by using trypsin enzyme and were cultivated in the flasks containing L-15 medium under different temperature conditions (20, 25, 28, 30 and 32°C) and the serum concentrations of bovine embryos (0, 10, 15 and 20%). Cell count showed the maximum density of *L. klunzingeri* ovarian cells was observed in 15% FBS concentration, while temperature variations had no significant effect on cell proliferation. In conclusion, the most suitable conditions for the culture of ovarian cells in *L. klunzingeri* are the use of FBS 15% and temperatures above 20°C.

Key words: *Cell Culture*, Liza klunzingeri, *FBS*, *Temperature*.

1- Ph.D. Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.
2- Scientific Member in Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
3- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
4- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.
5- Associate Professor in Molecular and Cellular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
6- Assistant Professor in Molecular and Cellular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
*Corresponding Author: amovahedinia@yahoo.com