Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Primary cell culture from gill and kidney of Caspian Sea salmon (*Salmo caspius*, Kessler, 1877)

Zohre Ghodsi[*1], Mohammad Reza Kalbasi[2], Ashraf Mohabati Mobarez[3]

1. Corresponding Author, Ph.D. in Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran. E-mail: zohrehghodsi13@gmail.com
2. Professor, Dept. of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran. E-mail: mkalbassi@gmal.com
3. Professor, Dept. of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 04.11.2023
Revised: 05.02.2023
Accepted: 05.20.2023

Keywords:
Caspian Sea salmon,
Gill,
Kidney,
Primary cell culture

ABSTRACT

Cell lines provide an important biological tool for carrying out investigations into physiology, virology, pharmacology, toxicology, cancer which can be used as a biological substitute for living animals. Establishment of cell cultures from endemic fish and endangered Such as the Caspian Sea salmon (*Salmo caspius*, Kessler, 1877) and Production in vitro models of it can be of assistance to biological studies, immunology, toxicology, physiology. The purpose of this study is to produce primary cell cultures from the kidney and gill of Caspian salmon in order to create cell lines from these tissues in the next stages. The aim of this study is to produce primary cells from the kidney and gill of Caspian salmon in order to create cell lines from these tissues in the next stages. 30 Caspian Sea salmon (*Salmo caspius*, Kessler, 1877) prepared and primary cell was produced from kidney and gill tissues through the explant culture method. The tissues are cultured in Leibovitz-15 medium with 20%, 10% and 5% fetal bovine serum at 15, 18 and 21 ºC. The growth process of cells was checked daily by inverted light microscope. The results showed that primary cells produced from Caspian Sea salmon are slow to grow and take a long time for cell migration from the tissue and doubling time. But they have a relatively good subculture and grow well up to passage 5 in L-15 culture medium with 10% fetal bovine serum. The morphological study of the produced cells showed that they are a mixture of fibroblast-like and epithelial-like cells. Investigating the process of cell growth at different temperatures showed that the optimal growth for this type of cell culture is 18 ºC. This study showed that the explant is a suitable method for producing primary cells from kidney tissue and gill of Caspian sea salmon, and the primary cells have a good ability to produce cell lines from the kidney and gill tissue of this species.

Cite this article: Ghodsi, Zohre, Kalbasi, Mohammad Reza, Mohabati Mobarez, Ashraf. 2024. Primary cell culture from gill and kidney of Caspian Sea salmon (*Salmo caspius*, Kessler, 1877). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (1), 161-173.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.21252.1770
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

کشت سلولی اولیه از بافت آبشش و کلیه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*, Kessler, 1877)

زهره قدسی*[۱]، محمدرضا کلباسی[۲]، اشرف محبتی مبارز[۳]

۱. نویسنده مسئول، دکتری شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران. رایانامه: zohrehghodsi13@gmail.com
۲. استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران. رایانامه: mkalbassi@gmal.com
۳. استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: mmmobarez@modares.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰۱/۲۲
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۰۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۲/۳۰

واژه‌های کلیدی:
آبشش،
کشت سلولی اولیه،
کلیه،
ماهی آزاد دریای خزر

چکیده

رده‌های سلولی ابزار مهم زیستی برای انجام پژوهش‌ها در زمینه مختلف است که می‌تواند به عنوان یک مدل جایگزین زیست‌شناختی حیوان زنده مورد استفاده قرار بگیرد. تولید کشت‌های سلولی از ماهیان اندمیک و در معرض خطر انقراض مانند ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*, Kessler, 1877) و ایجاد مدل‌های in vitro از آن، می‌تواند کمک شایانی به مطالعات زیست‌شناختی، ایمونولوژی، سم‌شناسی، فیزیولوژی و ... نماید. هدف از این مطالعه تولید کشت سلولی اولیه از کلیه و آبشش ماهی آزاد دریای خزر به منظور ایجاد رده‌های سلولی از این بافت‌ها در مراحل بعد است. تعداد ۳۰ عدد ماهی آزاد دریای خزر تهیه شد و سلول اولیه از بافت کلیه و آبشش از طریق روش کشت ریزبافت انجام گرفته است. بافت‌های موردنظر در محیط Leibovitz-15 همراه با سرم جنین گاو ۲۰، ۱۰ و ۵ درصد در دمای ۱۵، ۱۸ و ۲۱ درجه سانتی‌گراد کاشته و نگهداری شدند به منظور ارزیابی روند رشد سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری معکوس به صورت روزانه بررسی شدند. نتایج نشان داد سلول‌های اولیه تولید شده از ماهی آزاد دریای خزر، دیر رشد هستند و زمان مهاجرت سلول از بافت و زمان دو برابر شدن آن طولانی است اما این سلول‌ها قابلیت پاساژپذیری نسبتاً خوبی دارند و در محیط کشت L-15 با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد به خوبی تا پاساژ ۵ رشد می‌کنند. در هر دو کشت جمعیت ناهمگن متشکل از سلول‌های فیبروبلاستی- شکل و اپیتلیالی شکل دیده شد. بررسی روند رشد سلول‌ها در دمای مختلف نشان داد، دمای بهینه رشد برای کشت سلول‌های این گونه ۱۸ درجه سانتی‌گراد است. این مطالعه نشان داد که کشت ریزبافت یک روش مناسب برای تولید سلول‌های اولیه از بافت کلیه و آبشش ماهی آزاد دریای خزر است و سلول‌های اولیه تولید شده قابلیت خوبی برای تولید رده سلولی از بافت کلیه و آبشش این گونه دارند.

استناد: قدسی، زهره، کلباسی، محمدرضا، محبتی مبارز، اشرف (۱۴۰۳). کشت سلولی اولیه از بافت آبشش و کلیه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*, Kessler, 1877). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۱)، ۱۷۳-۱۶۱.
DOI: 10.22069/japu.2023.21252.1770

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

رده‌های سلولی ابزار مهم زیستی برای انجام پژوهش‌ها در زمینه‌های مختلف می‌باشد که می‌توانند به عنوان جایگزین زیست‌شناختی حیوان زنده مورد استفاده قرار بگیرند (۱). کشت بافت‌های ماهیان از بسیاری جهات، شباهت زیادی به روش‌های استفاده شده برای کشت بافت پستانداران و پرندگان دارد (۲). کشت‌های سلولی تولید شده از ماهیان مزایای متعددی نسبت به کشت سلولی پستانداران، از نظر سازگاری با طیف وسیعی ازدما، تحمل بیش‌تر نسبت به کمبود اکسیژن محیط، و نگهداری آسان‌تر در طی زمان طولانی دارد (۳).

اگرچه ایجاد کشت سلولی اولیه از ماهیان به نظر آسان است و در زمان کوتاهی تولید می‌شود اما مشکلاتی مانند رشد کم و همگنی پایین مابین سلول‌های تولید شده (٤)، آلودگی بالای بافت‌های مورد استفاده (٥)، عدم وجود روش‌های استاندارد در کشت سلولی ماهی، دانش ناکافی درباره مواد مورد نیاز کشت و شرایط فیزیولوژی رشد سلول‌ها (٦)، در تولید سلول از بافت ماهیان وجود دارد.

به‌کارگیری مدل‌های in vitro کشت سلولی به‌دلیل امکان ارزیابی دقیق عمکردهای خاص در محیط‌هایی با شرایط کنترل‌شده در مقایسه با محیط‌های طبیعی و هم‌چنین کاهش اختلاف بین تیمارها جهت مطالعات مختلف، مرسوم گشته است (۷)، در علوم شیلاتی اولین و عمومی‌ترین کاربرد کشت‌های سلولی ماهیان مطالعه بیماری‌های آن‌ها است (۲) و در بسیاری از موارد از تیره‌های سلولی در مطالعه بیماری‌های عفونی و مواد مهارکننده آن‌ها استفاده می‌شود (۸، ۹) و از آن‌جا که پاتوژن‌ها در میزبان خاص و حتی بافت خاص رشد می‌کنند، نیاز به رده‌های سلولی از بافت‌های متنوع مسأله‌ای اجتناب‌ناپذیر است (۱۰).

مهم‌ترین کاربرد کشت‌های سلولی در زمینه بیماری‌های عفونی شامل مطالعه در مورد: مکانیسم بیماری‌زایی، تعاملات میزبان و عامل بیماری‌زا و مکانیسم دفاع میزبان است. بافت‌های متفاوت از گونه‌های متنوع، پاسخ‌های مختلفی را به عفونت در سطح سلول، می‌دهند وتولید رده‌های سلولی گوناگون، مطالعه پاتوژن‌ها را در بافت و ارگان هدف ممکن می‌سازد (۹، ۱۱). در طی سال‌های اخیر رده‌های سلولی متنوعی از آبزیان تولید و گزارش شده است اما بیش‌ترین مطالعات تولید آن‌ها مربوط به ماهیان اقتصادی مانند کپورماهیان و آزاد ماهیان است (۱۲).

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*, Kessler, 1877) از جمله ماهیان رودکوچ و بومی دریای خزر است (۱۳). این زیرگونه، یکی از ۹ زیرگونه قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) است که در بین تمامی زیرگونه‌ها به بزرگ‌ترین اندازه و وزن می‌رسد (١٤). در حال حاضر این ماهی بسیار کمیاب است و به‌طور عمده در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد و برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های استان‌های گیلان، مازندران و گلستان وارد می‌شود (١٥). ماهی آزاد دریای خزر دارای ارزش اکولوژیکی و اقتصادی بالایی است اما جمعیت آن در طی سال‌های گذشته به شدت کاهش پیدا کرده است و در مقایسه با معیارهای اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت، به‌طور بحرانی در معرض خطر می‌باشد (۱۳).

با توجه به بومی بودن این گونه در آب‌های ایران، ارزش اکولوژیکی و اقتصادی آن، تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دریای خزر، امکان فرار این گونه از قفس‌ها و اختلاط با ماهی آزاد دریای خزر و هم‌چنین انتقال بیماری از قزل‌آلای پرورشی به این گونه بومی و مهم به نظر می‌رسد، پژوهش‌های کاربردی برای بررسی و شناخت ابعاد مختلف زیست‌شناختی آن ضروری است. از ماهی آزاد دریا خزر تنها یک رده سلولی و از بافت باله تولید شد است که در بانک سلول‌های جانوری و انسانی مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران نگهداری می‌شود

(۱۶، ۱۷، ۱۸). این مطالعه به منظور امکان‌سنجی ایجاد کشت سلولی اولیه از بافت کلیه و آبشش، شناسایی و توسعه یک رده سلولی جدید از ماهی آزاد دریای خزر انجام شده است.

مواد و روش‌ها

ماهی: ۳۰ عدد ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*, Kessler, 1877) به وزن میانگین ۵۰±۲۰۰ گرم از مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی واقع در تنکابن تهیه شدند و به مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران منتقل و آکواریم تعبیه شده در یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آماده‌سازی و کشت بافت: ماهیان توسط پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش و با ضربه به جمجمه نخاعی شدند. سپس سطح بدن آن‌ها توسط محلول بافر فسفات سالین[1] حاوی آنتی‌بیوتیک (۱۰۰۰ هزار واحد پنی‌سیلین تزریقی، ۱۰۰۰ میکرولیتر جنتامایسین) و الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد، بافت کلیه و آبشش به‌وسیله قیچی و تیغ اسکالپل جدا شده و به لوله آزمایش درب دار حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سالین و آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین به مقدار ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین به مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) منتقل گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفتند، سپس محلول رویی زیر هود تخلیه شد و محلول جدید بافر فسفات سالین حاوی آنتی‌بیوتیک جایگزین آن شد (۱۹).

سپس کلیه و آبشش‌ها به زیر هود منتقل شده و در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت L-15 (شرکت Gibco) به قطعات ۲-۱ mm^2 تقسیم شدند. ۸ قطعه از هر بافت در هر چاهک از ظرف کشت ۶ خانه (شرکت TPP) گذاشته شد و بر روی بافت‌ها لامل قرار گرفت، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 حاوی ۲۰ درصد FBS (شرکت Invitrogen) و ۰/۵ درصد penicillin–streptomycin به هر چاهک ریخته شد و به انکوباتور ۱۸ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. ظرف کشت به مدت یک هفته هر روز از نظر میزان مهاجرت سلول‌ها از بافت کلیه و آبشش آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند. زمانی که سلول‌ها ۷۰ درصد کف چاهک را پوشاند، اولین پاساژ سلول‌ها انجام شد. برای جدا کردن سلول‌ها از کف، ۵۰۰µL آنزیم تریپسین (۰/۰۲ درصد Trypsin-EDTA) (شرکت Invitrogen) به هر چاهک اضافه گردید، بعد از سه دقیقه برای خنثی‌سازی این آنزیم، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی FBS به چاهک‌ها اضافه شد و چندین بار عمل پیپتاژ صورت پذیرفت تا تمام سلول‌ها از کف جدا و به‌مدت ٤ دقیقه (۱۲۰۰rpm) سانتریفیوژ شدند. پلیت سلول تشکیل شده در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به‌صورت سوسپانسیون درآمده و پس از شمارش سلول‌ها به فلاسک کشت منتقل گردید (۱۹).

تعیین زمان دو برابر شدن سلول‌ها (Doubling time): در ابتدا ۵۰۰۰۰ عدد سلول در هر چاهک پلیت ۲٤ خانه کشت شد (سه بار تکرار). سپس هر ٤۸ ساعت یکبار شمارش سلول‌ها صورت گرفت که تا ۱۲ روز ادامه پیدا کرد. میانگین تعداد سلول‌ها در هر ٤۸ ساعت محاسبه و منحنی رشد سلول‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه و رسم گردید (۲۰).

$$X= t \log (2)/ (\log Nt - \log N0)$$

N0 is the inoculums cell number

Nt is the number of cells harvested at a given time point,

t is the culture time in hours

تأثیر FBS بر رشد سلول‌ها: به منظور ارزیابی تأثیر FBS بر رشد سلول‌ها، تعداد ۱۰۰۰۰۰ عدد از سلول‌ها در فلاسک ۱۲/۵ سانتی‌مترمربع کشت گردید و محیط کشت‌هایی با ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد FBS به آن

1- Phosphate-buffered saline

اضافه شد (سه بار تکرار) و به مدت ۷ روز، تعداد سلول‌ها هر ۲٤ ساعت شمارش گردید و منحنی رشد سلول‌ها ترسیم شد (۲۱).

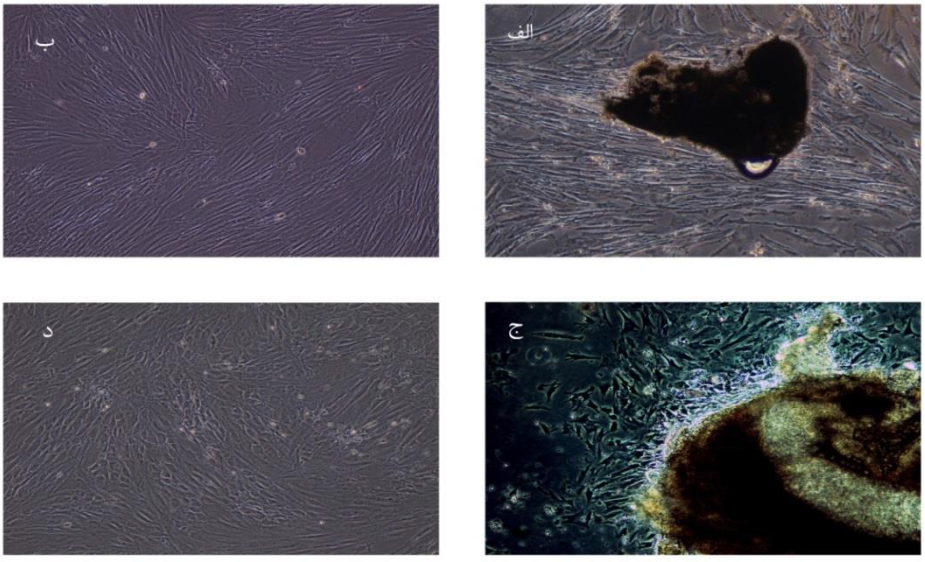
اثر دما: به منظور ارزیابی تأثیر دما بر روند رشد و تکثیر سلول‌ها، تعداد ۱۰۰۰۰۰ عدد سلول در دمای ۱۵، ۱۸ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد در فلاسک ۱۲/۵ سانتی‌مترمربع کشت داده شدند (سه بار تکرار) و در طی ۱۰ روز متوالی روند رشد و تکثیر سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری معکوس و شمارش با استفاده از لام هماسیتومتر به صورت روزانه بررسی شد.

آنالیز آماری: برای انجام آزمون آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

نتایج

کشت سلول: کشت سلول از بافت‌های کلیه، آبشش ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش کاشت ریز بافت[1]، ایجاد شد. سلول‌ها از قطعات بافت آبشش، کلیه و مهاجرت کرده و پس از یک ماه یک لایه تک‌سلولی در کف چاهک تشکیل دادند، مهاجرت سلولی برای بافت آبشش ۷-۵ روز و برای بافت کلیه ۱۲-۷ (شکل ۱) روز پس از کشت بافت شروع شد و پس از ۲۰-۱۵ روز کلونی‌های متعددی از سلول در اطراف ریز بافت‌ها کشت شده دیده شدند. پس از حدود ۲ هفته برای بافت آبشش و حدود ۳ هفته برای بافت‌های و کلیه تک‌لایه سلول در اطراف بافت تشکیل دادند و به تعداد لازم برای پاساژ اول رسیدند.

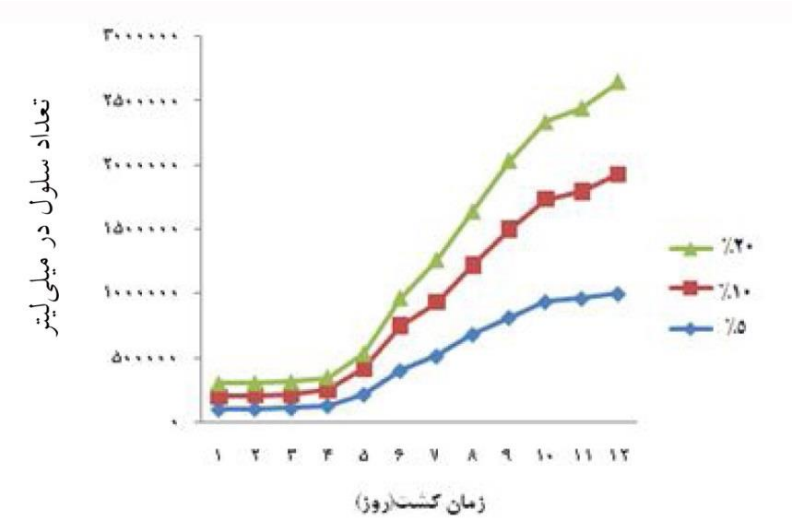
سلول‌های تولید شده در بافت‌های کلیه و آبشش ماهی آزاد دریای خزر (شکل ۱) با استفاده از میکروسکوپ معکوس، از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های تولید شده، در هر دو بافت آبشش و کلیه مخلوطی از سلول‌های اپیتلیالی و فیبروبلاستی شکل بودند. اولین سلول‌های مهاجرت نموده از بافت کلیه و آبشش فیبروبلاستی شکل بودند و سپس سلول‌های اپیتلیایی شکل دیده شدند. بعد از ۵ پاساژ از تعداد سلول‌های اپیتلیالی شکل بافت از کلیه کاسته شد و بیش‌تر جمعیت را سلول‌ها فیبروبلاست شکل تشکیل دادند اما در کشت بافت از آبشش سلول‌های اپیتلیالی شکل غالب بودند.



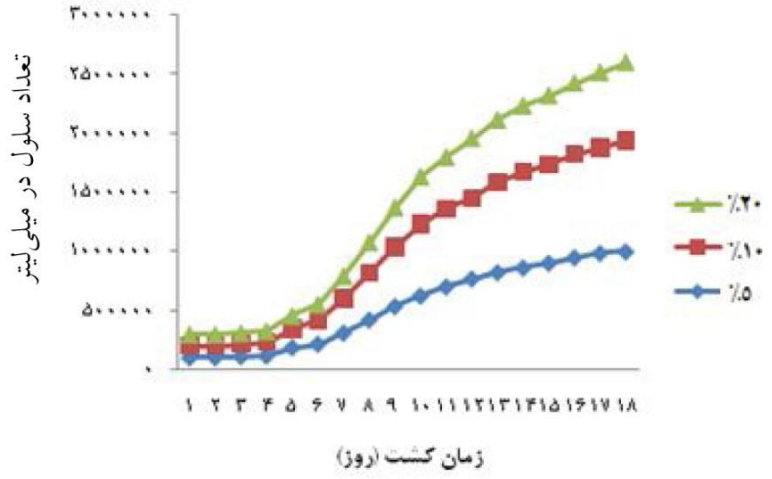
شکل ۱- شکل الف- مهاجرت سلول‌ها از بافت کلیه ۲۰ روز پس از کاشت بافت، شکل ب- سلول‌های کلیه در پاساژ ۵، شکل ج- مهاجرت سلول‌های از بافت آبشش ۸ روز پس از کاشت بافت، شکل د- سلول‌های آبشش در پاساژ ۵ (بزرگنمایی X۱۰).

1- Explant

تأثیر FBS در رشد سلول‌های آبشش و کلیه ماهی آزاد دریای خزر: علاوه‌بر محیط کشت، مواد کامل‌کننده و درصد آن‌ها نقش اساسی در سرعت، میزان و کیفیت رشد سلول‌ها دارند. از مهم‌ترین این مواد سرم جنین گاوی یا FBS است. برای بررسی میزان تأثیر FBS بر مهاجرت و رشد سلول‌ها، سه تیمار ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از FBS در نظر گرفته شد. براساس نتایج به‌دست آمده محیط کشت حاوی ۲۰ درصد از FBS شرایط مساعدتری را برای مهاجرت سلول‌ها از بافت‌های مورد آزمایش فراهم می‌کند و بیش‌ترین رشد در محیط کشت حاوی ۲۰ درصد از FBS صورت گرفت اما تعداد سلول‌ها در ۲۰ درصد FBS و ۱۰ درصد FBS تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و بعد از پاساژ سوم می‌توان این مقدار را به ۱۰ درصد تقلیل داد بدون آن‌که تأثیری در رشد سلول‌های هر دو بافت داشته باشد (شکل‌های ۲ و ۳).



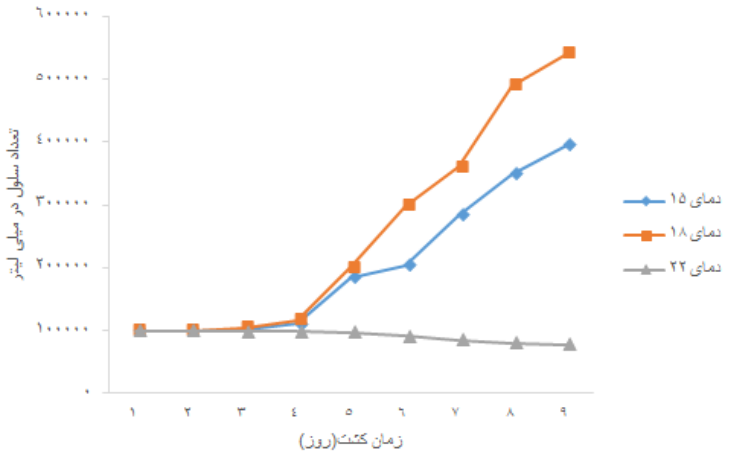
شکل ۲- تأثیر مقادیر متفاوت FBS (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) در رشد سلول‌های آبشش ماهی آزاد دریای خزر.



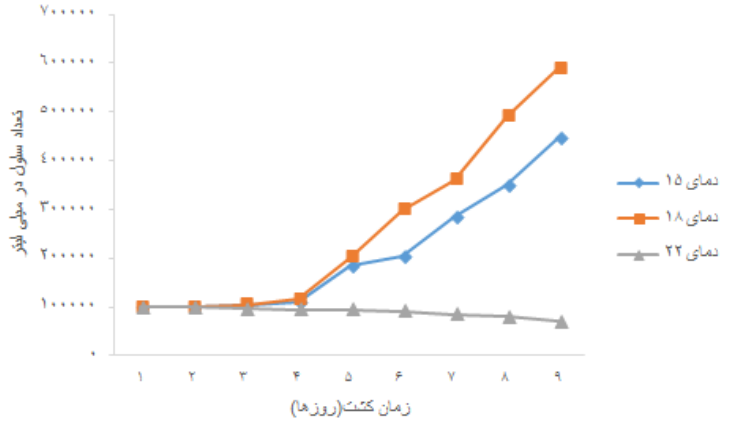
شکل ۳- تأثیر مقادیر متفاوت FBS (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) در رشد سلول‌های کلیه ماهی آزاد دریای خزر.

زمان دو برابر شدن سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر: زمان دو برابر شدن سلول‌ها در پاساژ ۵ برای سلول‌های کلیه ۹۱/۱۷ ساعت و برای سلول‌های آبشش ماهی آزاد دریای خزر ۸۹/۹۰ ساعت طول کشید. مقایسه مابین زمان دو برابر شدن سلول‌های حاصل از آبشش و کلی ماهی آزاد دریای خزر نشان‌دهنده این است که اگرچه سرعت رشد سلول‌های بافت آبشش از بافت کلیه بیش‌تر است اما با هم تفاوت معنی‌داری ندارد.

اثر دما بر رشد تکثیر سلول‌ها: کشت سلولی اولیه شرایط تکثیر سلولی متفاوتی را در دماهای مختلف ۱۵، ۱۸ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد نشان داد. دمای مطلوب برای رسیدن به حداکثر رشد ۱۸ درجه سانتی‌گراد بود و به عنوان دمای مطلوب برای تمام آزمایش‌ها تا پایان کار در نظر گرفته شد. با این‌حال، رشد در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نیز مشاهده شد، با این تفاوت که رشد سلول‌ها در این دما کندتر بود و مدت زمان طولانی‌تری نیاز داشتند تا به تعداد لازم برای پاساژ بعدی برسند. تکثیر سلول‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد ادامه نیافت و از روز سوم به بعد کاهش تعداد سلول‌ها مشاهده گردید (شکل‌های ٤ و ٥). مقایسه بین دماها نشان داد سلول‌ها تولید شده از هر دو بافت کلیه و آبشش در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد دارای بیش‌تری مقادیر تکثیر و رشد بودند و تفاوت معنی‌داری با دماهای ۱۵ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد نشان داد.



شکل ٤- تأثیر دمای ۱۵، ۱۸ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد در رشد سلول‌های آبشش ماهی آزاد دریای خزر.



شکل ٥- تأثیر دمای ۱۵، ۱۸ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد در رشد سلول‌های آبشش ماهی آزاد دریای خزر.

بحث

تعداد رده‌های سلولی تولید شده از ماهیان به علت کاربرد مناسب آن‌ها در سیستم‌های مدل برای مطالعه بیماری ماهیان، ایمونولوژی، زیست فن‌آوری، تغذیه، آزمایش سمیت مواد شیمیایی، عوامل درمانی و... به سرعت در حال افزایش است (۳). کشت ریز بافت یک روش متداول برای تولید سلول‌ها از بافت جانوران است که در بسیاری از پژوهش‌ها به کار می‌رود. کارایی این روش در مطالعات مختلف برای تولید کشت‌ها و رده‌های سلولی از ماهیان گزارش شده است (۲۲).

در این روش نسبت به روش‌های آنزیمی کشت سلولی، قطعات بافت دست‌نخورده هستند و تحت فرآیندهای شدید تفکیک سلولی مکانیکی یا شیمیایی نیستند. این فرآیندها بر ماکرومولکول‌های سطحی تأثیر می‌گذارند و مانع از عملکرد طبیعی آن‌ها می‌شوند (۲۳، ۲٤). از روش کشت ریزبافت برای تهیه تعداد زیادی از رده‌های سلولی از بافت کلیه و آبشش ماهیان استفاده شده است که می‌توان به تولید ۲ رده سلولی از آبشش ماهی (*Salmo salar*) (۲۲)، یک رده سلولی از کلیه ماهی باس دریایی (*Lates calcarifer*) (۲۱)، یک رده سلولی از کلیه ماهی تیلاپیا (۲۵) و یک رده سلولی از کلیه تاس‌ماهی سیبری (*Acipense oxyrinchus*) (۲٦) ۲ رده سلولی از کلیه و آبشش گربه‌ماهی (*Clarias gariepinus*) (۲۷) اشاره نمود.

در طی کشت اولیه بافت آبشش و کلیه ماهی آزاد دریایی خزر، عمده سلول‌های تولید شده در هر دو بافت، سلول‌های فیبروبلاستی و اپیتلیالی شکل بوده است که پس از پاساژهای اولیه تعداد سلول‌های فیبروبلاستی نسبت به سلول‌های اپیتلیالی افزایش پیدا نمود. در روش ریزبافت و در طی پاساژهای اولیه، سلول‌های متنوعی در طول مراحل اولیه رشد سلول دیده می‌شود چرا که این روش اجازه می‌دهد تا هر دو نوع سلول اپیتلیالی و فیبروبلاستی از بافت مهاجرت کنند (۲۸، ۲۹). در مطالعه‌ای که بر روی کشت اولیه کلیه ماهی باس دریایی (*Lates calcarifer*) (۲۱) و ماهی تیلاپیا (۲۵) صورت گرفت هر دو نوع سلول فیبروبلاستی و اپیتلیالی شکل گزارش شد، هم‌چنین نتایج مطالعه، تولید سلول‌های اولیه از آبشش ماهی گروپر (*E. malabaricus*) (۳۰)، ۲ رده سلولی از آبشش ماهی (*Salmo salar*) (۲۲)، ۲ رده سلولی از کلیه و آبشش گربه‌ماهی (*Clarias gariepinus*) (۲۷) نشان داد، سلول‌های اولیه حاصل از بافت آبشش و کلیه دارای دو شکل فیبروبلاستی و اپیتلیالی بودند، که نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌های فوق، با مطالعه حاضر مطابقت داشته است.

مطالعه حاضر نشان داد زمان دو برابر شدن سلول‌های اولیه برای بافت کلیه ۹۱/۱۷ ساعت و برای سلول‌های آبشش ماهی آزاد دریای خزر ۸۹/۹۰ ساعت بوده است. سایر پژوهش‌های صورت گرفته بر روی خانواده آزاد ماهیان نیز بیانگر این نتایج بودند، مطالعه بر روی سه رده سلولی تولید شده از بافت روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شامل رده RTpi-MI (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ٤/٤ روز)، رده RTdi-MI (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ۳ روز) و رده RTgutGC (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ۲/۹) (۳۱)، رده سلولی RTgill-W1 از بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ۱۰-۱۲ روز) (۳۲) و رده سلولی RTL-W1 از بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ۹۸/۸ ساعت) (۳۳)، رده سلولی جنین ماهی شینوک (CHSE- 214) (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ۲/۲ روز)، رده سلولی RTG-2 از بافت گناد قزل‌آلای رنگین‌کمان (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ٤/٦ روز)، رده سلولی RT-Gill W1 از بافت آبشش قزل‌آلای رنگین‌کمان (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ۳/۷ روز)،

رده سلولی RTS-34st از بافت طحال قزل‌آلای رنگین‌کمان (زمان دو برابر شدن سلول‌ها: ۳/۵) (۳٤) زمان دو برابر شدن سلول‌ها را بیش از سه روز نشان دادند که نتایج حاصل از مطالعات فوق با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی دارد.

سرم در سیستم‌های کشت سلولی دارای نقش حیاتی است، زیرا علاوه بر این‌که نفوذپذیری غشای سلولی را تنظیم می‌کند، ناقل چربی‌ها، آنزیم‌ها، عناصر بسیار ریز و عناصر کمیاب به داخل سلول می‌باشد. اغلب سرم جنین گاو (FBS) به عنوان مکمل ضروری برای تکثیر و اتصال سلول‌ها مورد نیاز است (۳۵). FBS حاوی سطح پایین آنتی‌بادی‌ها و سطح بالایی از فاکتورهای رشد است و در کشت‌های سلولی انسانی و حیوانی به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار گرفته است، هم‌چنین فیبرونکتین موجود در سرم نقش مهمی در بهتر چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف کشت و در نتیجه تکثیر آن‌ها ایفا می‌کند (۳۵، ۳٦).

در این پژوهش از مقادیر ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد FBS در محیط کشت سلول‌ها استفاده شد که با افزایش مقدار FBS از ۵ درصد به ۲۰ درصد رشد و تقسیم سلولی تحریک شده و سرعت رشد سلول‌ها افزایش یافت. بیش‌ترین میزان تکثیر سلولی در بافت کلیه و آبشش زمانی محقق شد که ۲۰ درصد حجم محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی بوده است. اما تعداد سلول‌ها در ۲۰ درصد FBS و ۱۰ درصد FBS تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و بعد از پاساژ سوم می‌توان این مقدار را به ۱۰ درصد تقلیل داد، بدون آن‌که تأثیری در رشد سلول‌های بافت آبشش و کلیه داشته باشد.

مطالعات مختلف نشان داد غلظت‌های مختلف FBS تأثیر زیادی در رشد سلول‌های گونه‌های مختلف ماهیان دارد. در کشت سلولی تولید شده از تاس‌ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) (۳۷)، ماهی *Channa striatus* (۳۸)، ماهی *Pterophyllum scalare* (۳۹) ماهی *Oreochromis niloticus* (٤۰) و ماهی *Pangasianodon hypophthalmus* (٤۱) ماهی *Micropterus salmoides* (٤۲) از سرم FBS با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد در محیط کشت استفاده کردند. نتایج به‌دست آمده در این مطالعات نشان داده کم‌ترین میزان رشد در غلظت ۵ درصد و کم‌تر از آن، مقدار بهینه و مطلوب در غلظت‌های بالای ۱۰ درصد و حداکثر سرعت رشد در غلظت ۲۰ درصد به‌دست آمده است (٤۰، ٤۳). معمولاً از غلظت بیش از ۲۰ درصد سرم در محیط کشت استفاده نمی‌شود زیرا شواهدی وجود دارد که غلظت زیاد سرم در محیط کشت ممکن است از رشد سلول‌ها جلوگیری نماید (٤٤، ٤۵) که نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر با یافته‌های حاصل از مطالعات فوق همخوانی داشتند.

دما یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در رشد و تکثیر سلول‌ها در کشت بافت است. انتخاب دمای مناسب برای کشت سلول به نوع، منشأ و دمای بهینه حیات حیوان مورد مطالعه، بستگی دارد (٤٤). کشت‌های سلولی تولید شده از بافت ماهیان قادر به تحمل محدوده دمایی گسترده‌ای هستند که می‌توان با توجه به محدوده دمایی مطلوب رشد و تکثیر سلول‌ها و هدف از کشت آن‌ها، دمای مناسب را تنظیم نمود. در صورتی‌که هدف از کشت سلول نگهداری طولانی در شرایط کشت باشد در کمینه دمای بهینه و چنان‌چه هدف تکثیر سریع سلول‌ها باشد از بیشینه دمای بهینه می‌توان استفاده نمود (۱، ٤٤، ٤٦).

دمای مناسب برای کشت سلول‌های آبشش و کلیه ماهی آزاد دریای خزر در این پژوهش ۱۸-۱۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. طبق نتایج کسب شده در طی شرایط محیط کشت و زمان یکسان، در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد نسبت به دماهای ۱۵ و ۲۲ درجه

سانتی‌گراد، می‌توان به تعداد بیش‌تری سلول از بافت‌های کلیه و آبشش در این گونه دست یافت. به‌طورکلی مطالعات صورت گرفته بر روی کشت‌های سلولی ماهیان نشان می‌دهد دمای مطلوب برای رشد و تکثیر سلول در گونه‌های مختلف ماهیان، اندکی بیش‌تر از دمای بهینه پرورش آن‌ها است (۱، ٤٦). در این مطالعه نیز دمای به‌دست آمده به عنوان دمای بهینه کشت سلولی (۱۸ درجه سانتی‌گراد) اندکی بیش‌تر از دمای پرورش ماهی آزاد دریای خزر (۱۷-۱٤ درجه سانتی‌گراد) است (٤۷، ٤۸). با توجه به مطالعات صورت گرفته بر روی رده‌های سلولی حاصل از گونه‌های مختلف آزاد ماهیان دمای مناسب برای رشد و تکثیر اغلب رده‌ای سلولی این گونه‌ها مابین ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است و دمای بالای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای آن‌ها نامناسب تشخیص داده شده است (٤۹، ۵۰) که نتایج حاصل از این مطالعه با گزارش‌های پژوهش‌های پیشین صورت گرفته، هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه اولین گزارش از تولید کشت سلول اولیه از بافت کلیه و آبشش ماهی آزاد دریای خزر است و ابزار مفیدی را برای مطالعات in vitro بر روی این گونه مهم فراهم می‌نماید. در مجموع با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان بیان کرد، سلول‌های اولیه تولید شده اغلب دارای کندی رشد، میزان کم تکثیر به ویژه در سه هفته اول پس از کاشت بافت هستند. از نظر ریخت‌شناسی به‌طورکلی در بافت کلیه سلول‌های فیبروبلاستی شکل و در بافت آبشش سلول‌های اپیتلیالی شکل غالب هستند. به نظر می‌رسد، روش کشت ریزبافت و محیط کشت L-15 شرایط مناسبی را برای تولید کشت‌های سلولی از این گونه فراهم می‌آورند. مقدار بهینه FBS برای رشد سلول‌های اولیه بافت کلیه و آبشش، بالای ۱۰ درصد است و بهترین رشد سلول‌ها در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد صورت می‌پذیرد.

تشکر و قدردانی

از زنده‌یاد، خانم دکتر پروانه فرزانه ریاست فقید بانک سلول‌های انسانی و جانوری (مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی جهاد دانشگاهی)، استاد مشاور ارجمند در این پژوهش کمال تشکر را دارم، روحشان شاد و قرین رحمت الهی باد.

منابع

1. 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, P., Moon, T.W. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. 17, 43-84.
2. Wolf, K., & Ahne, W. (1982). Fish Cell culture. In Advances in cell culture Vol. 2 (Ed. Maramorosch K), New York Academic Press, 305-328.
3. Goswami, M., Yashwanth, B. S., Trudeau V., & Lakra, W. S. (2022). Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research. *Molecular Biology Reports*. 49, 2393-2411.
4. Bols, N. C., Barlian, A., Chirino-trejo, M., Caldwell, S. J., & Goegan, P. (1994). Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *gills Journal of Fish Diseases*. 17, 601-611.
5. Lakra, W. S., Swaminathan, T. R., & Joy, K. P. (2011). Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review. *Fish Physiology Biochemical*. 37 (1), 1-20.

6.Villena, A. J. (2003). Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture Reviews. *Fish Biology and Fisheries*. 13, 111-140.
7.Lee, J., Park, C., & Park, S. C. (2009). Use of folding modulators to improve heterologous protein production in Escherichia coli Pept. *Science*. 16, 103-109.
8.LaPatra, S. E. (1996). The use of serological techniques for virus surveillance and certification of fish. *Annual review Fish Disease*. 6, 15-28.
9.Menanteau-Ledouble, S., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., & ElMatbouli, M. (2020). Effects of Yersinia ruckeri invasion on the proteome of the Chinook salmon cell line CHSE-214. *Sci. Rep*. 10 (1), 1-9.
10.Lakra, W. S., Swaminathan, T. R., & Joy, K. P. (2011). Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review. *Fish Physiology Biochemical*. 37 (1), 1-20.
11.Fryer, J., & Lannan, C. (1994). Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes. *Methods in Cell Science*, 16 (2), 87-94.
12.Kazanchev, A. N. (1981). Fishes of Caspian Sea and its watershed area, *Iranian Fisheries Organization*, 171 p.
13.Dorafshan, S., Kalbasi, M. R., Pourkazemi, M., Mojazi, Amiri B., & Soltan Karimi, S. (2008). Effects of triploidy on the caspian salmon (*Salmo trutta caspius*) haematology, *Fish Physiology and Biochemistery*, 34, 195-200.
14.Kiabi, B. H., Abdoli, A., & Naderi, M. (1999). Status of the fish fauna in the south Caspian Basin of Iran, *Zoology in the Middle East*, 18, 57-65.
15.Jalali, M. A., & Mojazi Amiri, B. (2009). Threatened fishes of the world: *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877) (Salmoniforms: *Salmonidae*). *Environmental Biology of Fishes*. 86 (3), 375-376.
16.Nowrozi, K., Kolbasi, M., Farzaneh, P., Shahzad Fazelia, A., Farghdan, M., Nasimian, A., Ashouri, S., Mohammadi, S., Muradmand, Z., Farhang-Nia, M., (2013). Production and evaluation of epithelial cell line from Caspian Sea salmon fin tissue. (*Salmo caspius*). *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*. 2 (3), 69-85. [In Persian]
17.Ghodsi, Z., Kolbasi, M., Mohabati Mobarez, A., & Farzane, P. (2018). Antibacterial effects of EC-hepcidin1 polypeptide in inhibiting Streptococcus iniae bacteria in primary cell cultures of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Physiology and Biotechnology*. 7 (4), 8. [In Persian]
18.Ghodsi, Z., Kalbasi, M., Mohabati Mobarez, A., Farzane, P., Beemelmannsd, C., & Amiri Moghaddam, J. (2020). Immunomodulatory function of antimicrobial peptide EC-Hepcidin1 modulates the induction of inflammatory gene expression in primary cells of Caspian Trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish and Shellfish Immunology*. 104, 55-61.
19.Wolf, K., & Quimby, M. C. (1976). Primary monolayer culture of fish cells initiated from minced tissues. *Tissue Culture Association manual*. 2 (4), 445-448.
20.McAteer, J. A., & Davis, J. M. (2002). Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: Basic Cell Culture. Davis, J. M. (Ed.). (2nd Ed.) The Bath Press, Avon, USA. 135-190.
21.Hameed, A. S. et al. (2006). Establishment and characterization of India's first marine fish cell line (SISK) from the kidney of sea bass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 257 (1-4), 92-103.
22.Gjessing, M. C., Aamelfot, M., Batts, W. N., Benestad, S. L., Dale, O. B., & Thoen, E. (2018). Development and characterization of two cell lines from gills of Atlantic salmon. *PLoS ONE* 13(2), e0191792.
23.Hoover, R. L. (1978). Modulations of the cell surface and the effects on cellular interactions. In Cell–Cell Recognition (Curtis, A. S. G., ed.), pp. 221-240. Symposia for the Society for Experimental Biology XXXII. Cambridge: Cambridge University Press.

24. Pisam, M., & Repoch, P. (1976). Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. *Journal of Cell Biology*. 71, 907-920.
25. Wen, C. M. (2016). Development and characterization of a cell line from tilapia head kidney with melanomacrophage characteristics. *Fish & Shellfish Immunology*. 49, 442-449.
26. Grunow, B., Noglick, S., Kruse, M., & Gebert, M. (2011). Isolation of cells from Atlantic sturgeon Acipense oxyrinchus and optimization of culture conditions. *Aquatic Biology*, 14, 67-75.
27. Rathore, G., T Sood, N., & Swaminathan, R. (2001). Primary cell culture from fish gillsand kidney using fish serum. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 936-938.
28. Kamalendra, J., Kapoor, S., Sharma, M., Goswami, G., & Lakra, W. S. (2011). Development of primary culture from gills of Tortor (Hamilton-buchanan), *Indian Journal Animal Science*. 81, 1262-1265.
29. Parameswaran, V., Shukla, R., Bhonde, R. R., & Hameed, A. S. S. (2006). Development of a pluripotent ES-like cell Line from Asian sea bass (*Lates* calcarifer) - an oviparous stem cell line mimicking viviparous ES cells. *Marine Biotechnology*. 9, 766-75.
30. Sohana, K. S., George, K. C., Venkat raviE, 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, 1-6.
31. Pasquariello, R., Verdile, N., Pavlovic, R., Panseri, S., Schirmer, K., Brevini, T. A. L., & Gandolfi, F. (2021). New Stable Cell Lines Derived from the Proximal and Distal Intestine of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Retain Several Properties. *Vivo. Cells*. 10, 1555.
32. Lee, L. E. J., Clemons, J. H., Bechtel, D. G., & Caldwell, S. J. H. (1993). Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biol. Toxicol.* 9, 279-294.
33. Yue, Y., Behra, R., Sigg, L., & Schirmer, K. (2016). Silver nanoparticles inhibit fish gill cell proliferation in protein-free culture medium. Nanotoxicology, 10, 1075-1083.
34. O'Neill-Mehlenbacher, A., Kilemade, M., Elliott, A. J., Mothersill, C., & Seymour, C. (2007). Comparison of direct and bystander effects induced by ionizing radiation in eight fish cell lines. *International Journal of Radiation Biology*, 83 (9), 593-602.
35. Gstraunthaler, G., Lindl, T., & van der Valk, J. (2013). A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. Cytotechnology. 65, 791-3.
36. Fang, CH. Y., Wu, CH. CH., Fang, CH. L., Chen, W., & Chen, CH. (2017). Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PLOS ONE*. 1-27.
37. 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 Fish Biology*. 73, 2058-2067.
38. Sood, N., Chaudhary, D. K., Pradhan, P. K., Verma, D. K., Swaminathan, T. R., Kushwaha, B., Punia, P., & Jena, J. K. (2015). Establishment and characterization of a continuous cell line from thymus of striped snakehead, Channa striatus (Bloch 1793). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 51 (8), 787-796.
39. Swaminathan, T. R., Raj Kumar, P. M. E., Jency, R., Charan, M. U., Syamkrishnan, V. S., Basheer, N., & Sood, J. K. (2016). A new fish cell line derived from the caudal fin of freshwater angelfish Pterophyllum scalare: development and characterization. *Journal of Fish Biology.* 142, 81-88.
40. Swaminathan, R., Thangaraja, B., Ravia, Ch., Kumara, R., Dharmaratnama, A., Saidmuhammeda, V. B., Pradhanb, P. K., & Soodb, N. (2018). Derivation of two tilapia (*Oreochromis niloticus*) cell lines for efficient propagation of Tilapia Lake Virus (TiLV). *Aquaculture*. 492, 206-214.

41. Soni, P., Pradhan, P. K., Swaminathan, T. R., & Sood, N. (2018). Development, characterization and application of a new epithelial cell line from caudal fin of Pangasianodon hypophthalmus (Sauvage 1878). *Acta Tropica*. 182, 215-222.
42. Zeng, W., Dong, H., Chen, X., Bergmann, S., Yang, Y., Wei, X., & Tong, G. (2022). Establishment and characterization of a permanent heart cell line from largemouth bass *Micropterus salmoides* and its application to fish virology and immunology. *Aquaculture*. 547, 737-427.
43. Chen, S. L., Ren, G. C., Sha, Z. X., & Shi, C. Y. (2004). Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder Paralichthys olivaceus for virus isolation. *Diseases of aquatic organism*. 60, 241-246.
44. Freshney, R. I. (2000). Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 4th edition, Wiley-Liss, John Wiley and Sons, Inc. Publ. New York, 577 p.
45. Chen, S. L., & Qin, Q. W. (2011). Theory and Technology of Fishes Cell Culture, Beijing Science Press, 289 p.
46. 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. 1-16.
47. Sayadburani, M., Valipour, A., & Ghasemi, M. (2017). Cultivation of Caspian Sea salmon (*Salmo caspius*) using Caspian Sea salt water from the fingerling stage to the pre-breeding stage. *Journal of Advanced Aquaculture Sciences*, 1 (2), 1-14.
48. Sayad Borani, M., Maqsoodiyeh, H., Sayad Borani, M., Zahtakash Komleh, A., & Walipour, A. (2011). Investigating the possibility of raising Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*) in different densities using Caspian Sea water Aquaculture Development Magazine. 6 (2), 47-61.
49. 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.
50. Wolf, K., & Mann, J. A. (1980). Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro*, 16 (2), 168-179.