# تولید ماهی کایمر حاصل از پیوند درون صفاقی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) به آلوین‌های تازه‌تفریخ‌شده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

**سمانه پورسعید[1]، محمد رضا کلباسی[2*]، سیده نفیسه حسنی[3]، گرو یوشیزاکی[4]، حسین بهاروند[5*]**

1- دانش‌آموخته دکتری، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

2- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

3- استادیار، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

4- استاد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه علوم دریایی و تکنولوژی توکیو، توکیو، ژاپن

5- استاد، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1397/1/16 تاریخ پذیرش: 1397/4/16

*نویسندگان مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir و baharvand@Royaninstitute.org

**چکیده**

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) سلول‌های منحصر به فردی هستند که قادرند اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل کنند؛ ازاین‌رو در تولید کایمرهای بینِ گونه‌ای نقش مهمی بازی می‌کنند. بنابراین، این مطالعه با هدف تولید ماهی کایمر حاصل از پیوند درون صفاقی SSCs ماهی آزاد دریای خزر به آلوین‌های تازه‌تفریخ‌شده قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. سلول‌های اسپرماتوگونی از بافت بیضه ماهی آزاد هشت‌ماهه با روش هضم آنزیمی استخراج شدند. سلول‌ها بعد از جداسازی و رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت غشایی PKH26، به حفره صفاقی آلوین‌های تازه‌تفریخ‌شده قزل‌آلای رنگین‌کمان پیوند شدند. آلوین‌ها 15 و 30 روز پس از پیوند با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. 180 روز پس از پیوند، گناد ماهیان پیوندشده برای آنالیزهای مولکولی استخراج شدند. سلول‌های پیوندشده به سمت گناد در حال تکوین قزل‌آلای رنگین‌کمان مهاجرت و کلون‌زایی کردند. حضور سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر در 41/4درصد از گناد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از PCR تأیید شد. نتایج این مطالعه برای اولین‌بار پیوند موفقیت‌آمیز بینِ گونه‌ای را در قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد. این مطالعه نشان داد که سلول‌های سوماتیک قزل‌آلای رنگین‌کمان قادرند سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر را حمایت کنند. پیوند بین گونه‌ای سلول‌های اسپرماتوگونی دریچه

جدیدی برای حفاظت نژادهای کمیاب و گونه‌های در معرض تهدید گشوده است بنابراین، پیوند SSCs به‌عنوان یک روش کاربردی برای حفاظت ذخایر ژنتیکی این گونهٔ با ارزش پیشنهاد می‌شود.

**کلید واژگان:** سلول بنیادی زایا، Salmonidae، پیوند بین گونه‌ای، کایمر

**مقدمه**

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) یکی از زیرگونه‌های قزل‌آلای قهوه‌ای است که از ارزش اقتصادی و مقبولیت بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر عوامل متعددی از جمله صید بی‌رویه و غیر مجاز، آلودگی دریاها و منابع آبی، ازبین‌رفتن زیستگاه‌ها و مناطق تخم‌ریزی، موانع موجود بر سر راه مهاجرت به هنگام تخم‌ریزی از دریا به رودخانه‌ها و ورود فاضلاب‌های شهری به آب رودخانه‌ها باعث تهدید جمعیت و در مواردی کاهش موفقیت در بازسازی ذخایر این گونه شده است [1-2]. در حال حاضر، بازسازی ذخایر این ماهی ارزشمند صرفاً به صید مولدین از دریا، تکثیر مصنوعی و رهاسازی اسمولت‌ها به رودخانه‌های منتهی به حوضه جنوبی دریای خزر متکی است؛ اما این فعالیت‌ها نیز با مشکلاتی از قبیل بالابودن هزینه صید و نیازهای پرورشی، فرسایش ژنتیکی، کم‌شدن تنوع زیستی، مستعدشدن به عوامل بیماری‌زا و تطابق‌نداشتن با استرس‌های محیط طبیعی روبه‌رو است. بنابراین، یافتن روش‌های جدید برای حفظ ذخایر ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر لازم و ضروری است. در بین روش‌های حفاظتی، انجماد گامت و جنین، روشی مؤثر برای نگهداری طولانی‌مدت ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شود؛ اما به‌رغم پیشرفت‌های انجام‌شده در فناوری انجماد، تا امروز موفقیت چندانی در نگهداری تخم و جنین ماهیان به علت اندازه بزرگ، میزان بالای زرده، ساختار پیچیده و وجود چندین غشاء با نفوذپذیری متفاوت حاصل نشده است [3-5].

امروزه برای حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های در معرض تهدید روش‌های نوین بر پایه سلول توسعه یافته‌اند که در آنها عمدتاً از سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود. سلول‌های بنیادی، گروهی از سلول‌ها هستند که ضمن داشتن عمر طولانی و توانمندی تقسیم به سلول‌های کاملاً مشابه خود (خودنوزایی)، قابلیت تمایز به سلول‌های تخصصی با کارکرد ویژه را نیز دارند [6]. در بدن یک موجود انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی وجود دارد؛ اما چون سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs[1]) تنها سلول‌های بنیادی در موجودات بالغ هستند که قادرند اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل کنند، برای مطالعات پایه‌ای و کاربردی به آنها بسیار توجه شده است [7].

پیوند SSCها و تولید موجود کایمر تکنیکی است که در آن سلول‌های اسپرماتوگونی از بافت بیضه یک حیوان استخراج و به بیضه حیوان عقیم دیگر (به‌عنوان گیرنده پیوند یا میزبان) منتقل و سبب اسپرماتوژنز در حیوان پذیرندهٔ پیوند می‌شود [8]. این تکنیک برای نخستین‌بار در موش گزارش شد، سپس روی گونه‌های جانوری مختلف از جمله رت، همستر، بز، گاو، خوک و میمون نیز با موفقیت به کار گرفته شد [9-11]. به دنبال موفقیت پیوند در موجودات ردهٔ بالاتر، برای اولین‌بار با پیوند SSCهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به آلوین

1. Spermatogonial stem cells

تریپلوئید ماهی آزاد ماسو (*O. masou*) اسپرم و تخمک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در گناد ماهی آزاد ماسو تولید گردید [12]. نتایج این مطالعه نشان داد که SSCها در ماهیان همانند موجودات دیگر قادر هستند بعد از پیوند به گناد در حال تکوین مهاجرت کنند. مطالعات انجام‌شده روی پیوند در گونه‌های مختلف نشان داد که SSCها در ماهیان قابلیت دوگانه دارند و قادرند بسته به جنسیت ژنتیکی ماهی پذیرنده، مسیر اسپرماتوژنز یا اووژنز را طی کنند [12-16].

تاکنون انواع مختلفی از پیوندهای درون‌گونه‌ای [14،17-19] و بینِ گونه‌ای [13،20-23] در ماهیان گزارش شده است که پس از پیوند SSCها، ماهیان میزبان قادر بودند تخمک و اسپرم ماهیانِ دهنده را تولید کنند. انجام چنین مطالعاتی دریچه‌ای جدید برای حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌ها و نژادهای کمیاب و در معرضِ تهدید گشوده است. علاوه بر این، پیوند سلول‌های زایا می‌تواند به تولید مولدین و صنعت آبزی‌پروری کمک کند. بدین‌ترتیب، توانایی نگهداری و تولید ماهیانی با ارزش اقتصادی بالا که امکان نگهداری آنها معمولاً در سیستم‌های بسته به علت اندازه بزرگ، سن بالای بلوغ، حساسیت به انواع دستکاری‌ها و بیماری و همچنین نیازمندی‌های بالای پرورشی، وجود ندارد، با پیوند سلول‌های زایا به گونه‌های اهلی با میزان رشد بالا، سن بلوغ پایین و مقاوم در مقابل انواع استرس‌های معمول مقدور می‌شود [24-26]. تکنیک پیوند همچنین فرصتی مناسب برای گسترش مطالعات جدید در زمینه بیولوژی سلول‌های بنیادی، سنجش پتانسیل بنیادی-بودن سلول‌های بنیادی و تولید حیوانات را تراریخته فراهم می‌کند [24،27].

تاکنون در زمینه به‌کارگیری سلول‌های زایا برای حفاظت ماهیان با ارزش و در معرضِ تهدید ایران مطالعه‌ای انجام نشده است. در این تحقیق اما تلاش می‌شود امکان اولین مورد پیوند بینِ گونه‌ای در ایران، از طریق تولید ماهی کایمر حاصل از پیوند SSCها ماهی آزاد دریای خزر به ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با هدف حفاظت از این گونهٔ ارزشمند دریای خزر بررسی شود.

## مواد و روش‌ها

### گونه مورد مطالعه

در این مطالعه از ماهیان آزاد دریای خزر به‌عنوان گونهٔ دهندهٔ پیوند و از آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوئید به‌عنوان گونهٔ پذیرندهٔ پیوند استفاده شد. آزادماهیان مورد استفاده در این مطالعه از مرکز تکثیر و پروش آزادماهیان شهید باهنر (کلاردشت، مازندران، ایران) تهیه شدند و در پژوهشکده سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان (تهران، ایران) در مخازن پلاستیکی با ظرفیت 200 لیتر با هوادهی دائم نگهداری شدند. طی این دوره دمای آب پیوسته 10 درجه سانتی‌گراد بود. ماهیان تحت شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی قرار گرفتند. به ماهیان غذای تجاری SFT3 (فرادانه، شهرکرد، ایران) با محتوی پروتئین 50%، چربی 15%، خاکستر 13% و رطوبت 11% به صورت دستی یک نوبت در روز غذا داده شد. غذادهی به ماهیان 72 ساعت قبل از شروع آزمایش متوقف شد.

آلوین‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوئید مورد استفاده در این مطالعه از ترکیب اسپرم چهار عدد مولد نر با میانگین وزنی 153/4 ± 1263/3 (میانگین ± خطای استاندارد) گرم با تخمک یک عدد مولد ماده

قزل‌آلای رنگین‌کمان 3270 گرم همراه با شوک گرمایی 28 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه و پس از گذشت 15 دقیقه از عملیات لقاح تولید شدند [ 13، 28- 30]. تخم‌های لقاح‌یافته تا زمان تفریخ در تراف‌ها در کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان درناب (قلعه رودخان، گیلان، ایران) نگهداری شدند و 24 ساعت قبل از تفریخ به پژوهشگاه رویان منتقل شدند. آلوین‌ها در ظروف پلاستیکی با ظرفیت چهار لیتر نگهداری شدند. هوادهی در هر ظرف از طریق سنگ هوا و به طور مستقل انجام شد. دمای آب در زمان نگهداری 10 درجه سانتی‌گراد و وضعیت نور 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی بود. پس از جذب کیسه زرده، غذادهی در پنج نوبت با غذای زنده (ناپلی آرتمیا) و غذای تجاری Nutra (Skretting, Italy) با محتوای پروتئین 58%، چربی 12%، خاکستر 9% و رطوبت 8% در حد سیری به صورت دستی انجام شد. در صورت وجود غذای اضافی در کف ظرف‌ها، فضولات و غذای خورده‌نشده از هر ظرف، روزانه سیفون و خارج شد. سنجش تریپلوئیدبودن ماهیان با اندازه-گیری محتوای DNA سلول‌های خونی انجام شد [29]. بچه‌ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید تصادفی انتخاب و با قطع ساقه دمی نمونه خون تهیه شدند. نمونه‌های خون، مطابق دستورالعمل کیت BD Perm/Wash™ (BD Biosciences, USA) برای آنالیز به‌وسیله دستگاه FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences) آماده شدند. نمونه‌ها قبل از آنالیز، به مدت 30 دقیقه با محلول RNase (100 µg/ml) و سپس 15 دقیقه با رنگ فلورسنت (Propidium Iodide) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. اندازه‌گیری در پژوهشکده سلول‌های بنیادی رویان انجام شد. سپس درصد تریپلوئید بر اساس فرمول زیر محاسبه شد [29]:

100 × (تعداد کل ماهیان مورد بررسی /تعداد ماهیان تریپلوئید) =میزان تریپلوئید (%)

### مطالعه بافت‌شناسی

در این مطالعه، سلول‌های اسپرماتوگونی از 60 عدد ماهی آزاد نر هشت‌ماهه (نابالغ) با میانگین وزنی 1/2 ± 5/4 گرم و طولی 0/6 ± 8/8 سانتی‌متر جدا شدند. میانگین شاخص گنادی این ماهیان نر 0/006± 0/05 درصد بود که مطابق مطالعه Gomez و همکاران، در این شاخص گنادی، بافت بیضه عمدتاً از سلول‌های اسپرماتوگونی تمایزنیافته تشکیل شده است. با وجود این، برای اطمینان‌یافتن از مرحله رسیدگی جنسی و قبل از اینکه سلول جدا شود، روی بافت بیضه این ماهیان مطالعات بافت‌شناسی انجام گرفت. پارامترهای وزنی و طولی به ترتیب با دقت 0/001 گرم و 1میلی-متر اندازه‌گیری شدند.

برای بافت‌شناسی، نمونه بافت بیضه در محلول بوئن به مدت 48 ساعت تثبیت شد. نمونه‌ها پس از آبگیری در الکل‌هایی با درجات مختلف و قالب‌گیری، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت 6 میکرومتر تهیه و با روش هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. تشخیص مرحله گنادی و شناسایی SSCها بر پایه معیارهای ارائه‌شدهٔ Bellaiche و همکاران و Schulz و همکاران انجام شد [31،32]. عکسبرداری از لام‌ها به‌وسیله دوربین DP70 (Olympus, Japan) متصل بر میکروسکوپ نوری BX51 (Olympus, Japan) و با بزرگ‌نمایی 1000 برابر انجام گرفت.

**جداسازی سلول‌های زایا**

برای جداسازی سلول‌ها، ابتدا ماهیان مذکور با دوز بالای روغن گل میخک (40 µl/ml؛ باریج اسانس، کاشان، ایران) بیهوش و سپس کشته شدند و تحت شرایط استریل بافت بیضه آنها استخراج شد. سپس با چندبار شستشو با محلول بافر فسفات (PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین با غلظت 100 واحد به ازای هر میلی‌لیتر، استرپتومایسین با غلظت 100 میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر و جنتامایسین با غلظت 10 میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر)، بافت بیضه به قطعات کوچک تقسیم شدند. برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی از بافت بیضه از روش هضم آنزیمی دومرحله‌ای استفاده شد [19]. در مرحله اول هضم آنزیمی، قطعات بافت با آنزیم کلاژناز نوع IV (Gibco) با غلظت 2 میلی‌گرم در لیتر در دمای 12 درجه سانتی‌گراد به مدت 6 ساعت انکوبه شدند. پس از شستشو با محلول PBS، مرحله دوم هضم آنزیمی با تریپسین 0/25% (Invitrogen) به مدت 30 دقیقه تحت همان شرایط انجام شد. در این هنگام با استفاده از محیط کشت Leibowitz's L-15 ( Sigma-Aldrich; L15) که دارای 10% سرم جنین گوساله ( FBS[1], Hyclone™) بود، آنزیم تریپسین خنثی شد و سپس به منظور جداسازی قطعات هضم‌نشده، از فیلترهای نایلونی با منافذ 40 میکرونی (BD Falcon, USA) عبور داده شد. سوسپانسیون سلولی به مدت 5 دقیقه با دور 300 g در دمای 12 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.

**کشت سلول‌های زایا**

پس از اتمام مراحل هضم آنزیمی، سلول‌ها در محیط کشت مخصوص سلول‌های اسپرماتوگونی (جدول 1) به صورت سوسپانسیون در آمدند و به ظروف کشت 48 خانه پوشش داده شده با ژلاتین 1% منتقل شدند. سپس در انکوباتور در دمای 14 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت کشت داده شدند. برای غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی از روش حذف تمایزی استفاده شد [32]. طی این مدت، تعداد زیادی سلول‌های سوماتیک شامل سلول‌های سرتولی، فیبروبلاستی و میوییدی که تمایل بیشتری برای اتصال دارند به کف ظرف کشت می‌چسبید؛ درحالی‌که SSCs شناور بودند. سلول شناور جمع‌آوری و برای پیوند به آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان رنگ‌آمیزی شدند. با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست CKX41 (Olympus, Philippines) که به دوربین تصویربرداری مدل DP72 (Olympus, Japan) مجهز است، روی سلول‌ها ارزیابی مورفولوژیک انجام شد.

1. Fetal bovine serum

**جدول 1** ترکیبات و غلظت مواد موجود در محیط کشت سلول‌های اسپرماتوگونی

| نام ماده | غلظت نهایی در محیط کشت |
|---|---|
| L-15 | pH=7/8 |
| Hepes (Sigma-Aldrich) | 20mM |
| FBS | %10 |
| Bovine insulin (Sigma-Aldrich) | 25µg/ml |
| Bovine serum albumin(Sigma-Aldrich) | %0/5 |
| MEM non-essential amino acids(Invitrogen) | 10 µl/ml |
| Ascorbic acid(Sigma-Aldrich) | 50µM |
| Adenosine(Sigma-Aldrich) | 200µM |
| GlutaMAX(Invitrogen) | 2 mM |
| 2-mercaptoethanol(Sigma-Aldrich) | 100µM |
| Penicillin (Invitrogen) | 100 U/ml |
| Streptomycin(Invitrogen) | 100 µg/ml |

**نشان‌دارکردن SSCهای ماهی آزاد دریای خزر**

برای ردیابی سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد در آلوین‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از پیوند، ابتدا سلول‌ها با استفاده از رنگ غشایی PKH26 فلورسنت رنگ‌آمیزی شدند. PKH26 یک نشان‌دهنده غیر سمی و چربی دوست است که درون غشای دولایه‌ای سلول پخش می‌شود و به مدت چندین ماه باقی می‌ماند [10]. رنگ‌آمیزی PKH26 مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. درمجموع، سلول‌ها در محلولی حاوی10 µl رنگ PKH26 و 1 ml محلول ایزواسموتیک C به مدت 5 دقیقه در دمای 20 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از دو بار شستشو، در محیط کشت L15 به صورت سوسپانسیون در آمده و تا زمان پیوند روی یخ نگهداری شدند[21]. قبل از پیوند نمونه‌ها رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ فلورسنت مدل TH4-200 (Olympus, Japan) مشاهده و با دوربین DP72 عکسبرداری شدند.

**پیوند SSCهای ماهی آزاد دریای خزر به آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان**

سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر به آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوئید تازه‌تفریخ‌شده پیوند شدند. برای انجام پیوند، ابتدا آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان با تریکائین متان سولفونات (MS-222) با غلظت 75 mg/l (Sigma-Aldrich) بیهوش شدند. برای پیوند از میکروپیپت شیشه‌ای مدل GD-1 (Narishige, Japan) با قطر 60 میکرون استفاده شد. پیوند به کمک دستگاه ریز تزریق CellTram (Eppendorf, Germany) در حفره صفاقی آلوین‌ها انجام گرفت. به ازای هر آلوین، حدوداً 10000 سلول

پیوند شد. پیوند روی 60 آلوین (20 آلوین به ازای هر تکرار) انجام شد [21].

**ارزیابی گناد ماهیِ گیرنده پس از پیوند**

کلون‌زایی سلول‌های نشان‌دارشده با PKH26 در گناد اولیه قزل‌آلای رنگین‌کمان، 15 و 30 روز پس از پیوند با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مدل SXZ16 (Olympus) بررسی شد. همچنین شش ماه پس از پیوند، گناد ماهیان برای ارزیابی‌های مولکولی برداشت و تا زمان استخراج DNA در اتانول مطلق تثبیت شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش نمکی انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز 0/7% ارزیابی شد. برای شناسایی سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر در گناد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پرایمر اختصاصی طراحی شد که صرفاً ناحیه D-Loop ژن میتوکندریایی ماهی آزاد دریای خزر را تکثیر می‌کند. واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) برای DNA مورد نظر با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی ژن D-Loop که با استفاده از نرم‌افزار Oligo (نسخه 7) از ژن میتوکندریایی ماهی آزاد دریای خزر طراحی شد، انجام گرفت (جدول 2). واکنش PCR شامل DNA با غلظت 100 نانوگرم، *Taq* 2x master mix red (Ampliqon, Denmark) با غلظت 1x، 5 pmol از آغازگرهای اختصاصی هر ژن و مابقی تا حجم 20 میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود.

**جدول 2** توالی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های D-Loop و β-actin

| نام آغازگر | شماره دسترسی | توالی آغازگرها | قطعه تکثیر شده (bp) |
|---|---|---|---|
| D-Loop | HM237338.1 | F: 5´-AAGCCGGGCGTTCTTTTATATGCATAAC-3´<br>R: 5´- AGGGTGCTAATGACAGTGGA-3´ | 475 |
| β-actin | EF406272.1 | F: 5´- GATCTGGCATCACACCTTCTAC-3´<br>R: 5´- TCTTCTCCCTGTTGGCTTTG-3´ | 104 |

چرخه حرارتی PCR در 30 چرخه به صورت: 30 ثانیه واسرشت‌سازی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد، 30 ثانیه اتصال در دمای 59 درجه سانتی‌گراد برای ژن D-loop و 60 درجه سانتی‌گراد برای ژن β-actin و مرحله بسط در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه برای ژن D-loop و 30 ثانیه برای ژن β-actin انجام شد. برای تأیید عملکرد واکنش PCR از ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز 2% و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. اندازه محصول با نشانگر 50 bp DNA ladder (GeneRuler) تخمین زده شد. سپس میزان موفقیت پیوند بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

100 × (تعداد کل ماهیان پیوندشده /تعداد ماهیان پیوندشده مثبت برای نشانگر اختصاصی D-loop)= موفقیت پیوند (%)

**بررسی رشد و بازماندگی در ماهیان گیرندهٔ پیوند:**

برای بررسی اثر پیوند درون صفاقی بر رشد و بازماندگی ماهیان، در انتهای آزمایش وزن و طول ماهیان گروه شاهد و پیوندشده به ترتیب با دقت 0/001 گرم و یک میلی‌متر اندازه‌گیری شدند. برای محاسبه درصد زنده‌مانی ماهیان مورد بررسی نیز از فرمول زیر استفاده شد:

100 × (تعداد اولیه ماهیان /تعداد ماهیان زنده)= درصد زنده‌مانی

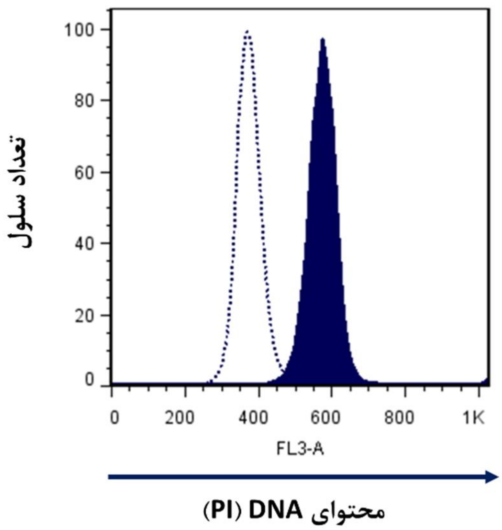
**آنالیز آماری داده‌ها**

از آنالیز t نمونه‌های مستقل (Independent sample t-test) در سطح اطمینان 95% برای مقایسه درصد موفقیت پیوند استفاده شد. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (Chicago, IL, USA, version 15) و برای رسم نمودار از Prism (La Jolla, USA, version 6) استفاده شد. داده‌های درون متن به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SE) بیان شده‌اند.

## نتایج

**ارزیابی سطح پلوئیدی ماهیان گیرندهٔ پیوند**

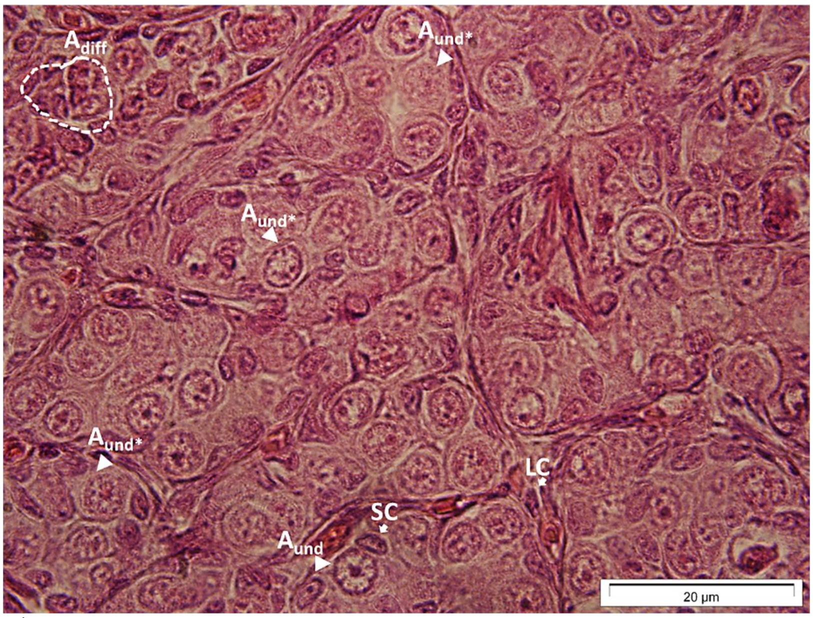
همان‌طورکه ذکر شد از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان ماهیان پذیرنده پیوند استفاده شد. برای عقیم-سازی این ماهیان از شوک حرارتی استفاده شد. تأیید تریپلوئید ماهیان با استفاده از روش فلوسایتومتری انجام پذیرفت (شکل 1). همان‌طور که در نتایج فلوسایتومتری دیده می‌شود در ماهیان دیپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان (گروه کنترل)، موقعیت پیک در کانال 4/1 ± 377 (n=10) قرار داشت. درحالی‌که در ماهیان تریپلوئید این پیک در کانال 6/8 ± 556/7 (n=10) بود که نشان‌دهنده محتوای DNA، 1/5 برابر آنها نسبت به نمونه‌های دیپلوئید است. بر این اساس، میزان تریپلوئید از طریق روش شوک حرارتی 64/29% بود.




**شکل 1** هیستوگرام محتوای **DNA** در ماهیان دیپلوئید (**2n**) و تریپلوئید (**3n**) قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از رنگ‌آمیزی با **PI** (**Propidium iodide**).

**بافت‌شناسی بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر:**

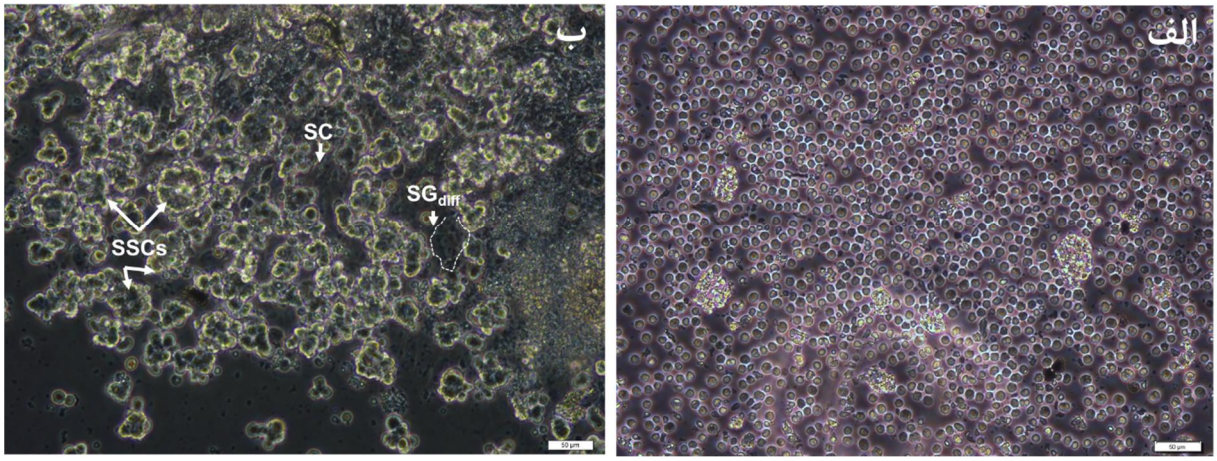
مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر زیر یکسال در محدودهٔ وزنی 7-5 گرم مملو از سلول‌های اسپرماتوگونی تمایزنیافته است. دو نوع اسپرماتوگونی تمایزنیافته A در بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر را می‌توان شناسایی کرد؛ سلول‌های تمایز-نیافته نوع $A_{und*}$ و نوع $A_{und}$ (شکل 2). سلول اسپرماتوگونی تمایزنیافته نوع $A_{und*}$، سلول‌های منفردی بودند که هیچگونه ارتباط سیتوپلاسمی با سلول‌های زایای دیگر نداشتند. به لحاظ ریخت‌شناسی اسپرماتوگونی نوع $A_{und*}$، سلول‌هایی با هسته بزرگ و هتروکروماتین کم و با غشایی چین‌خورده هستند. اسپرماتوگونی تمایزنیافته نوع $A_{und}$ مشابه سلول‌های $A_{und*}$ بودند اما هسته هتروکروماتین بیشتر و غشای منظم‌تر داشت.




**شکل 2** مقطع بافت‌شناسی بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر هشت‌ماهه. $A_{und*}$: اسپرماتوگونی تمایزنیافته نوع $A^*$، $A_{und}$: اسپرماتوگونی تمایزنیافته نوع A، $A_{diff}$: اسپرماتوگونی تمایزیافته نوع A، SC: سلول سرتولی، LC: سلول لیدیگ. بزرگنمایی 1000 برابر. مقیاس 20 میکرومتر.

**جداسازی و کشت کوتاه‌مدت سلول‌های بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر**

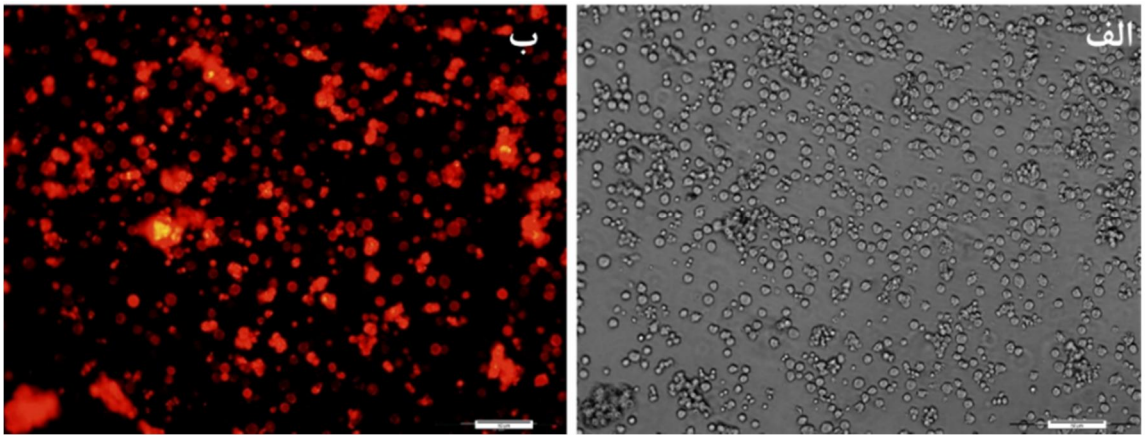
پس از تهیه سوسپانسیون سلولی با روش هضم آنزیمی، میزان بقای سلول‌های تازه‌جداسازی‌شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو 3/7 ± 92/1 درصد بود (شکل 3. الف). برای غنی‌سازی SSCها از روش حذف تمایزی استفاده شد که در آن سلول‌های سوماتیک و تمایزیافته که تمایل بیشتری برای اتصال به ژلاتین را دارند در مدت 48 ساعت به کف ظروف کشت متصل شدند؛ درحالی‌که سلول‌های تمایزنیافته شناور باقی ماندند (شکل 3. ب). سلول‌های شناور، تجمعات سلولی سه-بعدی را تشکیل دادند.




**شکل 3** سلول‌های بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر بعد از هضم آنزیمی (الف) و کشت کوتاه‌مدت (ب). SSCs: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، $SG_{diff}$: سلول‌های اسپرماتوگونی تمایزیافته و SC: سلول سرتولی. بزرگنمایی 200 برابر. مقیاس 50 میکرومتر.

**نشان‌دارکردن SSC های ماهی آزاد دریای خزر**

48 ساعت پس از کشت، اجتماعات سلولی شناور جمع‌آوری و با چندین‌بار پیپتاژ آهسته به سلول‌های منفرد تبدیل شدند. این سلول‌ها با رنگ غشایی PKH26 رنگ‌آمیزی شدند تا پس از پیوند بتوان آنها را ردیابی کرد (شکل 4).

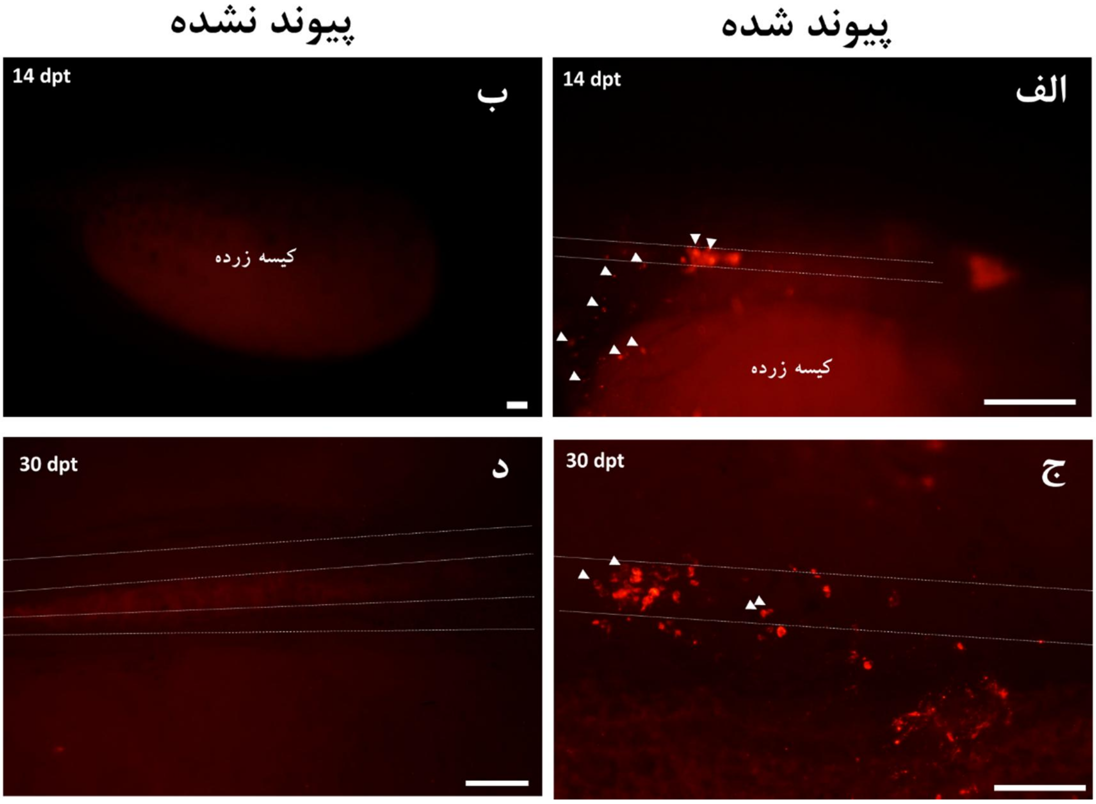



**شکل 4** سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر بعد از رنگ‌آمیزی با PKH26. الف و ب به ترتیب تصاویر فازکنتراست و فلورسنت. بزرگنمایی 200 برابر. مقیاس 50 میکرومتر.

**ارزیابی گناد ماهی گیرنده بعد از پیوند**

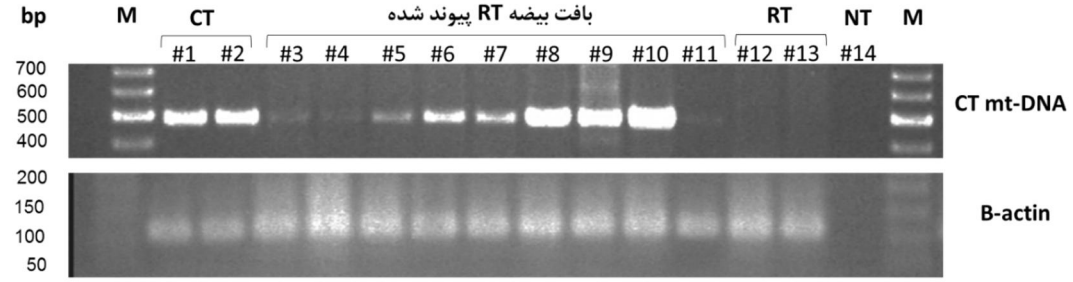
سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر پس از پیوند به حفره صفاقی آلوین‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان قابل ردیابی بودند (شکل 5). سلول‌ها 14 روز پس از پیوند (dpt[1]) از اطراف کیسه زرده به سمت گناد در حال تکوین آلوین‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در حال مهاجرت بودند؛ که این امر نشان‌دهنده ماهیت بنیادی این سلول‌ها است (شکل 5. الف). سلول‌ها، 30 روز پس از پیوند نیز قابل ردیابی بودند و در گناد اولیه کلونزایی (جاگیری) کردند (شکل 5. ج). در گروه شاهد نشانی از سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با PKH26 بود (شکل 5. ب و د).

1. Days post transplantation



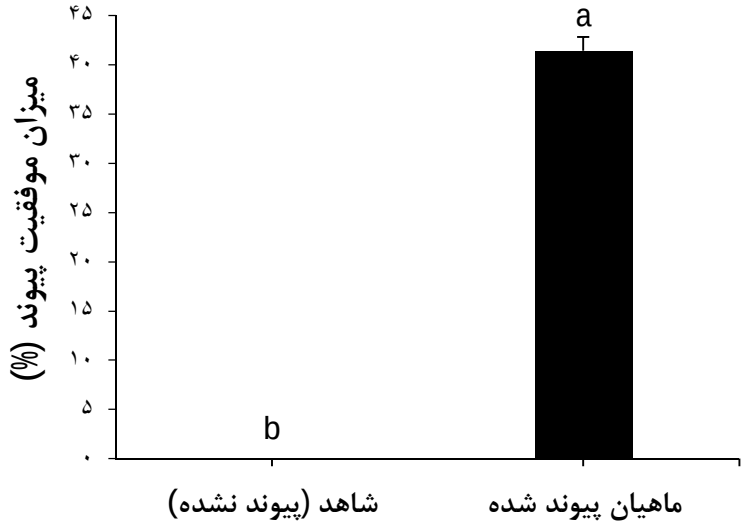

**شکل 5** تصاویر فلورسنت از قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از پیوند. سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر در حال مهاجرت به سمت گناد اولیه قزل‌آلای رنگین‌کمان 14 روز بعد از پیوند (الف) و کلون‌زایی سلول‌ها 30 روز بعد پیوند (ج). سر پیکان نشان‌دهنده سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ماهی آزاد رنگ‌آمیزی‌شده با PKH26. ب و د به ترتیب تصاویر آلوین و گناد قزل‌آلای رنگین‌کمان پیوندنشده. خطوط موازی سفید محدوده گناد را نشان می‌دهد. dpt: نشان‌دهنده تعداد روز بعد از پیوند است. مقیاس 500 میکرومتر.

حضور قطعه D-loop میتوکندریایی ماهی آزاد دریایی خزر، 6 ماه پس از پیوند در گناد قزل‌آلای رنگ کمان با استفاده از الکتروفورز محصولات PCR ثابت شد (شکل 6). در ماهیان پذیرنده پیوند، همانند ماهی آزاد دریای خزر (به‌عنوان گروه کنترل مثبت) قطعه اختصاصی به طول 475 bp را می‌توان مشاهده کرد؛ درحالی‌که در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پیوندنشده (به‌عنوان گروه کنترل منفی) باندی مشاهده نشد. نبود باند در گروه‌های کنترل منفی از اختصاصی‌بودن این آغازگر به‌عنوان یک نشانگر مناسب برای تفکیک دو گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد دریای خزر حکایت می‌کند. تفاوت در شدت باندها در بین ماهیان پذیرنده پیوند نیز می‌تواند از اختلاف در میزان کلون‌زایی سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر در گناد قزل‌آلای رنگین‌کمان حکایت کند. در تمام نمونه‌های مورد بررسی باند β-actin (به‌عنوان ژن کنترل) مشهود بود که این امر نشان‌دهنده عملکرد صحیح واکنش PCR است.




**شکل 6** الکتروفورز محصولات واکنش PCR برای ژن‌های ناحیه D-loop ژنوم میتوکندریایی و β-actin. M: نشانگر وزنی bp 50 مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولاتPCR. شماره 2-1: DNA استخراج شده از بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر (CT) به‌عنوان کنترل مثبت (475 bp). شماره 11-3: DNA استخراج شده از بافت بیضه قزل‌آلای رنگین‌کمان (RT) پس از پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر. شماره 13-12: DNA استخراج-شده از بافت بیضه قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان کنترل منفی. شماره 14: نمونه بدون DNA به‌عنوان کنترل منفی.

کمّی‌سازی آنالیز مولکولی نشان داد که در گناد 41/4 (± 1/43) درصد از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، سلول‌های اسپرمانوگونی ماهی آزاد حضور دارند (شکل 7) که از حضور SSCها در زمان پیوند و حمایت سلول‌های سوماتیک بافت بیضه قزل‌آلای رنگین‌کمان از سلول‌های پیوندشده حکایت می‌کند.




**شکل 7** درصد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر درون گنادشان 6 ماه پس از پیوند (میزان موفقیت پیوند). a و b نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین ماهیان شاهد (n= 30) و پیوند شده (n= 60) است ($P$<0/05).

مقایسه وزن نهایی، طول کل و میزان زنده‌مانی در ماهیان پیوندنشده (گروه شاهد) و پیوندشده از نبود اختلاف معنی‌دار بین آنها حکایت می‌کند (جدول 1؛ $P$ >0/05). درواقع این مقایسه نشان می‌دهد که پیوند درون صفاقی سلول‌ها، اثر منفی روی رشد و بقای ماهی پذیرنده پیوند ندارد.

**جدول 1** مقایسه میانگین وزن، طول کل و بازماندگی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوئید در گروه‌های آزمایشی مختلف پس از شش ماه. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند.

| گروه‌های آزمایشی | وزن نهایی (گرم) | طول کل (سانتی متر) | زنده‌مانی (درصد) |
|---|---|---|---|
| ماهیان پیوندنشده (شاهد) | 1/66 ± 0/20 | 5/73 ± 0/32 | 77/5 ± 2/5 |
| ماهیان پیوندشده | 1/43 ± 0/36 | 5/82 ± 0/37 | 81/67 ± 5 |

**بحث**

مشاهده سلول‌های PKH26 مثبت در گناد قزل‌آلای رنگین‌کمان 30 روز بعد از پیوند و نتایج آنالیزهای مولکولی در بچه ماهیان شش‌ماهه نشان داد که سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر قادر هستند به گناد در حال تکوین مهاجرت و در آنجا کلون‌زایی کنند. در این بررسی، درصد موفقیت پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی 41/4درصد برآورد شد. Okutsu و همکاران با پیوند درون صفاقی سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به ماهی آزاد ماسو نشان دادند که 48% از ماهیان نر ماسو (ماهی میزبان) حامل سلول‌های اسپرماتوگونی قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند که توانستند به اسپرم تمایز یابند [14]. Okutsu و همکاران در مطالعه دیگر نشان دادند که فقط 0/04درصد از سلول‌های اسپرماتوگونی پیوندشده توانایی مهاجرت به سمت گناد و کلون‌زایی را دارند که بیانگر ناهمگون‌بودن جمعیت سلول‌های اسپرماتوگونی تمایزنیافته است[12]. نتایج مشابهی از مطالعه Hamasaki و همکاران روی ماهی بادکنکی حاصل شد؛ آنها نشان دادند که 35% از ماهیان *Takifugu niphobles* (به‌عنوان ماهی گیرنده پیوند) پس از دریافت SSCها قادر بودند اسپرم و تخمک ماهی *T. rubripes* را که در حالت معمول امکان نگهداری آنها در سیستم‌های پرورشی وجود ندارد تولید کنند. آنها با این پیوند توانستند در بازه زمانی کوتاه‌تر و با هزینه‌های پایین‌تر لارو *T. rubripes* را تولید کنند[26].

عوامل متعددی در افزایش راندمان مهاجرت و کلون‌زایی سلول‌های زایا به گناد پذیرنده تأثیر دارند که عبارت‌اند از: الف- تعداد سلول بنیادی اسپرماتوگونی موجود در تعلیق سلولی تا حد امکان زیاد باشد؛ ب- گناد ماهی میزبان تا حد امکان عاری از سلول‌های زایای درونزاد باشد، در عین حال سلول‌های سوماتیک آن سالم باشند تا بتوانند سلول‌های دریافتی را حمایت کنند؛ ج- زمان مناسب پیوند برای تزریق سلول‌ها از ماهی دهنده به ماهی گیرنده؛ و د- قرابت فیلوژنیکی بین ماهی دهنده و پذیرنده پیوند که احتمال رد پیوند را به حداقل برساند.

چون درصد بسیار پایینی از سلول‌های زایا را سلول‌های بنیادی تشکیل می‌دهند، تلاش در جهت خالص‌سازی این سلول‌ها امری مهم در میزان موفقیت پیوند محسوب می‌شود. به دلیل نبود نشانگر اختصاصی، از روش‌های متفاوتی از قبیل حذف تمایزی [33،34]، غلظت[35،19] و جداسازی بر اساس پروتئین‌های غشایی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی [35-36] برای خالص‌سازی SSCها از سایر سلول‌های بافت بیضه استفاده می‌شود. یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای تهیه SSCها با خلوص بالا، استخراج سلول از ماهیان نابالغ و استفاده از روش حذف تمایزی است. بدین‌منظور در این مطالعه سعی شد از ماهی آزاد نر زیر یک سال در محدوده وزنی 5 تا 7 گرم برای استخراج سلول‌های زایا استفاده شود. مطالعات بافت‌شناسی مطابق معیارهایی که Schulz و همکارانش معرفی کردند نشان داد که در این محدوده وزنی اغلب سلول‌های زایا موجود در بافت بیضه را اسپرماتوگونی‌های تمایزنیافته تشکیل می‌دهند[32]. همچنین برای خالص‌کردن بیشتر SSCها جداسازی‌شده مطابق روش حذف تمایزی[33]، سلول‌های به‌دست‌آمده از روش هضم

آنزیمی به مدت 48 ساعت کشت یافتند؛ که در این بازه زمانی سلول‌های سرتولی و سوماتیک به کف ظرف متصل شدند؛ درحالی‌که سلول‌های اسپرماتوگونی شناور ماندند و برای پیوند استفاده شدند. کشت کوتاه‌مدت سلول‌های استخراج‌شده از بافت بیضه علاوه بر غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی، می‌تواند باعث بهبود پروتئین‌های غشایی سلول بعد از هضم آنزیمی نیز شود[37]. هضم آنزیمی که جزء لاینفک فرایند استخراج سلولی محسوب می‌شود، می‌تواند اثرات منفی بر عملکرد پروتئین‌های غشایی داشته باشد و در نتیجه بازدهی پیوند را تحت تأثیر قرار دهد. حضور پروتئین‌هایی غشایی در سطح SSCها در مهاجرت و کلون‌زایی سلول‌ها پس از پیوند نقش مهمی بازی می‌کند. Shikina و همکاران با مطالعه روی سلول‌های اسپرماتوگونی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان کردند که کشت کوتاه‌مدت سلول‌های اسپرماتوگونی بعد از هضم آنزیمی باعث بهبود پروتئین‌های غشای این سلول‌ها می‌شود[37]. این محققان نشان دادند که توانایی مهاجرت و کلون‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از پیوند در گروهی که سلول‌های اسپرماتوگونی بلافاصله بعد از فرایند هضم آنزیمی استفاده شدند، در مقایسه با گروهی که سلول‌ها برای مدت 5 روز کشت یافتند، کمتر است [37].

در این مطالعه به منظور کاهش رد پیوند، از آلوین‌های تازه‌تفریخ‌شده قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان ماهی میزبان برای سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد استفاده شد. در این مرحله جنینی به علت تکامل‌نیافتن سیستم ایمنی احتمال رد پیوند وجود ندارد [38]. علاوه بر این، مطالعات انجام‌شده روی آزادماهیان [12]، هامورماهیان [18]، تون‌ماهیان [21] و گیش‌ماهیان [39] نشان دادند که بازدهی مهاجرت و کلون‌زایی سلول‌های پیوندشده، زمانی افزایش خواهد یافت که این سلول‌ها هم‌زمان با مهاجرت سلول‌های زایای بدوی[1] (PGC) خود ماهی میزبان پیوند شوند. درحقیقت، PGC پیش‌ساز سلول‌های زایا هستند که در مراحل اولیه جنینی از سلول‌های سوماتیک گنادی جدا هستند و بعد از تشکیل در خارج از گناد ، به سمت گناد در حال تکوین مهاجرت می‌کنند [40]. در این مطالعه سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر 14 روز بعد از پیوند به سمت گناد قزل‌آلای رنگین‌کمان در حال مهاجرت بودند و 30 روز بعد از پیوند در گناد کلون‌زایی کرده بودند. در قزل‌آلای رنگین‌کمان که در دمای 10 درجه سانتی‌گراد پرورش یافت، PGCها تقریباً 17 تا 29 روز بعد از لقاح، به سمت گناد در حال تکوین مهاجرت کردند [12]؛ ازاین‌رو، بهترین بازه زمانی برای بررسی مهاجرت سلول‌های پیوندشده، 14 تا 30 روز بعد از لقاح است. درباره مکانیزم نحوه مهاجرت SSCها هنوز اطلاعات کاملی در دسترس نیست؛ اما بیان شده است که مهاجرت و کلون‌زایی این سلول‌ها بعد از پیوند به حفره صفاقی آلوین‌ها همانند PGC از طریق مکانیزم جذب شیمیایی انجام می‌شود [41]. طی این مکانیزم، سلول‌های زایا از طریق گیرنده‌های غشایی (گیرنده-4 کموکاین CXC[2])، سیگنال‌های ارسال‌شده از سلول‌های سوماتیک (فاکتور-1 مشتق از سلول‌های استرومایی[3]) را دریافت و با ایجاد پاهای کاذب به سمت گناد در حال تکوین مهاجرت می‌کنند [37،40-41].

تاکنون نشانگر اختصاصی برای شناسایی SSCها معرفی نشده است. در میان سلول‌های بافت بیضه، چون صرفاً SSCها توانایی مهاجرت به سمت گناد ماهی پذیرنده پیوند را دارند [15]، وجود و تأیید نهایی آنها در سوسپانسون سلولی فقط از طریق پیوند امکان‌پذیر است [31،41 ]. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، سوسپانسیون سلولی به‌دست‌آمده بعد از جداسازی حاوی

1. Primordial germ cells
2 CXC-chemokine receptor 4
3. Stromal cell derived factor-1

SSCها بود. این سلول‌ها شش ماه پس از پیوند در گناد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ماهی آزاد دریای خزر (ناحیه D-loop ژنوم میتوکندریایی) قابل ردیابی بودند. با وجود اینکه حدوداً $1\times10^4$ سلول به هر آلوین قزل‌آلای رنگین پیوند شده بود اما در شدت باند محصول PCR اختلافی مشاهده شد. Silva و همکاران با پیوند SSCها استخراج‌شده از گربه‌ماهی (*Rhamdia quelen*) به تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) نتایج مشابهی گزارش کردند [23]. اختلاف در شدت باند می‌تواند بیانگر تفاوت در میزان کلون‌زایی سلول‌های پیوندشده یا شدت تکثیر SSCها در بافت گناد ماهی میزبان باشد. البته شایان ذکر است که تفاوت‌های ذاتی در ویژگی‌های بافت گناد و سلول‌های سوماتیک ماهی پذیرنده پیوند نیز می‌تواند در میزان کلون‌زایی سلول‌ها مؤثر باشد [37].

درمجموع، نتایج مطالعه پیوند SSCها ماهی آزاد دریای خزر به آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که سلول‌های اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر قادر هستند به گناد در حال تکوین قزل‌آلای رنگین‌کمان مهاجرت کنند و با سلول‌های سوماتیک ماهی میزبان تلفیق شوند. به‌رغم فاصله فیلوژنیک بین این دو گونه، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند میزبانی مناسب برای SSCها ماهی آزاد دریای خزر باشد. بنابراین، پیوند SSCها می‌تواند روشی مناسب برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونهٔ باارزش محسوب شود و باتوجه به بلوغ سریع‌تر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به ماهی آزاد به نظر می‌رسد این شیوه بتواند به دستیابی زودتر تخمک و اسپرم ماهی آزاد و در نتیجه تولید بچه ماهیان آزاد منجر شود.

## قدردانی و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی پژوهشگاه رویان و دانشگاه تربیت مدرس در قالب طرح تحقیقاتی مصوب انجام شده است و نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تقدیر را به عمل می‌آورند. نویسندگان همچنین مراتب تشکر و قدردانی خود را از مدیر کل دفتر بازسازی ذخایر آبزیان آقای مهندس کرمی‌راد، مدیریت و پرسنل مرکز بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت، مدیریت و پرسنل مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل جهت همکاری صمیمانه ابراز می‌کنند.

## منابع

1. Jalali, M. A., and Mojazi Amiri, B. (2009) Threatened fishes of the world: *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877) (Salmoniforms: Salmonidae). *Environ. Biol. Fish.*86, 375-376.

2. Kalbassi, M. R., Abdollahzadeh, E., and Salari-Joo, H. (2012) A review on aquaculture development in Iran. *Ecopersia*.1, 159-178.

3. Chao, N. H., and Liao, I. C. (2001) Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*.197, 161-189.

4. Zhang, T., Rawson, D. M., Pekarsky, I., Blais, I., and Lubzens, E. (2007) *The Fish Oocyte, from Basic Studies to Biotechnological Applications.* Springer, PP 412-432.

5. Robles, V., Cabrita, E., and Herraez, M. P. (2009) Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. *Zebrafish*.6, 281-293.

6. Robey, P. G. (2000) Stem cells near the century mark. *J. Clin. Invest.*105, 1489-1491.

7.Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S., and Yoshizaki, G. (2013) Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1640-1645.

8. Brinster, R. L., and Avarbock, M. R. (1994) Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11303-11307.

9. Dobrinski, I., Avarbock, M. R., and Brinster, R. L. (2000) Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol. Reprod. Dev.*57, 270-279.

10. Honaramooz, A., Megee, S. O., and Dobrinski, I. (2002) Germ cell transplantation in pigs. *Biol. Reprod.*66, 21-28.

11. Honaramooz, A., Behboodi, E., Megee, S. O., Overton, S. A., Galantino-Homer, H., Echelard, Y.,

22. Kise, K., Yoshikawa, H., Sato, M., Tashiro, M., Yazawa, R., Nagasaka, Y., Takeuchi, Y., and Yoshizaki G. (2012) Flow-cytometric isolation and enrichment of teleost type A spermatogonia based on light scattering properties. *Biol. Reprod.*86, 1-12.

23. Silva, M. A., Costa, G. M., Lacerda, S. M., Brandão-Dias, P. F., Kalapothakis, E., Silva Júnior, A. F., Alvarenga, E. R., and França, L. R. (2016) Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. *Gen. Comp. Endocrinol*.230-231, 48-56.

24.Lacerda, S. M., Aponte, P. M., Costa, G. M., Campos-Junior, P. H., Segatelli, T. M., Silva, M. A., and França, L. R. (2012) An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Anim. Reprod.*9, 798-808.

25. Majhi, S. K., Hattori, R. S., Rahman, S. M., and Strüssmann, C. A. (2014) Surrogate Production of Eggs and Sperm by Intrapapillary Transplantation of Germ Cells in Cytoablated Adult Fish. *PLoS ONE*. 9, e95294.

26. Hamasaki, M., Takeuchi, Y., Yazawa, R., Yoshikawa, S., Kadomura, K., Yamada, T., Miyaki, K., Kikuchi, K., and Yoshizaki, G. (2016) Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* offspring from triploid grass puffer *Takifugu niphobles* parents. *Mar. Biotechnol*.19, 579-591.

27. Tonelli, F. M. P., Lacerda, S. M. S. N., Paiva, N. C. O., Lemos, M. S., de Jesus, A. C., Pacheco, F. G., Correa Junior, J. D., Ladeira, L. O., Furtado, C. A., França, L. R., and Resende, R. R. (2016) Efficient and safe gene transfection in fish spermatogonial stem cells using nanomaterials. *RSC. Advance*.6, 52636-52641.

28. Kalbassi, M.R., Bagheri, A., Pourkazemi, M., and Abdolhay, H. (2003) Induction of tetraploidy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by heat shocks. *Iran. J. Fish. Sci*.4, 143-152.

29. Kalbassi, M. R., Dorafshan, S., Pourkazemi, M., and Amiri, B. M. (2009) Triploidy induction in the Caspian salmon, *Salmo trutta caspius*, by heat shock. *J. Appl. Ichthyol*.25, 104-107

30. Azari Takami, Gh., Amini, F., and Kalbassi, M. R. (1997) Induction of triploidy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by thermal shocks. *J. Vet. Res*. 2, 51-59.

31. Bellaiche, J., Jean-Jacques Lareyre, J. J., Cauty, C., Yano, A., Allemand, I., and Le Gac, F. (2014) Spermatogonial stem cell quest: nanos2, marker of a subpopulation of undifferentiated A spermatogonia in trout testis. *Biol. Reprod.*90, 1-14.

and Dobrinsk, I. (2003) Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol. Reprod.*69, 1260-1264.

12. Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki G. (2006) Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2725-2729.

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

14. Okutsu, T., Takeuchi, Y., and Yoshizaki G. (2008) *Fisheries for Global Welfare and Environment*. Terapub, Tokyo, PP 209-219.

15. Yano, A., Suzuki, K., and Yoshizaki G. (2008) Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biol. Reprod.*78, 151-158.

16. Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., and Takeuchi, Y. (2011) Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources, *Comp. Biochem. Physiol.*6D, 55-61

17. Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2007) Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.*74, 207-213.

18. Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M., and Yoshizaki, G. (2009) Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biol. Reprod.*81, 1055-1063.

19. Lacerda, S. M., Batlouni, S. R., Costa, G. M., Segatelli, T. M., Quirino, B. R., Queiroz, B. M., Kalapothakis, E., and França, L. R. (2010) A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PLoS One*.5, e10740.

20. Majhi, S. K., Hattori, R. S., Yokota, M., Watanabe, S., and Strüssmann, C. A. (2009) Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germlines. *PLoS One*.4, 6132.

21. Yazawa, R., Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Kabeya, N., and Yoshizaki, G. (2010) Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells. *Biol. Reprod.*82, 896-904.

32. Schulz, R. W., França, L. R. D., Lareyre, J. J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., and Miura, T. (2010) Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*165, 390-411.

33. Shikina, S., and Yoshizaki, G. (2010) Improved in vitro culture conditions to enhance the survival, mitotic activity, and transplantability of rainbow trout type a spermatogonia. *Biol. Reprod.*83, 268-276.

34. Lacerda, S. M., Costa, G. M., Silva, S. M., Campos-Junior, A. P., Segatelli, T. M., Peixoto, M. T., Resende, R. R., and França, L. R. (2013) Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 95-106.

35. Panda, R. P., Barman, H. K., and Mohapatra, C. (2011) Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for in vitro propagation. *Theriogenology*.76, 241-251.

36. Nagasawa, K., Shikina, S., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2010) Lymphocyte antigen 75 (Ly75/CD205) is a surface marker on mitotic germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.*83, 597-606.

37.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*). *Mol. Reprod. Dev*.80, 763-773.

38.Manning, M. J., and Nakanishi, T. (1996) *The Fish Immune System.* Academic Press, New York, PP 159-205.

39.Bar, I., Smith, A., Bubner, E., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Yazawa, R., Chen, B.N., Cummins, S., and Elizur, A., 2016. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation. *Reprod. Fertil. Dev*. 28, 2051-2064.

40.Raz, E., and Reichman-Fried, M., 2006. Attraction rules: Germ cell migration in zebrafish. *Curr. Opin. Genetics. Dev.*16, 355-359.

41.Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S., and Okutsu, T., 2010. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*.137, 1227-1230.

42.Yeh, J. R., Zhang, X., and Nagano, M. C. (2007) Establishment of a short-term in vitro assay for mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod*.77, 897-904.

# Chimera production by intraperitoneal transplantation of Caspian brown trout (*Salmo caspius*) spermatogonial stem cells into rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevins

**Samaneh Poursaeid[1], Mohammad Reza Kalbassi[2*], Seyedeh Nafiseh Hassani[3], Goro Yoshizaki[4], Hossein Baharvand[5*]**

1. PhD graduate, Fisheries Department, School of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor,Iran.
2. Professor, Fisheries Department, School of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
4. Professor, Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan.
5. Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

Received: 2018/4/5 Accepted:2018/7/7

*Corresponding authors: kalbassi_m@modares.ac.ir & baharvand@Royaninstitute.org

**Abstract**

Spermatogonial stem cells (SSCs) are unique due to their abilities in the transmission of genetic information to the next generation. Thus, they play an important role in the production of interspecies germ line chimeras. The objective of this study was to produce chimera through the intraperitoneal transplantation of Caspian brown trout SSCs into newly-hatched rainbow trout. Spermatogonial cell were isolated from the testes of 8-month-old Caspian brown trout through enzymatic digestion. The cells after isolation and staining with the fluorescent membrane dye PKH26 were intraperitoneally transplanted into triploid rainbow trout hatchlings. At 15 and 30 days after transplantation, the recipients were investigated under a fluorescent microscope. The gonads of recipients were dissected for molecular analysis at 180 days after transplantation. Transplanted spermatogonial cells migrated toward and incorporated into recipient genital ridges. The presence of the Caspian brown trout genetic material was confirmed by PCR in 41.4% of the rainbow trout testes. These results demonstrated for the first time that the interspecies spermatogonial transplantation was successful in rainbow trout. These results revealed that the somatic cells of the rainbow trout gonad can support the colonization and survival of intraperitoneally transplanted cells derived from a fish

species belonging to a different genus. Therefore, the SSCs transplantation can be used as a tool for conservation of Caspian brown trout genetic resources.

**Keywords:** Spermatogonial stem cells, Salmonidae, interspecies transplantation, chimera.