مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، ۳۳-۲۵

تفاوت‌های ماهیانه در فرآیند اسپرماتوژنز در جمعیتی از قورباغه مردابی *Pelophylax ridibundus*

احمد قارزی .Ph.D[1*]، صدیقه اشکاوندی .M.Sc[1]، محسن عباسی .Ph.D[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم آباد
۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ahgharzi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۲

چکیده:

هدف: در این مطالعه فرآیند اسپرماتوژنز در گونه قورباغه مردابی ساکن مخمل‌کوه خرم آباد و تعیین نوع اسپرماتوژنز این گونه بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۴ نمونه قورباغه مردابی نر طی ماه‌های اسفند تا شهریور از منطقه مطالعاتی جمع آوری شد. نمونه‌ها با اندازه‌گیری صفات ریخت سنجی، مریستیک و کلیدهای شناساییبه طریق علمی شناسایی شدند. سپس غده‌های تناسلی آن‌ها خارج و برای تهیه مقاطع بافت شناسی آماده شدند. مقاطع تهیه شده در نهایت از نظر ویژگی‌های بافتی و سه مشخصه کمی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که آزادسازی اسپرم در این گونه طی فروردین ماه شروع شده و تا اواخر تیر ماه ادامه می‌یابد. در این ماه‌ها کیست‌های اسپرماتوژنیک در دیواره لوله‌های اسپرم ساز دیده می‌شوند. فرآیند رها سازی اسپرم طی ماه‌های مرداد و شهریور متوقف و به فاز استراحت خود وارد می‌شود و در این فاصله زمانی کیست‌ها در دیواره لوله‌ها مشاهده نمی‌شوند.در فاصله بین ماه‌های شهریور تا اسفند فاز ترمیمی در لوله‌ها مشاهده می شود بطوریکه تعداد لایه‌های سلول‌های زاینده افزایش می‌یابد. همچنین مطالعات کمی مشخص کرد که در فاصله اسفند ماه تا شهریور قطر لوله‌های منی‌ساز و لایه زاینده ابتدا افزایش و سپس کاهش پیدا می‌کند ولی قطر لومن یک روند متضادی را نسبت به دو مؤلفه فوق نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد فرآیند اسپرماتوژنز در گونه مورد مطالعه به‌شکل پیوسته صورت نمی‌گیرد بلکه فرآیندی نیمه پیوسته یا پیوسته بالقوه است.

واژگان کلیدی: اسپرماتوژنز، بافت شناسی، بیضه، فعالیت چرخه‌ای، دوزیستان

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

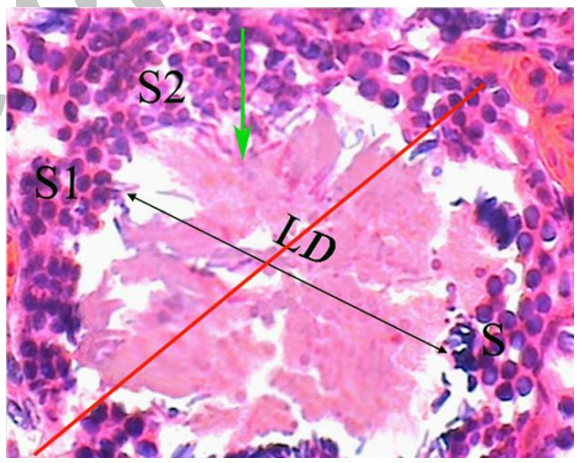
اسپرماتوژنز فرآیند پیچیده‌ای است که در آن سلول‌های زایای تناسلی نر (اسپرماتوگونی) ابتدا به طریق میتوزی تکثیر پیدا کرده، سپس متحمل میوز می‌شوند و متعاقبا به سلول‌های بسیار متحرک اسپرماتوزوئید تمایز پیدا می‌کنند (۱). در بی‌آمنیون ها (ماهیها و در دوزیستان) بیضه شامل لوبول‌ها یا توبول‌هایی است که با کیست‌هایی مفروش می‌گردد و در آن‌جا است که سلول‌های زایا بصورت یک اجتماع واحد مراحل تکامل خود را پشت سر می‌گذرانند. سلول‌های تکامل یافته یا اسپرماتوزوئید سپس از کیست خارج شده و اغلب بصورت واحد که در مواردی شامل سلول‌های سرتولی نیز هست به‌داخل توبول‌های منی ساز رها می‌شوند (۲). همچون اووژنز، فرآیند اسپرماتوژنز نیز در جانوران معمولا به شدت تحت تاثیر شرایط آب و هوایی قرار می‌گیرد و اساسا منطبق با فصل های گرم یا بارانی می‌باشد (۳). بیولوژی تولید مثلی خاص دوزیستان که به آن‌ها امکان ایجاد جمعیت بالا را می‌دهد، می‌توانند بعنوان مدل زیستی مناسبی برای مطالعه اسپرماتوژنز در نظر گرفته شوند. بر مبنای تحقیقات گذشته الگوی تولید مثل در دوزیستان در اقلیم‌های گرمسیری بصورت غیر فصلی یا پیوسته است در حالی‌که در نواحی معتدل که دارای فصول سرد و خشک مشخصی می‌باشند به صورت دوره‌ای یا فصلی انجام می‌گیرد (۴، ۵، ۶، ۷ و ۸). در نواحی معتدل، افزایش فصلی دما به‌عنوان عامل تسهیل کننده برای فعالیت گنادها عمل کرده و زمان فصل تولید مثل را تنظیم می‌کند. در این اقلیم‌ها بارندگی اغلب باعث شروع فصل تولید مثلی می‌شود (۹). با وجود این‌که این الگوی کلی در مورد اکثر گونه‌های دوزیستان بی‌دم ساکن نواحی معتدل صادق است، لیکن تغییر در فاکتورهای دیگر می‌تواند باعث شود که بعضی گونه ها، برای دوره هایی طولانی‌تر یا کوتاه‌تر از آن چیزی که انتظار داریم به فعالیت تولید مثل بپردازند (۱۰ و ۱۱). در کل و با توجه به زیستگاه‌های بسیار متنوعی که دوزیستان در آن سکنی گزیده‌اند و سازگاری‌هایی که در مدت بقا خود در این زیستگاه‌ها کسب نموده‌اند سه تیپ اسپرماتوژنز در بین گونه‌های مختلف دوزیستان دیده می‌شود (۳). تیپ پیوسته: این نوع اسپرماتوژنز در دوزیستان ساکن مناطق گرمسیری یا تروپیکال ظاهر می‌شود، جایی که درجه حرارت محیط، تغییرات فصلی زیادی را نشان نمی‌دهد. تیپ ناپیوسته: در گونه‌های ناحیه معتدل رخ می‌دهد که در آن‌ها تولید اسپرماتوزوئید، محدود به دوره کوتاهی از سال می‌باشد (۵). تیپ نیمه پیوسته یا پیوسته بالقوه: درگونه‌های نواحی معتدل دیده می‌شود. در این تیپ تولید اسپرماتوزوئید در طول ماه های سردتر زمستان قطع می‌شود، ولی با این وجود در این زمان سلول‌های اسپرماتوگونی با سرعتی کند، هنوز تقسیم می‌شوند و تعداد کمی کیست‌های زاینده را تولید می‌کنند (۶، ۹ و۱۲). با توجه به توضیحات مذکور ما در این تحقیق به مطالعه و تعیین تیپ اسپرماتوژنز در گونه *Pelophylax ridibundus* که قبلا با نام *Rana ridibunda* شناخته می‌شد و در منطقه مخمل کوه واقع در حاشیه شهر خرم‌آباد با موقعیت جغرافیایی ۴۸°۳′E و ۳۳°۵′N زیست می‌کند پرداختیم. نظر به اینکه منطقه مورد مطالعه از سمت جنوب حدود ۱۰۰ کیلومتر با استان گرمسیر خوزستان و از سمت شمال غرب حدود ۷۰ کیلومتر با نواحی سردسیر نورآباد فاصله دارد ما بر آن شدیم که مشخص کنیم قورباغه‌های این ناحیه حدواسط از بین این سه تیپ، با چه تیپی از اسپرماتوژنز به سازگاری رسیده‌اند.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۴ نمونه قورباغه نر در طی ماه‌های اوائل اسفند ماه تا اواخر شهریور ماه از منطقه مطالعاتی جمع آوری گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ابتدا نمونه‌ها با استفاده از کلروفرم (مرک آلمان) بی‌هوش و سپس فاکتورهای بیومتریک و مریستیک در مورد آنها اندازه‌گیری و با کمک کلیدهای شناسایی جنس و گونه آن‌ها تعیین گردید. پس از مرگ که با گذاشتن در دیسکاتور حاوی کلروفرم انجام شد، نمونه‌ها روی تشتک تشریح خوابانده شده و بیضه‌های آن‌ها با دقت جدا و خارج گردید. بیضه‌های خارج شده بلافاصله به محلول ۴ درصد (با رقیق کردن محلول تجاری به نسبت ۱ به ۱۰) فرمالین نمکی (مرک، آلمان) با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت تا بافت نمونه‌ها تثبیت گردند. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها برای تهیه مقاطع بافت‌شناسی به‌صورت دستی پاساژ بافت داده شده و توسط پارافین (مرک، آلمان) قالب گیری شدند. با استفاده از میکروتوم دوار (Slee بلژیک) برش‌هایی به ضخامت ۷ میکرومتر از بلوک‌های پارافینی تهیه و سپس برش‌ها با روش هماتوکسیلین و ائوزین (مرک، آلمان) رنگ‌آمیزی شدند. برش‌های رنگ‌آمیزی شده برای مطالعات کمی و کیفی در زیر میکروسکوپ نوری (المپیوس، ژاپن) مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. برای مطالعات کمی با تعبیه یک گراتیکول مدرج در عدسی چشمی میکروسکوپ، پارامترهایی شامل قطر لوله‌های منی‌ساز (TD)، قطر لومن

www.SID.ir
Archive of SID

لوله‌های منی ساز (LD)، و ضخامت لایه زاینده (GL) لوله‌ها اندازه‌گیری شد. در روش اندازه گیری از هر برش به طور تصادفی تعداد ۶ عدد لوله منی‌ساز انتخاب گردید. فاصله بین لایه بافت همبند محصور کننده دو طرف لوله به‌عنوان قطر لوله (TD)، فاصله بین لایه بافت همبند و راس کیست‌های اسپرماتوژنیک بعنوان قطر لایه زاینده (GL) و فاصله بین راس کیست‌های یک طرف لوله با راس کیست‌های طرف مقابل بعنوان قطر لومن لوله (LD) تعریف و اندازه‌گیری شد (شکل ۱). اطلاعات بدست آمده برای آنالیزهای آماری (آزمون آمار توصیفی و آنالیز واریانس در نرم‌افزار SPSS) مورد استفاده قرار گرفتند. در قسمت مطالعات کیفی برش‌های تهیه شده از هر ماه نمونه برداری، برای تشخیص وجود و تراکم سلول‌های اسپرماتوژنیک و کیست‌های اسپرم زا و همچنین وجود و عدم حضور اسپرماتوزوئیدهای بالغ در لومن لوله‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. در ضمن با استفاده از دوربین عکاسی نصب شده بر روی میکروسکوپ از نمونه‌های بافتی در زمان‌های مختلف عکس گرفته شد و تصاویر تهیه شده با استفاده از نرم افزار فتوشاپ مورد پردازش قرار گرفتند.



شکل ۱: ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز در گونه Pelophylax ridibunus یا قورباغه مردابی در ماه شهریور برای معرفی پارامترهای کمی مطالعه شده. خط سیاه دو سر پیکانه معرف قطر لومن لوله (LD)، خط سبز یک سر پیکانه معرف قطر لایه زاینده و خط قرمز بدون پیکان معرف قطر کلی لوله (TD). S, S1, S2 ،کیست‌های اسپرماتوژنیک. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

نتایج

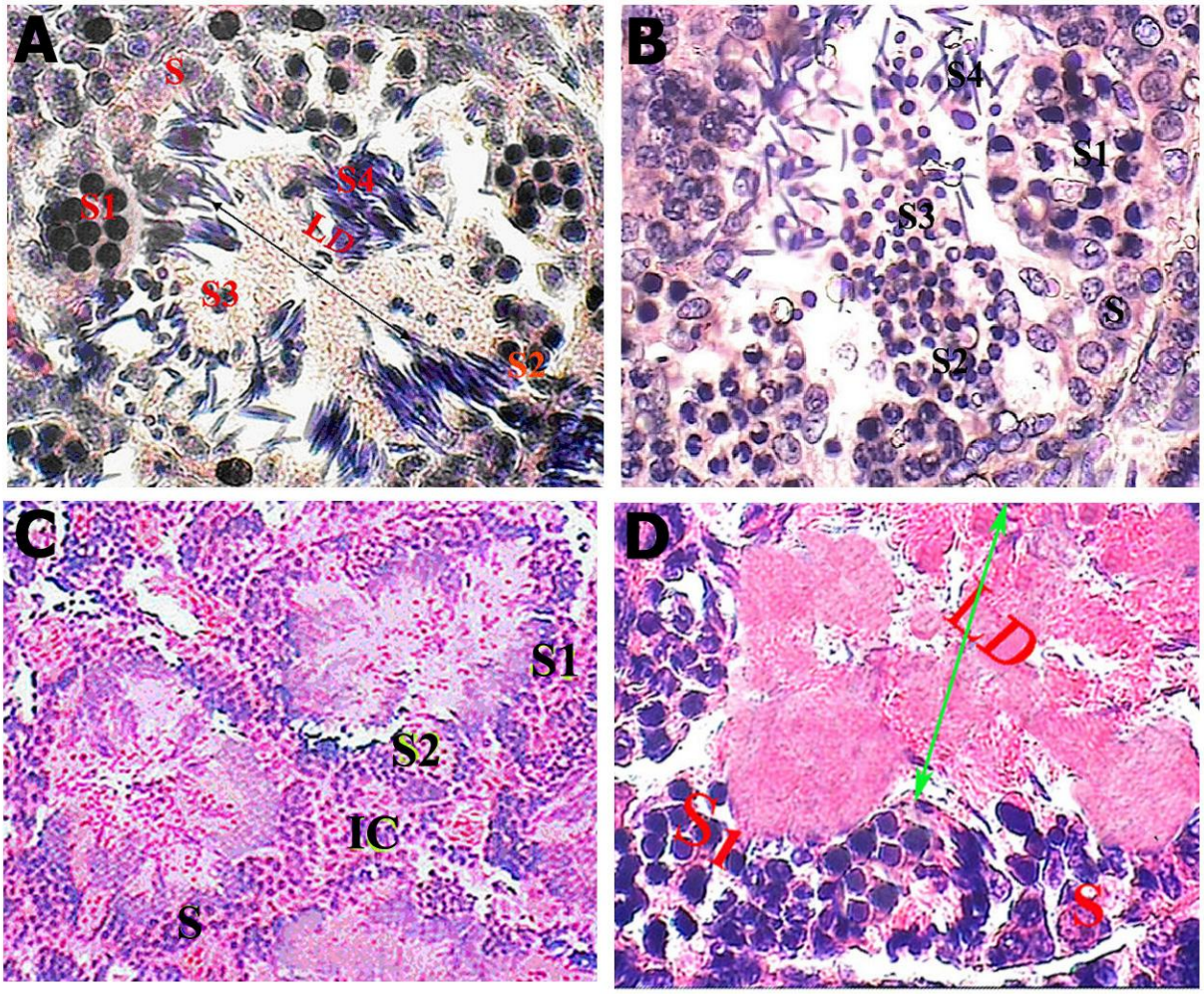
در این گونه، بیضه‌ها به تعداد دو عدد، بصورت اجسام کروی و معمولا به رنگ زرد روشن مشاهده شدند که در داخل حفره شکمی و بالای کلیه قرار گرفته بودند. بافت بیضه از بیرون توسط پرده ای بنام سپیدپرده احاطه شده بود و حاوی تعداد زیادی لوله‌های اسپرم‌ساز (منی ساز) می‌باشد. فاصله بین این لوله‌ها را بافت همبند بینابینی احاطه کرده که در این بافت سلول‌های لیدیگ مشاهده شدند. لوله‌های منی ساز تقریبا در تمام نواحی بافت بیضه به‌صورت به‌هم فشرده دیده شدند. این لوله‌ها در مقطع عرضی به‌صورت مناطق دایره یا بیضی شکل ظاهر می‌گردند هر چند در بعضی از آن‌ها چین‌خوردگی‌هایی در جداره این لوله‌ها دیده می‌شود. لوله‌ها در این گونه توسط لایه‌ای از بافت همبند از هم جدا می‌شوند. طی فصل تولید مثلی در داخل لوله‌های منی‌ساز کیست‌ها یا توده‌های متشکل از سلول‌های اسپرماتوژنیک قابل رویت می‌باشند (شکل ۲A). در بعضی نقاط این کیست‌ها پاره شده و سلول‌های بسیار کوچک اسپرماتید و سلول‌های تاژکدار اسپرماتوزوئید که به داخل لومن لوله‌ها ریخته شده، دیده می‌شوند. در حدفاصل این توده‌ها هسته سلول‌های سرتولی که برای تکوین سلول‌های تناسلی ضروری هستند وجود دارند. قسمت مرکزی لوله‌های منی ساز حاوی توده‌های به‌هم فشرده‌ای از سلول‌های اسپرماتوزوئید بوده که آماده خروج از بیضه از طریق مجاری خارج کننده تناسلی هستند (شکل ۲A).

مقایسه پارامترهای کمی اندازه‌گیری شده (قطر کلی لوله‌ها، قطر لومن و قطر لایه زاینده) در برش‌های بافتی تهیه شده در ماه‌های مختلف سال تغییراتی را در این پارامترها نشان داد به طوری‌که در برش‌های مربوط به ماه فروردین لوله‌های منی‌ساز با میانگین قطر حدود ۶/۶ ±۱۸۸ میکرومتر نسبت به ماه‌های بعد اندازه کمی را نشان می‌دادند (جدول ۱). در این ماه تعدادی کیست‌های سالم و پاره نشده محتوی تعداد فراوانی سلول‌های پیش ساز غیربالغ مشاهده شد؛ بعضی از کیست‌ها پاره شده و اسپرماتوزوئیدهای بالغ شده همراه سلول‌های اسپرماتید مانند در داخل لومن ها دیده می‌شدند. در جدار دیواره لوله‌ها اسپرماتوزوئیدهای بالغ به حالت کشیده و نسبتا پراکنده در کناره‌ها و بصورت خوشه‌ای در مرکز حفره داخلی لوله قرار داشتند (شکل ۲A).

مقاطع بافتی تهیه شده از نمونه‌ها طی سه ماهه اردیبهشت، خرداد و تیر تقریبا ساختار یکسانی را به نمایش می‌گذاشتند (شکل ۲B). در این سه ماه قطر لوله‌ها بطور میانگین هر ماه نسبت به ماه قبل افزایش محسوسی را نشان میداد، به این صورت که این شاخص برای اردیبهشت، خرداد و تیرماه به ترتیب ۹/۶۳±۲۲۵، ۶±۲۵۵ و ۷/۵۳±۲۵۷ میکرومتر اندازه‌گیری شد. در این سه ماه تعداد کیست‌های اسپرماتوژنیک سالم جداره لوله‌ها کاهش بارزی را نشان می‌داد (از متوسط ۷ عدد به ۳ تا ۴

Archive of SID
www.SID.ir

عدد رسیده بودند) و اکثر کیست‌ها پاره شده و اسپرماتوزوئیدهای خود را به لومن آزاد کرده بودند. برخلاف فروردین ماه در این سه ماه اسپرماتوزوئیدها بیشتر به حالت پراکنده و نه خوشه‌ای در لومن لوله‌ها دیده می‌شدند. همچنین در این مدت قطر لایه زاینده بین کیست‌ها نسبت به فروردین کاهشی قابل توجهی را نشان می‌داد (شکل۲B).



شکل ۲: ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز در قورباغه مردابی در ماه‌های فروردین (A)، تیر (B) شهریور (C) و اسفند (D). در ماه فروردین (A) تعدادی از کیست‌های اسپرماتوژنیک سالم‌اند درصورتی‌که برخی دیگر پاره شده و سلول‌های بالغ یا در حال بلوغ را به داخل لوله‌ها آزاد کرده‌اند. اسپرماتوگونی‌ها (S)، کیست‌های اسپرماتوژنیک سالم (S1)، کیست‌های اسپرماتوژنیک پاره شده (S2)، اسپرماتیدها (S3) و اسپرماتوزوئیدهای بالغ (S4). قطر لومن لوله (LD) با خط دو سر پیکان نشان داده شده است. در ماه‌های اردیبهشت –تیر (B) اکثر کیست‌های اسپرماتوژنیک موجود در جداره لوله‌های اسپرم ساز پاره شده و سلول‌های تناسلی خود را به داخل لومن آزاد کرده‌اند، هر چند که هنوز به تعداد اندکی از کیست‌ها بطور سالم در دیواره وجود دارند. اسپرماتوگونی (S)، (S1) کیست سالم، (S2) کیست پاره شده، (S2, S3) سلول‌های تناسلی بالغ یا نزدیک به بالغ شدن. در مرداد ماه (C) در دیواره لوله‌ها، کیست‌ها وجود ندارند بلکه بطور یکنواخت توسط ۳ تا ۴ لایه سلولی پیش‌ساز تناسلی (S, S1, S2) مفروش شده اند. در بین لوله‌ها بافت همبند بینابینی (IC) نسبتا قطوری دیده میشود. در اسفند ماه (D) برجستگی‌های کیست مانند مجددا در دیواره لوله‌ها ظاهر شده، ضمن این‌که مابین این کیست‌ها سلول‌های زاینده تناسلی (S, S1) به صورت چند لایه مشاهده می‌شوند. خط دو سر پیکان قطر لومن لوله (LD) را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین ، بزرگنمایی A، B و D ۴۰۰ برابر و C ۱۰۰ برابر.

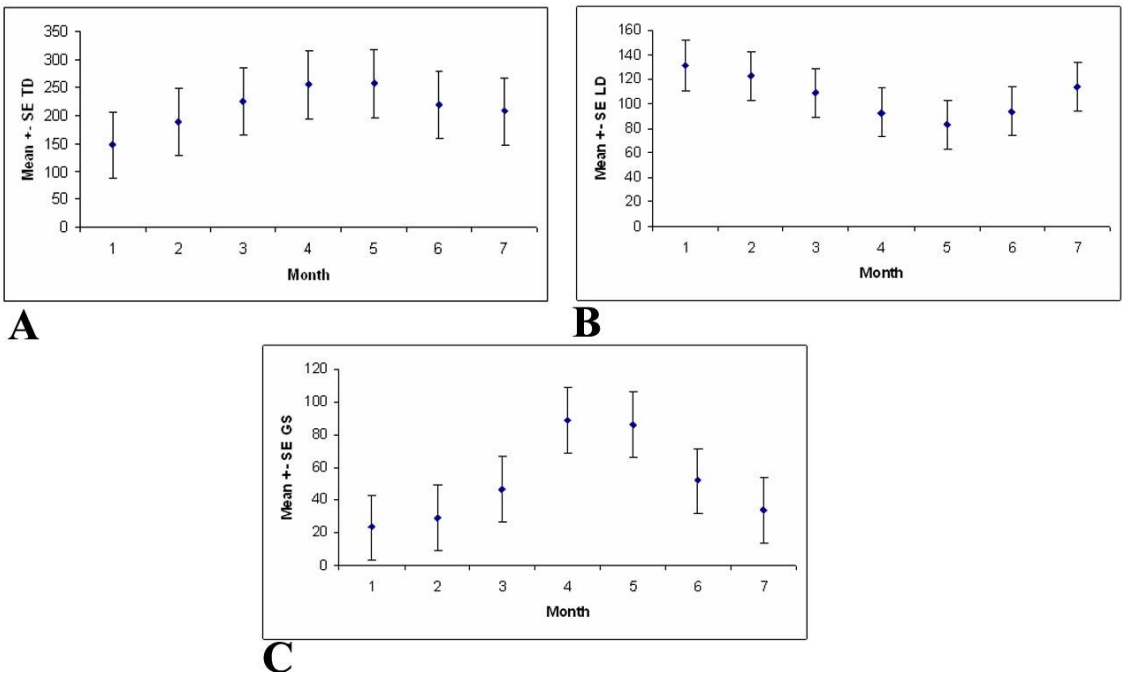
بررسی برش‌های به دست آمده از مرداد (شکل ۲C) و شهریور (شکل ۱) نشان داد که در این دو ماه لوله‌های منی‌ساز از لحاظ بافت شناسی تقریبا واجد خصوصیات یکسانی بودند. در این زمان قطر لوله‌ها نسبت به سه ماهه قبل از آن کاهش مشخصی را نشان می‌داد، به این گونه که میانگین قطر لوله‌ها در مرداد و شهریور به ترتیب عدد ۴/۱۹ ± ۲۱۹ و ۷/۳۱ ± ۲۰۸ میکرومتر را نشان داد. در ماه مرداد کیست‌ها دیگر بصورت مشخص و برجسته در دیواره لوله‌ها مشاهده نمی‌شدند. هر چند که در این

www.SID.ir

زمان به دلیل ناپدید شدن کیست‌ها از ضخامت لایه زاینده (فاصله لایه همبند محصور کننده تا راس کیست‌ها) کاسته شده ولی در کل ضخامت و تعداد ردیف‌های سلولی جداره لوله‌ها به روشنی افزایش پیدا کرده است. به این ترتیب که در ماه‌های قبل فقط ۱ تا ۳ ردیف سلول در بین کیست‌ها مشاهده می‌شد ولی در این دو ماه آخر دیواره لوله‌ها توسط چند ردیف سلولی مفروش می‌گردید. در این دو ماه بر خلاف ماه‌های قبل هیچ اسپرمی درون لومن لوله مشاهده نمی‌شد. در این مرحله بجای اسپرم مایع بی‌شکلی (آمورف) فضای داخلی لوله‌ها را پر کرده بود (شکل ۴). بررسی دقیق‌تر برش‌ها نشان داد که در نمونه‌های شهریور ماه در مقایسه با مرداد برجستگی‌های بسیار کوچکی در بعضی از نقاط لوله‌ها مشاهده می‌شود (شکل ۱) ولی این برجستگی‌ها از نظر اندازه قابل قیاس با کیست‌های ماه‌های فرودین تا اردیبهشت نبودند (شکل ۲A).

جدول ۱: بررسی آمار توصیفی برای سه صفت قطر لوله اسپرم ساز (TD)، قطر لومن لوله (LD) و قطر لایه زاینده (GL) در طول هفت ماه نمونه برداری در قورباغه مردابی (اعداد بر حسب میکرومتر). تعداد داده ها (N)، میانگین (Mean) و خطای استاندارد میانگین(Std. Error of Mean)

Month	N		GL	TD	LD
Esfand	4	Mean	23.25	147.13	131.18
		Std. Error of Mean	2.395	2.39	2.81
Farvardin	6	Mean	29.33	187.85	120.58
		Std Error of Mean	4.80	6.63	7.68
Ordibehesht	7	Mean	46.5	225.45	108.75
		Std. Error of Mean	4.967	9.63	7.77
Khordad	5	Mean	88.775	254.65	92.88
		Std. Error of Mean	7.146	6.08	4.05
Tir	4	Mean	86.125	257.25	83
		Std. Error of Mean	4.404	7.53	2.58
Mordad	4	Mean	51.750	219.38	93.75
		Std. Error of Mean	6.238	4.19	3.77
Shahrivar	4	Mean	34.125	208	113.88
		Std. Error of Mean	3.119	7.31	4.78



نمودار ۱: میانگین و خطای استاندارد قطرکلی (A)، قطر لومن (B) و قطر لایه زاینده (C) لوله‌های اسپرم‌ساز در گونه *Pelophylax ridibunus* در ماه‌های اسفند تا شهریور (۱ تا ۷). اعداد ستون عمودی بر حسب میکرومتر می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود برخلاف قطر کلی لوله‌ها و لایه زاینده که در این فاصله زمانی که ابتدا یک روند افزایشی و سپس کاهشی را نشان می‌دهند، قطر لومن لوله‌ها ابتدا یک روش کاهشی و سپس یک روند افزایشی را نمایان می‌کند. نمودارها با استفاده از آزمون‌های آمار توصیفی و آنالیز واریانس در نرم افزار SPSS16 تهیه شده است.

www.SID.ir

به دلیل ناپدید شدن و یافت نشدن نمونه‌ها در طی ماه‌های مهرماه تا ابتدای اسفند مطالعه وضعیت لوله‌های اسپرم ساز در این فاصله زمانی امکان پذیر نبود، لیکن برش‌های بافتی فراهم آمده در اسفند ماه نشان می‌داد که در این موقع بطور مشخص آثاری از ظهور کیست‌ها در دیواره لوله‌ها دیده می‌شود، به‌طوری‌که آن‌ها نسبت به نواحی بینابینی برجستگی‌هایی را به داخل لومن ایجاد کرده بودند (شکل 2D). در این ماه لوله‌های منی‌ساز کمترین قطر (۲/۳۹ ± ۱۴۷ میکرومتر) را نشان می‌دادند و با وجود برجستگی‌های ایجاد شده توسط کیست‌ها هنوز ضخامت لایه‌های سلولی جداره لوله‌ها کمتر از نمونه‌های فروردین ماه بود.

در تایید مطالعات توصیفی، داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری ۱۸۰ مورد قطر لوله، ضخامت لایه زاینده و قطر لومن در ۳۴ نمونه قورباعه نر نشان داد که در طی ماه های اسفند تا تیر ماه یک روندی افزایشی دراندازه قطر لایه زاینده و قطر لوله اسپرم ساز مشاهده می‌شد، در حالی‌که در همین مدت قطر لومن روند کاهشی را نشان میداد. در طی ماه‌های بعدی (مرداد و شهریور) قطر لوله‌ها کاهش پیدا می‌کرد و این در حالی بود که در این زمان به قطر لومن اضافه می‌شد (جدول ۱ و نمودار ۱).

بحث

اسپرماتوژنز فرآیند پیچیده‌ای است که تحت تاثیر عوامل متعدد و متنوعی قرار می گیرد. مطالعات مولکولی نیز حکایت از پیچیده بودن اسپرماتوژنز می‌کنند بطوری‌که بنظر می‌رسد برنامه‌ای پیچیده برای کنترل بیان ژن در مراحل خاصی از اسپرماتوژنز، از زمان تبدیل سلول لایه زاینده به اسپرماتوسیت و در نهایت به اسپرماتوزوئید وجود دارد (۱۳، ۱۴ و ۱۵). بطورکلی عواملی که کنترل ژنتیکی اسپرماتوژنز را بر عهده دارند به دو دسته اگزوژن و آندوژن طبقه بندی شده‌اند که هر یک بطور مستقیم و یا غیر مستقیم بر روی این فرآیند تاثیرگذار می‌باشند (۱۶). از جمله عوامل اگزوژن که می‌توان آن‌ها را عوامل محیطی نیز نامید، درجه حرارت، رطوبت، طول تابش نور خورشید و ارتفاع می‌باشند: حداکثر و حداقل درجه حرارت هر دو در کنترل این پدیده مهم می‌باشند اما بیشترین تاثیر را درجه حرارت به عهده دارد چرا که حداقل درجه حرارت می تواند کنترل فیزیولوژیکی اسپرماتوژنز را تحت تاثیر قرار دهد (۱۷ و ۱۸). نشان داده شده که طول تابش نور خورشید یا فتوپریود یک عامل مهم در اسپرماتوژنز و انکوباسیون تخم ها در اکثر جانوران مهره‌دار می‌باشد (۱۹، ۲۰ و ۲۱). در مورد خشکی و رطوبت محیط باید اشاره کرد که در برخی نواحی نئوتروپیک و معتدل گرم، زمانی از سال بسیار خشک می‌باشد و زمانی دیگر رطوبت و بارندگی بالا است. در اینجا در دوره زمانی که رطوبت و بارندگی وجود دارد اسپرماتوژنز نیز فعال می شود اما بر عکس در دوره زمانی خشکی، اسپرماتوژنز متوقف می‌گردد (۲۲ و ۲۳). همچنین بر خلاف نواحی گرمسیری در نواحی غیر گرمسیری اسپرماتوژنز تحت تاثیر ارتفاع زیستگاه قرار می‌گیرد. به این صورت که در یک تاکسون نمونه‌هایی که در ارتفاعات زیست می کنند اسپرماتوژنز دیرتر از نمونه های نواحی پست آغاز می‌گردد (۲۴).

به طور کلی، بارندگی و دما، تنها فاکتورهای محیطی می‌باشند که روی چرخه اسپرماتوژنزی اثر دائمی (ثابت) می‌گذارند، اگرچه فتوپریود ممکن است در بعضی گونه‌ها اسپرماتوژنز را تحت تاثیر قرار دهد. در دوزیستان نور هیچ تاثیر مشخصی روی اسپرماتوژنز ندارد. فعالیت های تولیدمثلی بعضی از دوزیستان به میزان زیادی به نوسانات محیطی حساس می باشند، از این‌رو بسیاری از آن‌ها، سیکل بیضه‌ای فصلی را به طور برجسته‌ای نشان می‌دهند (۲۵، ۲۶ و ۲۷).

از جمله عوامل آندوژن یا فاکتورهای فیزیولوژیکی می‌توان به هورمون‌های استروئیدی سیستم عصبی و ذخیره چربی اشاره نمود. هر کدام از این عوامل ذکر شده باعث تغییر در فرآیند اسپرماتوژنز تاکسون‌های مختلف می‌گردند (۲۸، ۲۹، ۳۰ و ۳۱).

تنوع مدل‌های تولیدمثلی که توسط دوزیستان استفاده می‌شود، اساسا بیشتر از انواع یافت شده در دیگر گروه‌های مهره داران خصوصا آمنیون‌داران می‌باشد. در این میان مدل‌های تولیدمثلی و استراتژی‌های بین هر سه گروه (بی دم، دم دار و بدون دست و پا) و در بعضی موارد درون سه گروه دوزیستان اغلب کاملا متفاوت می‌باشند. بر عکس سمندرها و دوزیستان بدون دست و پا، به طور ویژه‌ای دوزیستان بی‌دم، از روش لقاح خارجی استفاده می‌کنند که خود تحت کنترل عوامل محیطی و آندوکرینی می‌باشد (۳ و ۵).

برخلاف آمنیون‌داران که در آن‌ها بیضه از لوله‌های اسپرم ساز با یک اپی‌تلیوم زاینده دائمی تشکیل می‌شود در دوزیستان در دیواره این لوله‌ها کیست‌های اسپرماتوژنز وجود دارد که سلول‌های موجود در آن به طور هماهنگ روند تکوین خود را طی کرده و در نهایت به صورت یک مجموعه واحد به داخل لومن لوله آزاد می‌شوند. همچنین در دوزیستان بر خلاف بیشتر

Archive of SID
www.SID.ir

رده‌های مهره‌داران که در آنها اسپرماتوژنز دائمی است همچون برخی از خزندگان بسته به شرایط آب و هوایی از این فرآیند سه تیپ مشخص پیوسته، ناپیوسته و نیمه ناپیوسته (پیوسته بالقوه) در بین جمعیت‌های مختلف دیده می‌شود (۳۲و ۳۳). تیپ پیوسته در گونه های مربوط به مناطق با عرض های جغرافیایی بالا و مناطق گرمسیری بروز می‌کند (۳۴ و ۳۵). گونه‌های ساکن مناطق معتدل سد از تیپ اسپرماتوژنز ناپیوسته استفاده می‌کنند. در این گروه این فرآیند در طول زمستان خوابی متوقف شده لیکن این جریان متعاقب فصل تولیدمثلی از سر گرفته می‌شود. بسیاری از گونه‌ها از جمله: *Rana esculenta*، *Rana graeca*، *Rana lastei*، *Rana iberica*، *Hyla Japonica* و *Rana catesbeiana* اسپرماتوژنز ناپیوسته را به نمایش می‌گذارند (۲۶، ۳۶ و ۳۷). با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق مشخص شد که گونه *Pelophylax ridibunu* ساکن منطقه مخمل کوه خرم آباد با تیپ اسپرماتوژنز حدواسط یعنی نیمه ناپیوسته یا پیوسته بالقوه سازگار یافته است. از ویژگی‌های تیپ مذکور این است که در فصول توقف تولید و رهاسازی اسپرم روند ترمیمی در سلول‌های زاینده دیواره لوله‌های اسپرم ساز رخ می‌دهد. نتایج این بررسی نشان داد که در طی ماه‌های مرداد ماه و شهریور که مصادف با پایان دوره آزادسازی اسپرم است دیواره لوله‌ها فاقد کیست‌های اسپرماتوزنیک است و حاوی سلول‌های تقریبا پراکنده‌ای است (شکل 2C)، ولی در شروع فصل بعدی اسپرماتوژنز که از اسفند ماه شروع می‌شود در دیواره این لوله‌ها سلول‌ها تراکم بیشتری داشته و کیست‌ها بطور مشخص دیده می‌شوند (شکل 2D). همچنین در اسفند ماه سلول‌های موجود در دیواره لوله‌ها فقط شامل سلول‌های مراحل اولیه اسپرماتوژنز (اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه) بودند در حالی‌که در ماه‌های خرداد تا مرداد بخش قابل توجهی از سلول‌های دیواره لوله‌ها را سلول‌های مراحل انتهایی اسپرماتوژنز (اسپرماتید و اسپرماتوزوئید) تشکیل می‌دادند. این تغییر بیانگر این واقعیت است که هرچند در طی ماه‌های سرد پائیز و زمستان اسپرمی آزاد نمی‌شود ولی در طی این مدت سلول‌های پیش ساز تناسلی تقسیم شده و جمعیت بزرگی از زاده‌ها را ایجاد کرده‌اند که آماده‌اند مراحل نهایی تکوین خود را در فصل تولید مثلی پیش رو تکمیل کنند. از این‌رو به نظر می‌رسد این جمعیت از گونه *Pelophylax ridibundus* که در مخمل کوه خرم آباد زندگی می‌کنند از نظر اسپرماتوژنز همان تیپی را نشان می‌دهند که در گونه‌های *Rana sculenta* و *Rana epeirotica* گزارش شده است. همچنین گزارش شده است که جمعیتی دیگری از همین گونه *Rana ridibunda* (*Pelophylax ridibundus*) که در شمال یونان زیست می‌کند، می‌تواند به طریق پیوسته بالقوه اسپرماتوژنز را بانجام رسانند (۳۸). مطالعات نشان داده که در این گونه در فاصله زمانی قبل از زمستان خوابی (شهریور-آبان ماه) بدلیل کاهش فعالیت تولید مثلی، بخشی از چربی موجود در اجسام چربی به سایر متابولیت‌ها تبدیل می‌شود به طوری‌که در این مدت غلظت این متابولیت‌ها افزایش پیدا کرده ولی در شروع فصل تولید مثل (اواخر بهمن و اوائل اسفند) به دلیل افزایش بیش از حد فعالیتهای مرتبط با اسپرماتوژنز تبدیل چربی به سایر متابولیت‌ها به حداقل میزان خود رسیده و حداکثر انرژی ممکن صرف این پروسه می‌گردد (۳۸). باید توجه داشت که وجود تیپ پیوسته بالقوه در اسپرماتوژنز قورباغه مردابی ساکن مخمل کوه به خوبی با شرایط این منطقه سازگاری دارد چراکه درجه حرارت این ناحیه در زمستان به اندازه مناطق شمالی تر سرد و طاقت فرسا نیست که هرگونه فعالیت زیستی در آن غیر ممکن باشد و از طرفی نیز آن‌چنان گرم نیست که قورباغه بتواند همچون فصول گرم سال در طی زمستان نیز به فعالیت‌های زیستی خود با همان سرعت فصول گرم ادامه دهد. تیپ اسپرماتوژنز پیوسته بالقوه در گونه های دیگری از موجودات خون‌سرد این منطقه نیز مشاهده می‌شود. گزارش شده که سوسمار *Ophisops elegans* یا سوسمار چشم ماری که بومی زاگرس مرکزی است و به فراوانی در جنگلهای بلوط اطراف خرم آباد دیده می‌شود به شیوه پیوسته بالقوه اسپرماتوژنز خود را به انجام می‌رساند، به این ترتیب که دارای یک فاز فعال، یک فاز ترمیمی و یک فاز غیرفعال در روند اسپرماتوژنز است (۳۹). در نتیجه به‌نظر می‌رسد موجودات خون‌سرد ساکن این نواحی در طی تکامل خود با این شیوه سازگاری یافته اند. این نتایج قویا تایید می‌کند که شرایط آب و هوایی و جغرافیایی دو فاکتور مهمی است که زمان و چرخه اسپرماتوژنز را در موجودات کنترل می‌کند.

گونه قورباغه مردابی در ایران پراکنش گسترده‌ای دارد ولی متاسفانه تاکنون مطالعه‌ای روی این جنبه از بیولوژی آن در سایر مناطق انجام نگرفته و از این‌رو مشخص نیست که آیا این گونه در تمام نقاط ایران از چنین استراتژی در اسپرماتوژنز خود استفاده می‌کند یا خیر. امید می‌رود که در آینده چنین مطالعه‌ای در سایر مناطق نیز صورت گیرد تا در این رابطه شناخت بهتر و دقیق‌تری حاصل گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه در گونه ساکن مخمل کوه خرم آباد، مشخص شد که روند تولید اسپرماتوزوئید از اوائل اسفند ماه شروع و تا حدود تیرماه ماه ادامه ادامه پیدا می‌کند. در طی ماه‌های مرداد و شهریور یک حالت استراحت و سکون در روند اسپرماتوژنز وجود دارد و در فاصله زمانی مهر تا بهمن ماه فعالیت‌های ترمیمی به هدف تامین خزانه‌ای از سلول‌های اسپرماتوژنیک برای فصل تولید مثلی بعدی صورت می‌گیرد. بنابراین در این گونه اسپرماتوژنز از نوع پیوسته بالقوه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیریت دانشگاه لرستان به‌ویژه گروه زیست‌شناسی به دلیل حمایت‌های بی دریغ برای انجام این تحقیق صمیمانه تشکر می‌گردد.

منابع

1. Gribins KM. Reptilian spermatogenesis, a histological and ultrastructural perspective. Spermatogenesis. 2011; 1(3): 250-269.

2. Yamamoto T, Hikino T, Nakayama Y, Shine RG. Lchi abé. Newt RAD51: Cloning of cDNA and analysis of gene expression during spermatogenesis. Develop. Growth Differ. 1999; 41: 401-406.

3. Lofts B. Physiology of the Amphibia, New York and London; volume II, Academic press. 1974; 2: 107-218.

4. Sasso-Cerri S, Sergio-Cerri P, Freymuller E, Miraglia SM. Apoptosis during the seasonal spermatogenic cycle of *Rana catesbeiana*. J. Anatomy. 2006; 209: 21-29.

5. Wake MH. The spermatogenic cycle of *Dermophis mexicans* (Amphibia, Gymnophiona). J. Anatomy. 1995 29(1): 119-122.

6. Rastogi RK, Iela L, Saxena PK, Chieffi G. The control of spermatogenesis in the green frog *Rana esculenta*. J.Exp.Zool.1976; 196: 151-166.

7. Basu SL. Effect of testosterone and esterogen on spermatogenesis in *Rana hexadactyla* lesson. J. Exp. Zool. 1968; 169(2): 133-141.

8. Basu SL, Nand J. Effect of testosterone and gonadotropins on spermatogenesis in Rana pipiens. J. Exp. Zool. 1965; 159(1): 93-111.

9. Rastogi RK, Iela L, Delrio G, DiMeglio M, et al. Environmental influence on testicular activity in the green frog. J.Exp. Zool. 1978; 206: 49-64.

10. Wells KD. The social behavior of anuran amphibians. Anim. Behav. 1977; 25: 666-693.

11. Brown GP, Shine R. Influence of weather conditions on activity of tropical snakes. Austral Ecol. 2002; 27(6): 596-605.

12. Kyriakopoulou- Sklavounou P, Kattoulas ME. Contribution to the reproductive biology of *Rana ridibunda pallas* (Anura, Ranidae). Amphibia-Reptilia. 1990; 11:23-30.

13. Sarge KD, Bray AE, Goodson ML. Altered stress response in testis. Nature (Lond). 1995(6518); 373: 126.

14. Desjardins C, Ewing LL. Cell and molecular biology of the testis. Oxford University Press, Inc. New York. 1993; 1-497.

15. Bunick D, Johnson PA, Johnson TR, Hecht NB. Transcription of the testis-specific mouse protamine 2 gene in a homologous in vitro transcription system. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1990; 87(3): 891-895.

16. Cuellar HS, Cuellar O. Evidence for endogenous rhythmicity in the reproductive cycle of the parthenogenetic Lizard *Cnemidophorus uniparents* (Reptilia:Teiidae). Copeia. 1977; 554-557.

17. Bona G, Licht P. Effect of temperature on sexual receptivity and ovarian recrudescence in the garter Snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. Herpetologica. 1983; 39:173-182.

18. Gavaud J. Role of cryophase temperature and thermophase duration in thermoperiodic regulation of the testicular cycle in the Lizard, *Lacerta vivipara*. J. Exp. Zool. 1991; 260: 239-246.

19. Beaupre E, Christinc CJT, Steven JB, Morgan JLM, et al. Determination of testis temperature rhythms and effects of constant light on testicular function in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), Biology of reproduction. 1997; 56:1570-1575.

20. Mendonca MT, Licht P. Photothermal effects on the testicular cycle in the musk turtle, *Sterno therus odoratus*. J. Exp. Biol. 1986; 239:117-130.

21. Whittier JM, Manson JT, Crews D. Licht, P. Role of light and temperature in the regulation of reproduction in the red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. Can. J. Zool. 1987; 65: 2090-2097.

22. Huey RB, Pianta ER. Ecological consequences of foraging mode. Ecology. 1981; 62: 991-999.

23. Vitt J, Congdon JD. Body shape, reproductive effort and relative clutch mass in Lizards: resolution of aparadox. Am. Nat. 1978; 112: 595-608.

24. Weckcs HC. On the distribution, habitat and reproductive habitats of certain European and

Archive of SID

www.SID.ir

Australian Snakes and Lizards with particular regard to their adoption viviparity. Proc. Linn. Soc. NSW. 1933; 58:270-274.

25. Werner J. Temperature-Photoperiod effects on spermatogenesis in the salamander *Plethodon cinerus*. Copeia. 1969; 592-602.

26. Toyoshima S, Iwasawa H. Annual dynamics of germ cells in male *Hyla japonicai*: Herpetologica. 1984; 40: 308-311.

27. Charadej J, Aungkura J, Prapee S, Prasert S. Structure and Development of the testis of Bullfrog, *Rana catesbeiana*, and their changes during seasonal variation; Science Asia. 2000; 26: 69-80.

28. Amey AP, Whittier JM. Seasonal patterns of plasma steroid hormones in males and females of the bearded dragon Lizard, Pogona barbata. Gen.Comp.Endocrinol. 2000; 117: 335-342.

29. Rhen T, Crews D. Variation in reproductive behaviour within a sex: Neural systems and endocrine activation. J. Neuroendocrin. 2002; 14: 517-531.

30. Diaz JA, Alonso-Gómes AL, Delgado MJ. Seasonal variation of gonadal development, sexual steroids and lipids reserves in a population of the Lizard *Psammodromus algirus*. J. Herpetol. 1994; 28:199-205.

31. Heideman NJL. The relationship between reproduction and abdominal fat body and liver condition in *Agama aculeate aculeate* and *Agama planiceps planiceps* (Reptilia: Agamidae) males in Windhoek, Nambia. Journal of Arid Environments. 1995; 31(1): 105-113.

32. Torki F, Gharzi A. Spermatogenesis Timing in a Population Ophisops elegans (Sauria, Lacertidae) Western Iran. Asiatic Herpetological Research. 2008; 11: 130-133.

33. Baharara J, Mahdavi shahri N, Nemati A, Shahraki Nasab. [Study of spermatogenesis and testes histology of *Laudakia caucasia* (*Stellia caucasicus*, Agamidae) species in Deh Gheibi zone of Mashad]. Journal of Cell and Tissue. 2011; 2(3), 193-202. Persian.

34. Jenssen TA, Nunez SC. Male and female reproductive cycles of the Jamaican lizard, *Anolis opalinus*. Copeia. 1994; 4: 767-780.

35. Gustavo -Vieira HC, Wiederhecker-Helga C, Colli Guarino R, Sonia N. Spermiogenesis and testicular cycle of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae) in the Cerrado of central Brazil. Amphibia-Reptilia. 2001; 22: 217-233.

36. Crespo EG, Cei JM. L'activité spermatogéné saisonniére de Rana iberica Boul du nord de Portugal: Arquivos do Museu Bocage. 1971; 3 : 37-50.

37. Yoneyama H, Iwasawa H. Annual changes in the testis and accessory sex organs of the bullfrog *Rana catesbeiana*. Zool Sci. 1985; 2: 229-237.

38. Loumbouridis NS, Kyriakopolou-Sklavouou P. Reproductive and lipid cycles in the male frog Rana ridibunda in northern Greece. Comp. Biochem. Phisiol. A. Comp. Physiol. 1991; 99(4): 577-583.

39. Torki F, Gharzi A, Spermatogenesis Timing in a Population *Ophisops elegans* (Sauria: Lacertidae), Western Iran. Asia. Herpet. Res. 2008; 11, 130-133.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Spring 2013; 4(1): 25-33

Monthly Differences in Spermatogenesis Process in a Population of Marsh Frog, *Pelophylax ridibundus*

Gharzi A. Ph.D.[1*], Ashkavandi S. M.Sc.[1], Abbasi M. Ph.D.[2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University

2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University

* Email corresponding author: ahgharzi@yahoo.com

Received: 31 Oct. 2012 Accepted: 1 Jan. 2013

Abstract

Aim: To investigate spermatogenesis in the Marsh frog living in Makhmalkooh, Khorramabad, and determine which type of spermatogenesis found in this species.

Material and Methods: 34 male frogs were collected from the study area during September to February. First, the specimens were identified by measuring biometric, meristic characters and according the present keys. Then, abdominal cavity was dissected and the gonads were out and processed to prepare for histological sections methods. The tissue sections were finally examined for histological features and three quantitative parameters.

Results: Microscopic observations showed that in this species the event of sperm releasing starts in March and continue to June, during which spermatogenic cysts are observed on the wall of seminiferous tubules. This event ceases during July to September when spermatogenesis enters to its resting phase. During the resting phase the cysts are not found in the seminiferous tubules. A regenerative phase was distinguished during September to March as the number of cell increased in germinal layer. Quantitative surveys also illustrated that during March to September, diameter of the tubules and their germinal layer initially increased and then declined while the lumen's diameter showed an opposite flux when compared with two other parameters.

Conclusion: Based on the results presented here, it seems that in this species the spermatogenesis does not occur as continuous but it is carried out in the form of semi-continuous or potentially continuous.

Key words: Amphibia, Cyclic activity, Histology, Spermatogenesis, Testis

Archive of SID

www.SID.ir