

برخی شاخص‌های تولیدمثلی خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی (*Astacus leptoductylus*)

محدثه احمدنژاد*^۱، محمد صیاد بورانی^۱، مهدی مؤمنی^۱

۱- پژوهشکده آبرزی پروری کشور (آب‌های داخلی)، بندرانزلی، ایران، صندوق پستی: ۶۶

تاریخ دریافت: ۲۴ تیر ۱۳۹۳

تاریخ پذیرش: ۱۸ آبان ۱۳۹۳

چکیده

خرچنگ دراز آب شیرین *Astacus leptoductylus* از آبریان با ارزش و اقتصادی دریای خزر و حوضه آبریز آن می‌باشد که از ارزش صادراتی قابل توجهی برخوردار است. در تحقیق حاضر جهت بررسی تغییرات ظاهری و بافت‌شناسی گنادهای خرچنگ دراز آب شیرین نر و ماده طی یک چرخه تولید مثلی در شرایط پرورشی و تأثیر تراکم مولدین بر برخی از شاخص‌های تولید مثلی، از مولدین ماده و نر ۲ ساله پرورش یافته در ۹ استخر خاکی در سه تیمار با تراکم ۳، ۵ و ۷ عدد خرچنگ در متر مربع و هر تیمار با سه تکرار، طی مدت ۱۰ ماه (از خرداد تا اسفند) نمونه‌برداری شد. شاخص گنادی مولدین و مراحل رسیدگی گنادهای استفاده از بافت‌شناسی کلاسیک مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میانگین شاخص گنادی مولدین ماده به ماه آذر و در مولدین نر به ماه تیر و آبان تعلق داشت. هفت مرحله رسیدگی جنسی در ماده‌ها و ۶ مرحله رسیدگی در نرها تشخیص داده شد. اختلاف معنی‌داری در میزان شاخص گنادی در سه تیمار مشاهده نشد. با توجه به نتایج حاصل، می‌توان گفت فعالیت تولیدمثلی مولدین پرورشی در اواخر آذر رخ داد. همچنین شاخص تراکم تا ۷ عدد خرچنگ در هر متر مربع تأثیری بر میزان رسیدگی جنسی نداشت.

کلمات کلیدی: خرچنگ دراز آب شیرین، بافت‌شناسی، تخمدان، بیضه، رسیدگی جنسی.

*عهده‌دار مکاتبات (✉). m_ahmadnezhad@yahoo.com

مقدمه

خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptoductylus* متعلق به خانواده Astacidae، از آبیان با ارزش و اقتصادی دریای خزر و حوضه آبریز آن بشمار می رود که از ارزش صادراتی قابل توجهی نیز برخوردار است. عمده پراکنش آن در سواحل و رودخانه های واقع در بخش غربی دریای خزر و همچنین تالاب انزلی است. این آبی همچنین از سال ۱۳۶۸ در دریاچه پشت سد ارس مشاهده گردیده است (صمدزاده، ۱۳۷۴).

خرچنگ های آب شیرین جانورانی تک جنسی اند که دارای جنس نر و ماده می باشند اما گاهگاهی افراد دو جنسی هم در بین آنها دیده می شود. در هر دو جنس، گنادها در قسمت پشت ناحیه سینه قرار گرفته اند و اندازه و ظاهر آنها به سن و شرایط تولید مثلی خرچنگ بستگی دارد. تخمدانها شامل دو لوب قدامی و یک لوب خلفی اند که به وسیله یک لایه بافت همبند و ماهیچه ای نازک پوشیده شده اند (Vogt, 2002). در مرکز هر یک از لوب های تخمدان اپیتلیوم زاینده قرار دارد که از اووگونی و سلول های فولیکولی مشتق شده است (Krol et al., 1992). در طی رشد تخمک و زرده سازی، سلول های فولیکول از اپیتلیوم زاینده به داخل منطقه رشد حرکت می کنند و به محیط هر تخمک متصل می شوند. بدین ترتیب کیسه های مخصوصی برای رشد و نمو تخمک می سازند. هر کیسه شامل یک تخم رسیده یا یک تخمک مرحله ابتدایی رشد یا یک تخمک زرده دار است (Ando and Makioka, 1999). Payen و Meusy (۱۹۸۸) تکامل تخمدان را به مراحل پیش زرده ای، زرده سازی، رشد تخمک و رسیدگی نهایی تقسیم نمودند. در زمان پیش زرده ای، اووگونی ثانویه ناحیه زاینده را ترک می کند و

به صورت تخمک پیش زرده ساز تکامل می یابد و ویژگی آن سیتوپلاسم بی شکل و بازوفیل است (Tan-Fermin and Pudadera, 1989). مرحله بعدی، زرده سازی یا ویتلوژنز است که شامل جمع شدن ترکیبات آلی و معدنی زرده در تخمک می باشد (Browdy et al., 1990). در ادامه، زرده تجمع پیدا می کند و تخمک ها به طور همزمان در لوب های تخمدان بالغ می شوند. تخمک های واجد زرده در نهایت رسیده می شوند و به سمت محیط تخمدان حرکت می کنند که باعث انبساط لوب های تخمدان به سمت فضای هموسل می شوند (Krol et al., 1992). اوج رسیدگی تخمک ها چند ساعت قبل از تخم ریزی رخ می دهد (Yano, 1988). Adiyodi و Subramoniam (۱۹۸۳) اووژنز را به دو مرحله تقسیم نمودند: مرحله تکثیر و مرحله تمایز. در مدت مرحله تکثیر، اووگونی های ثانویه در ناحیه زاینده توسط تقسیم میتوزی تولید می شوند. در مرحله تمایز، اووگونی ثانویه وارد پروفاز میوز I می شود و اووسیت های اولیه از آنها مشتق می شوند و به سوی ناحیه رشد حرکت می کنند. اندازه تخمک زیاد می شود تخمک می رسد و هنگامی که اوولاسیون رخ می دهد تخمک وارد مرحله متافاز میوز I می شود (Yano, 1988). تخمدانها به یک جفت مجرای تخم بر کوتاه ارتباط دارند که به یک جفت منفذ تناسلی واقع در قاعده سومین پای شنا، باز می شوند. مجرای تخم بر به وسیله بافت همبند رشته ای و رشته های ماهیچه ای احاطه شده است (Krol et al., 1992).

بیضه ها که توسط غشای نازکی پوشیده شده اند، دارای یک جفت لوب قدامی و یک لوب خلفی می باشند. غشای نازک احاطه کننده بیضه از یک لایه

متمرکز شده است در حالی که بیضه‌ها مطالعه چندانی نشده‌اند (Sellos and Legal, 1981; Obradovic, 1988; Adiyodi and Ankumar, 1982). در ایران نیز مطالعات فراوانی در مورد بیولوژی و روش‌های تکثیر و پرورش خرچنگ دراز آب شیرین (دانش خوش اصل و همکاران، ۱۳۸۴) به انجام رسیده است. اما تاکنون در مورد چرخه تولیدمثلی و تغییرات بافت تخمدان این گونه در شرایط پرورشی مطالعه‌ای صورت نپذیرفته است. لازمه موفقیت در معرفی یک گونه وحشی به آبرزی پروری، شناخت چرخه تولید مثلی آن گونه می‌باشد. مطالعات بافت‌شناسی گنادهای آن از قبیل اعتمادترین روش‌ها برای ارزیابی تاکتیک‌های تولید مثلی و تاییدی برمشاهدات ماکروسکوپی (Alonso et al., 2011) است. بافت‌شناسی در بسیاری از پدیده‌های زیستی مانند تولید مثل آبریان کمک می‌کند تا روش‌های جدید و موثری برای افزایش کارایی مولدین، افزایش تولید و نهایتاً راندمان و پیش‌بینی برای تولید آبریان بهتر ابداع شود. گونه *A. leptodactylus* یک گونه بومی و دارای ارزش اقتصادی و پتانسیل فراوان برای تکثیر و پرورش به منظور صادرات می‌باشد و عدم اطلاعات کافی و لازم در مورد روند رسیدگی جنسی و ساختار بافت گنادهای مولدین نر و ماده این گونه سبب شکل‌گیری تحقیق حاضر گردید. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی تغییرات ظاهری و بافت‌شناسی گنادهای نر و ماده خرچنگ دراز آب شیرین در طی یک چرخه تولید مثلی در شرایط پرورشی و تأثیر تراکم مولدین بر برخی از شاخص‌های تولید مثلی بوده است.

اپیتلیال خارجی و یک لایه بافت همبند داخلی ساخته شده است (Krol et al., 1992). هر لوب بیضه شامل تعداد زیادی لوله‌های سمینی فر است که توسط سلول‌های سرتولی پوشیده شده‌اند و دورتادور این لوله‌ها از سینوس‌های خونی احاطه شده است. ساختمان و ظاهر لوله‌های سمینی فر در هر مرحله اسپرماتوزنز فرق می‌کند. اسپرماتوزنز در لوله‌های سمینی فر همزمان صورت می‌گیرد (Obradovic, 1982). اسپرماتوزوآی ده پای بالغ بدون تاژک است و یک هسته نامتراکم و تعداد متغیری تیغه دارد (Krol et al., 1992). لوله‌های جمع‌کننده، اسپرم را از لوله‌های سمینی فر جمع کرده و آنرا به وازدفران منتقل می‌کنند. وازدفران‌ها که به بیضه‌ها متصل می‌شوند بسیار طویل‌اند. آن‌ها یک جفت مجرای لوله‌ای‌اند که اسپرماتوزوآ از طریق آن‌ها از لوله‌های جمع‌کننده بیضه‌ها به منافذ تناسلی که در پایه پنجمین جفت پای شنا می‌شوند، می‌رسد. آن‌ها از یک اپیتلیوم ترشچی تشکیل شده‌اند که اعمال متنوعی شامل انتقال اسپرماتوزوآ به سمت پایین مجرا، نگهداری یا حفظ یک محیط مناسب برای اسپرماتوزوآ و تولید یک پوشش محافظ دارند و به وسیله یک بافت همبند احاطه شده‌اند (Adiyodi and Anikumar, 1988). وقتیکه اسپرماتوزوآ وارد وازدفران می‌شود آن‌ها توده اسپرم را باهم یکی کرده و آنرا سفت می‌کنند و لایه‌های دیواره سلول اسپرماتوفور را ترشح می‌کنند (Vogt, 2002).

بیشتر مطالعات انجام شده بر روی گنادهای پایان بر روی اعمال تخمدان‌ها (Yano, 1988; Minagawa et al., 1993) ، زرده‌سازی (Subramoniam, 2000) و تغییرات فصلی فعالیت‌های تخمدان (Abdu et al., 2000) و تغییرات فصلی فعالیت‌های تخمدان (O'Donovan et al., 1984) در طبیعت

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر از خرچنگ‌های دراز آب شیرین ۲ ساله ایستگاه تحقیقات شیلاتی سفیدرود وابسته به پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی (بندر انزلی) استفاده شد که از سال ۱۳۸۵ در ۹ استخر خاکی ۱۵۰ متر مربعی در سه تیمار با سه تکرار و براساس تراکم ۳، ۵ و ۷ عدد در متر مربع پرورش یافتند. تعداد ۵۰ خرچنگ ماده و ۵۰ خرچنگ نر، طی مدت خرداد الی اسفند ۱۳۸۷ به صورت ماهانه صید و نمونه‌برداری گردیدند. طول کل بدن (فاصله بین روستروم تا نوک تلسون) با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. پس از برداشتن کاراپاس، گناد هر خرچنگ از بدن خارج شده و وزن آن توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم اندازه‌گیری شد. شاخص گنادی (Gonadosomatic Index: GSI) به صورت درصد نسبت وزن گناد به وزن بدن محاسبه گردید.

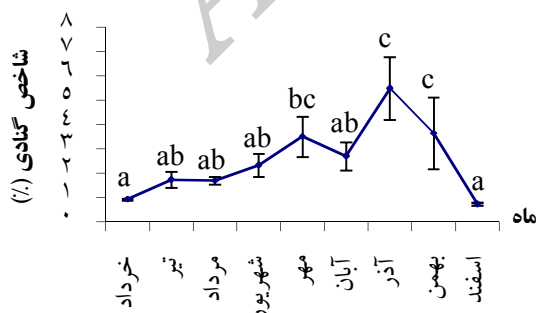
جهت مطالعه بافت‌شناسی، گناد هر یک از مولدین، پس از بررسی و مشاهده ظاهری در محلول بوئن به مدت ۲۴ ساعت تثبیت گردید. آبیگری نمونه‌ها توسط اتانول با درجات ۷۰، ۸۰ و ۹۶ درصد و الکل ۱- بوتانل انجام پذیرفت. مرحله شفاف‌سازی توسط کلرفرم صورت گرفت. پس از پارافینه نمودن و قالب‌گیری از نمونه‌ها برش‌های ۵ تا ۷ میکرونی توسط میکروتوم روتاری تهیه گردید. سپس برش‌های بافتی بر روی لام قرار داده شده و با روش اتوزین هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردیدند. اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با استفاده از چسب کانادا بالزام لامل‌گذاری شده و توسط میکروسکوپ دوربین دار نیکون مورد مطالعه قرار گرفتند. شناسایی مراحل مختلف رسیدگی جنسی و بررسی مشخصات ظاهری و میکروسکوپی تخمدان و بیضه در هر یک از مراحل

توسعه گنادی به ترتیب با استفاده از کلید هفت مرحله‌ای و شش مرحله‌ای پیشنهاد شده در مطالعات Beatty و همکاران (۲۰۰۵a) صورت پذیرفت. جهت مشخص نمودن وجود و یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین شاخص گنادی نمونه‌های مورد مطالعه در زمان‌های مختلف و در تیمارهای مختلف از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون‌های مقایسه میانگین دانکن با درصد اطمینان ۹۵٪ ($P < 0.05$) استفاده شد. برای انجام کارهای آماری از نرم‌افزار Spss نسخه ۱۳ و جهت رسم نمودار از نرم‌افزار Excell استفاده شد.

نتایج

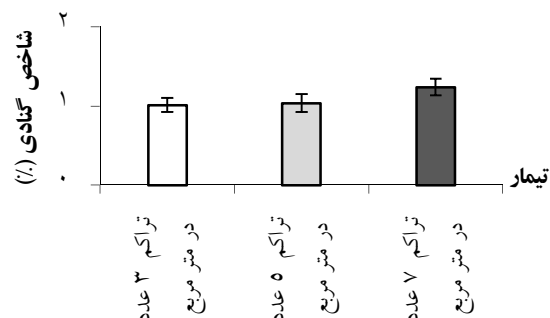
میانگین طول و وزن در مولدین ماده به ترتیب 13 ± 0.9 (۱۰/۲ - ۱۴/۷) سانتی‌متر و 59.5 ± 13.5 (۲۸/۷۶ - ۸۶/۲۶) و در مولدین نر به ترتیب 13.5 ± 0.9 (۱۱/۶ - ۱۵/۳) سانتی‌متر و 91.3 ± 24.6 (۴۳/۴۳ - ۱۳۷/۶) گرم بود.

در مولدین ماده، کمترین مقدار میانگین شاخص گنادی (GSI) در ماه اسفند (0.06 ± 0.074 درصد) و بیشترین آن 1.29 ± 0.55 (درصد) در ماه آذر قرار داشت (شکل ۱).



شکل ۱: میانگین شاخص گنادی (\pm انحراف معیار) مولدین ماده پرورشی خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptoductylus* در ماه‌های مختلف سال ۱۳۸۷

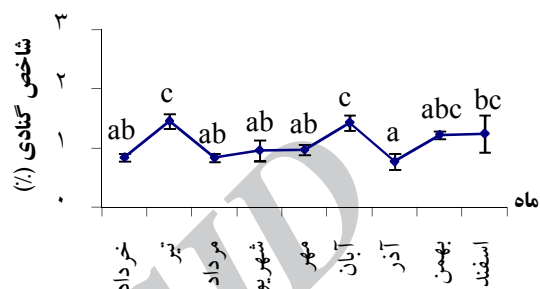
همچنین میانگین شاخص گنادی مولدین نر مربوط به تیمار ۳ با مقدار 1.0 ± 0.10 درصد، نسبت به دو تیمار دیگر بیشتر بود درحالیکه بین سه تیمار مذکور اختلاف معنی دار آماری وجود نداشت ($P > 0.05$) (شکل ۴).



شکل ۴: مقایسه میانگین شاخص گنادوسوماتیک مولدین نر پرورشی خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptodactylus* بین تیمارهای مختلف

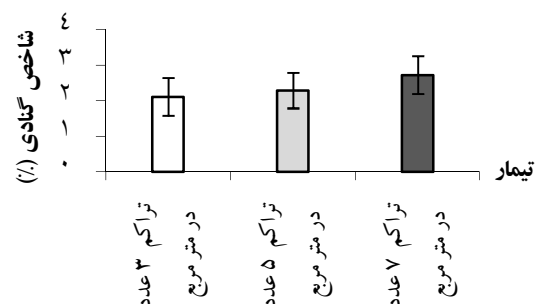
در مولدین ماده، مقایسه میانگین شاخص گنادی بین مراحل مختلف رسیدگی جنسی نشان داد که با افزایش رشد و توسعه گناد، میانگین شاخص گنادی افزایش یافته است به طوری که میزان آن در مرحله V (مرحله بلوغ) و VI (در حال تخم‌ریزی) به طور معنی‌داری بیشتر از سایر مراحل رسیدگی جنسی قرار گرفت و در مرحله پس از تخم‌ریزی (VII) نسبت به مراحل V و VI، کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.05$) (جدول ۱). در نرها نیز با رشد و توسعه مراحل جنسی گناد، میانگین شاخص گنادی افزایش یافت، بیشترین مقدار شاخص گنادی متعلق به مرحله اسپرم‌ریزی (V) و کمترین آن به مرحله پس از ریخته شدن اسپرم (VI) تعلق داشت. مرحله IV و V به طور معنی‌داری بیشتر مراحل II و VI بودند (جدول ۲).

کمترین مقدار میانگین شاخص گنادی مولدین نر به نمونه‌های ماه آذر (0.77 ± 0.13 درصد) و بیشترین آن به ماه‌های تیر (1.46 ± 0.12 درصد) و آبان (0.13 ± 0.13 درصد) تعلق داشت (شکل ۲).



شکل ۲: میانگین شاخص گنادی (\pm انحراف معیار) مولدین نر پرورشی خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptodactylus* در ماه‌های مختلف سال ۱۳۸۷

در مقایسه بین تیمارها، میانگین شاخص گنادی مولدین ماده تیمار ۳ (تراکم ۷ عدد در متر مربع) با مقدار 2.72 ± 0.53 درصد، نسبت به دو تیمار دیگر (تراکم‌های ۳ و ۵ عدد در متر مربع) بالاتر بود، اما بین سه تیمار مذکور اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳: مقایسه میانگین شاخص گنادوسوماتیک مولدین ماده پرورشی خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptodactylus* بین تیمارهای مختلف

جدول ۱: میانگین شاخص گنادی به تفکیک مراحل مختلف رسیدگی جنسی در خرچنگ‌های دراز آب شیرین ماده دو ساله پرورشی

| مراحل رسیدگی جنسی | مرحله II/I (نابالغ) | مرحله III | مرحله IV | مرحله V | مرحله VI | مرحله VII |
|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | (در حال بازیابی) | (در حال توسعه) | (توسعه یافته) | (بالغ) | (در حال تخم ریزی) | (پس از تخم ریزی) |
| شاخص گنادی (%) | ۱/۴۱±۰/۳۲ ^a | ۱/۴۷±۰/۲۴ ^a | ۱/۹۶±۰/۱۷ ^{ab} | ۲/۷۴±۰/۴۶ ^b | ۵/۶۷±۰/۶۳ ^c | ۰/۸۴±۰/۱۱ ^a |

جدول ۲: میانگین شاخص گنادی به تفکیک مراحل مختلف رسیدگی جنسی در خرچنگ‌های دراز آب شیرین نر دو ساله پرورشی

| مراحل رسیدگی جنسی | مرحله I | مرحله II | مرحله III | مرحله IV | مرحله V | مرحله VI |
|-------------------|----------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | (نابالغ) | (در حال بالغ شدن) | (بالغ) | (رسیده) | (در حال اسپرم ریزی) | (پس از اسپرم ریزی) |
| شاخص گنادی (%) | - | ۰/۹±۰/۰۷ ^{ab} | ۱/۱۴±۰/۱۳ ^{bc} | ۱/۳۵±۰/۱۳ ^c | ۱/۴۳±۰/۱۱ ^c | ۰/۷۴±۰/۱۰ ^a |

مشخصات ظاهری و بافت‌شناسی گناد

تخمک‌های واجد زرده (اعم از تخمک‌های مراحل ابتدایی زرده‌گیری تا تخمک‌های مراحل نهایی زرده‌گیری) از تیر تا اسفند در برش‌های بافتی وجود داشتند. در بررسی روند زمانی رشد و توسعه تخمدان مشاهده شد که در ماه خرداد مولدین در مراحل I تا III قرار داشتند. در ماه‌های تیر تا مهر مرحله IV مشاهده شد و مولدین در ماه‌های آبان و آذر در اوج رسیدگی جنسی یعنی در مراحل V و VI رسیدگی قرار داشتند. در ماه دی به دلیل پنهان شدن مولدین هیچ مولدی صید نگردید. مرحله VII رسیدگی تخمدان (یا مرحله پس از تخم‌ریزی) در ماه‌های بهمن و اسفند مشاهده شد (جدول ۳).

تغییرات مشخصات ظاهری، بافت‌شناسی، فعالیت تولید مثلی و روند زمانی مراحل توسعه گنادی مولدین نر در جدول ۴ آورده شده است. در نرها بیضه‌های حجیم و رسیده در مدت مهر تا آذر مشاهده شد. فعالیت جفت‌گیری در آذر و دی رخ داد. در مشاهده ظاهری بیضه‌ها در ماه خرداد شفاف و وازدفران نیز شفاف بودند در فصل تابستان بیضه‌ها شروع به شیری رنگ شدن نمودند. شیری رنگ شدن وازدفران از فصل پاییز شروع شد و در هر نمونه‌برداری بر ضخامت و سفتی محتویات وازدفران به ترتیب افزوده می‌شد.

تخمندان *A. leptoductylus* پرورشی واجد دو بخش قدامی و یک بخش خلفی بود. تغییرات ویژگی‌های ظاهری، بافت‌شناسی فعالیت تولید مثلی و روند زمانی مراحل توسعه گنادی مولدین ماده در جدول ۳ نشان داده شده است. تغییر رنگ تخمک‌های موجود در تخمدان از کرم به زرد، زیتونی روشن و زیتونی تیره از ویژگی‌های بارز مشاهده شده در طول یک چرخه تولید مثلی یک ساله بود. به طوری که در ماه‌های خرداد و تیر تخمک‌های کرم رنگ، در ماه مرداد تخمک‌های زرد، در ماه‌های شهریور و مهر تخمک‌های زرد و زیتونی روشن، در آبان تخمک‌های زیتونی روشن و تیره و در آذر تخمک‌های زیتونی تیره مشاهده گردید و تخم‌های چسبیده به پاهای شنا در بهمن و اسفند ظاهر شدند. در برش‌های بافتی تمام ماه‌های نمونه‌برداری اووگونی‌ها حضور داشتند اما تعداد آن‌ها با افزایش توسعه گنادی کم می‌شد. حضور تخمک‌های پیش‌هسته‌ای (در مراحل اولیه رشد و قبل از تشکیل زرده) در برش‌های بافتی نمونه‌های خرداد تا آذر مشاهده شد. تخمک‌های مراحل ابتدای زرده‌گیری از تیر ماه در برش‌های بافت تخمدان مشاهده شدند و به‌طور کلی

جدول ۳: روند تغییرات ظاهری و مراحل رسیدگی تخمدان خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی طی خرداد تا اسفند سال ۱۳۸۷

| ماه | خرداد | تیر | مرداد | شهریور | مهر | آبان | آذر | بهمن | اسفند |
|---|-------|-----|-------|--------|-----|------|-----|------|-------|
| | + | + | | | | | | | |
| تخم‌های کرم رنگ | | | | | | | | | |
| تخم‌های زرد رنگ | | | | + | + | | | | |
| تخم‌های زیتونی روشن | | | | + | + | + | | | |
| تخم‌های زیتونی تیره | | | | | | + | + | | |
| ویژگی‌های ظاهری و بافتی تخم‌های چسبیده به پای شنا | | | | | | | | + | + |
| جفت گیری | | | | | | + | + | | |
| اووگونی | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| تخمک‌های پیش هسته ای | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| تخمک‌های واجد زرده | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| مرحله II/I | | | | | | | | | |
| مرحله III | | + | | | | | | | |
| مرحله IV | | | + | + | + | | | | |
| مرحله V | | | | | | + | + | | |
| مرحله VI | | | | | | + | + | | |
| مرحله VII | | | | | | | | + | + |

جدول ۴: تغییرات ظاهری و مراحل رسیدگی گناد خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی طی خرداد تا اسفند سال ۱۳۸۷

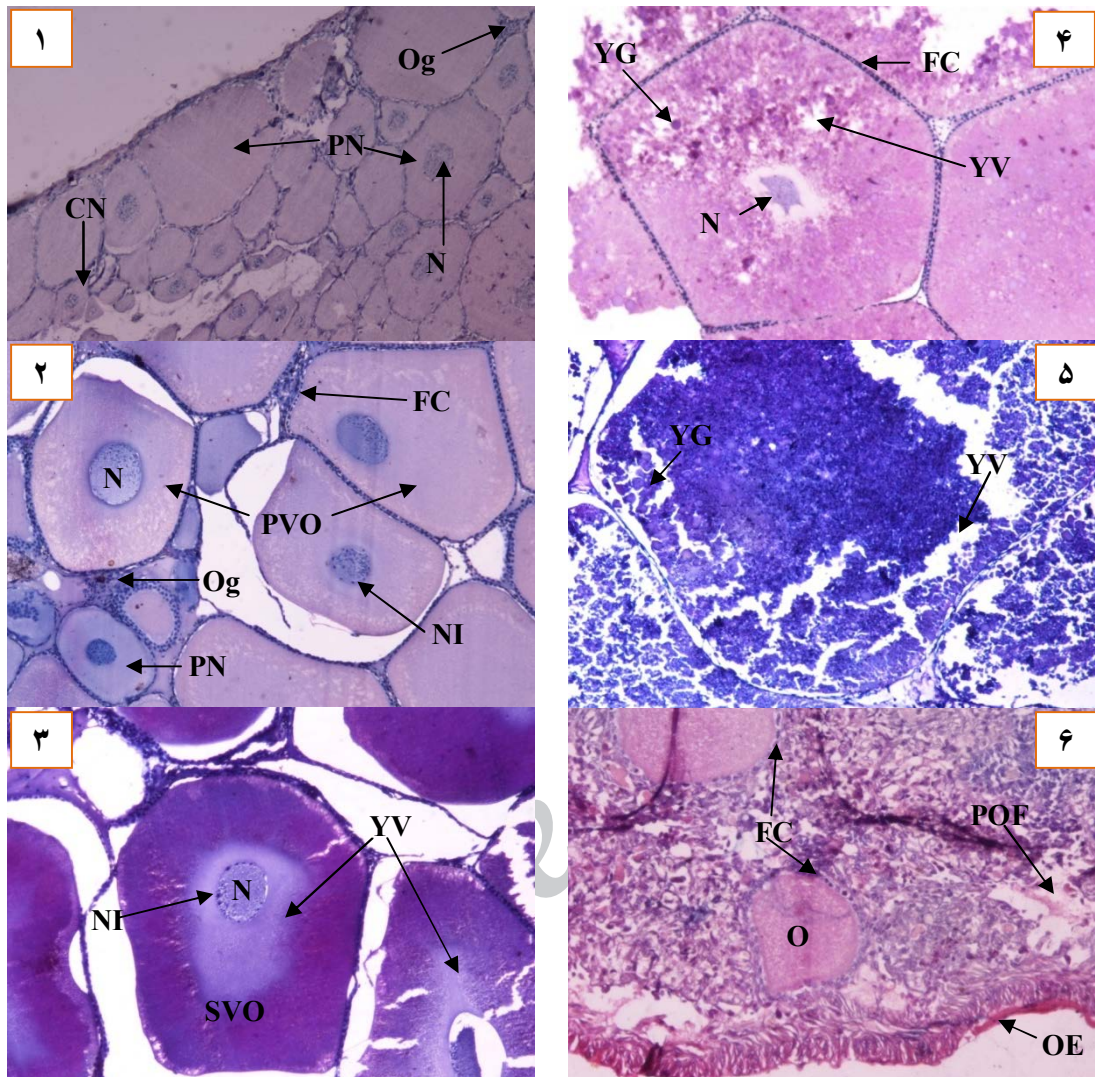
| ماه | خرداد | تیر | مرداد | شهریور | مهر | آبان | آذر | دی | بهمن | اسفند |
|--------------------|-------|-----|-------|--------|-----|------|-----|----|------|-------|
| | + | | | | | | | | | |
| بیضه‌ها و وازدفران | | | | | | | | | | |
| بیضه‌های شیری رنگ | | + | + | | | | | | | |
| ضخیم و طولانی شدن | | | | | + | + | | | | |
| رسیدگی بیضه | | | | | + | + | | | | |
| جفت گیری | | | | | + | + | | | | |
| اسپرماوسیت | | + | + | + | + | + | | | | |
| اسپرما تید | | | | | + | + | | | | |
| اسپرما توزوئید | | | | | + | + | | | | |
| اسپرما توفور | | | | | + | + | | | | |
| مرحله I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| مرحله II | | + | | | | | | | | |
| مرحله III | | | + | | | | | | | |
| مرحله IV | | | | + | + | | | | | |
| مرحله V | | | | | + | + | | | | |
| مرحله VI | | | | | | | + | | | |

تخمندان داشت. همچنین مشخص شد که اووگونی‌ها و اووسیت‌های پیش زرده‌ای (یا پیش هسته‌ای) در تمام مراحل بلوغ تکامل تخمدان وجود داشتند. ویژگی‌های ظاهری و میکروسکوپی مراحل رسیدگی تخمدان در خرچنگ دراز آب شیرین ماده پرورشی در جدول ۵ و شکل ۵ تشریح شده است.

بر اساس مطالعه بافت‌شناسی، در خرچنگ دراز آب شیرین ماده پرورشی هفت مرحله رشد و توسعه تخمدانی تشخیص داده شد (جدول ۵). بررسی‌های ظاهری و میکروسکوپی بر اساس مشخصات درون سلولی تخمک‌ها بخصوص وجود ذرات زرده در سیتوپلاسم نشان داد که ویژگی‌های میکروسکوپی مراحل توسعه تخمدان شباهت زیادی با مراحل ظاهری

جدول ۵: مشخصات ظاهری و بافت‌شناسی در مراحل مختلف توسعه تخمدان در مولدین ماده خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی

| مرحله رسیدگی جنسی | مشخصات ظاهری | مشخصات بافت‌شناسی |
|--|---|---|
| مرحله II/I (نابالغ یا در حال بازیابی) | تخمندان نازک، کرم رنگ مایل به زرد کم رنگ، وجود تعدادی تخمک زرد رنگ بسیار کوچک در ماده زمینه تخمدان | حضور اووگونی، تخمک‌های واجد هسته‌های حاوی کروماتین و تخمک‌های پیش هسته‌ای غالب‌اند، تخمدان‌های پس از تخم‌ریزی واجد تخمک‌های در حال تحلیل و فولیکول‌های خالی از تخمک، می‌باشند. |
| مرحله III، در حال توسعه (وزیکول‌های زرده‌ای) | تخمندان کمی ضخیم‌تر، واجد تخمک‌های ریز زرد پررنگ قابل تشخیص در داخل تخمدان | بیشتر محتوای تخمدان پوشیده از تخمک‌های مراحل اولیه توسعه است که در مراحل ابتدایی ویتلوژن‌زاند و وزیکول‌های زرده‌ای سیتوپلاسمی در تخمک‌های بزرگ‌تر مشاهده می‌شود. اووگونی‌ها هنوز حضور دارند. سلول‌های فولیکولی اطراف تخمک‌ها قابل مشاهده‌اند. |
| مرحله IV، توسعه یافته | تخمندان بزرگ‌تر و ضخیم‌تر و حاوی تخم‌های درشت قابل تشخیص خردلی رنگ | تخمک‌های در حال طی کردن مراحل ثانویه ویتلوژن‌زاند، واجد گرانول‌های زرده‌ای کاملاً مشخص در سیتوپلاسم‌اند. تخمک‌های پیش هسته‌ای و اووگونی‌ها همچنان حضور دارند. |
| مرحله V، بالغ | تخمندان بزرگ و کاملاً ضخیم و مملو از تخمک‌های بزرگ مایل به سبز زیتونی | تخمک‌های بزرگ‌تر واجد گرانول‌ها و وزیکول‌های زرده‌ای در تخمدان غالب‌اند. گرانول‌های زرده‌ای قسمت زیادی از سیتوپلاسم را اشغال نموده‌اند که نشانگر ویتلوژن‌ز بیشتر می‌باشد. هنوز کمی تخمک‌های پیش هسته‌ای حضور دارند. |
| مرحله VI، رسیده، در حال تخم‌ریزی | تخمندان بسیار بزرگ مملو از تخمک‌های بزرگ سبز زیتونی تیره که بیشتر فضای شکم را پر کرده‌اند | سیتوپلاسم تخمک‌ها مملو از وزیکول‌های زرده‌ای است. هنوز کمی تخمک‌های پیش هسته‌ای حضور دارند |
| مرحله VII، پس از تخم‌ریزی | تخمندان نسبت به تخمدان نابالغ کمی بزرگ‌تر و ضخیم‌تر و کرم رنگ حاوی تخمک‌های ریز نارنجی در اندازه‌های مختلف درون ماده زمینه تخمدان | فولیکول‌های خالی از تخمک حضور دارند. تخمک‌های پیش هسته‌ای نیز حضور دارند. تعدادی تخمک در حال تحلیل وجود دارند. |



شکل ۵: تصاویر میکروسکوپی از مراحل رسیدگی تخمدان خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی *A. leptodactylus*. (۱) مرحله II/I (نابالغ یا در حال بازیابی)، (۲) مرحله III، در حال توسعه (وزیکول‌های زردهای)، (۳) مرحله IV، توسعه یافته، (۴) مرحله V، بالغ، (۵) مرحله VI، رسیده و در حال تخم‌ریزی، (۶) مرحله پس از تخم‌ریزی، علامت‌های اختصاری: CN=کروماتین هسته‌ای (Chromatin Nucleolar)، FC=سلول فولیکولی (Follicle Cell)، N=هسته (Nucleos)، NI=هستهک (Nucleoli)، O=تخمک در حال تحلیل (Oocyte)، OE=اپیتلیوم تخمدان (Ovarian Epithelium)، Og=اووگونی (Oogonia)، PN=تخمک پیش هسته‌ای (perinucleolar Oocyte)، POF=فولیکول پس از اوولاسیون (Post-ovulatory Follicle)، PVO=تخمک در ابتدای زرده‌گیری (Primery Vitellogenic Oocyte)، SVO=تخمک در مرحله دوم زرده‌گیری (Secondary Vitellogenic Oocyte)، YG=گرانول زرده‌ای (Yolk Granule)، YV=وزیکول زرده‌ای (Yolk Vesicle). رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین، بزرگنمایی ۴۰×.

در بررسی مقاطع بافتی بیضه‌ها، مرحله II تا VI رسیدگی جنسی در نرهای پرورشی تشخیص داده شد (جدول V).

بررسی بافت‌شناسی تخمدان سه تیمار نیز نشان داد که اووسیت‌های تخمدان مولدین هر سه تیمار از ماه تیر تا اوایل مهر در مرحله IV و از مهر تا آذر در مرحله V و VI قرار داشتند (جدول ۶).

جدول ۶: مراحل رسیدگی جنسی تخمدان خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی در تیمارهای مختلف و در ماههای مختلف سال ۱۳۸۷

| تیمار | خرداد | تیر | مرداد | شهریور | مهر | آبان | آذر | دی | بهمن | اسفند |
|-----------------------|----------|-----|-------|--------|-----|-------|-------|----|------|-------|
| ۱ (۳ عدد در متر مربع) | I/II/III | IV | IV | IV | IV | VI, V | VI, V | - | VII | VII |
| ۲ (۵ عدد در متر مربع) | I/II/III | IV | IV | IV | IV | VI, V | VI, V | - | VII | VII |
| ۳ (۷ عدد در متر مربع) | I/II/III | IV | IV | IV | IV | VI, V | VI, V | - | VII | VII |

جدول ۷: مشخصات ظاهری و بافت شناسی در مراحل مختلف توسعه گناد مولدین نر خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی

| مرحله رسیدگی جنسی | مشخصات ظاهری | مشخصات بافت شناسی |
|--|--|---|
| مرحله I (نابالغ) | بیضه‌ها بسیار نازک، وازدفران شبیه نخ و - شفاف | |
| مرحله II (در حال بلوغ) | بیضه‌ها و وازدفران کمی ضخیم | حضور اسپرماتوسیت‌ها در لوله‌های سمینی فر |
| مرحله III (بالغ) | بیضه‌ها ضخیم، وازدفران مات | ظاهر شدن اسپرماتید در لوله‌های سمینی فر |
| مرحله IV (رسیده و قبل از اسپرم ریزی یا Gravid) | بیضه‌های متورم، وازدفران مات و شیری رنگ | ظاهر شدن اسپرماتوزوآ در برخی از لوله‌های سمینی فر، هنوز مراحل پایین تر اسپرماتوزنر در برخی مناطق از بیضه قابل مشاهده است، تعداد معدودی از لوله‌های سمینی فر خالی از اسپرم اند |
| مرحله V (در حال اسپرم ریزی) | وازدفران متورم، مات و شیری رنگ | بیشتر لوله‌های سمینی فر واجد اسپرماتوزوآ که در حال خالی شدن می‌باشند |
| مرحله VI (پس از اسپرم ریزی) | بیضه‌های کاملاً توسعه یافته و پهن و انتهای وازدفران شفاف | لوله‌های سمینی فر کاملاً خالی از اسپرماتوزوآ |

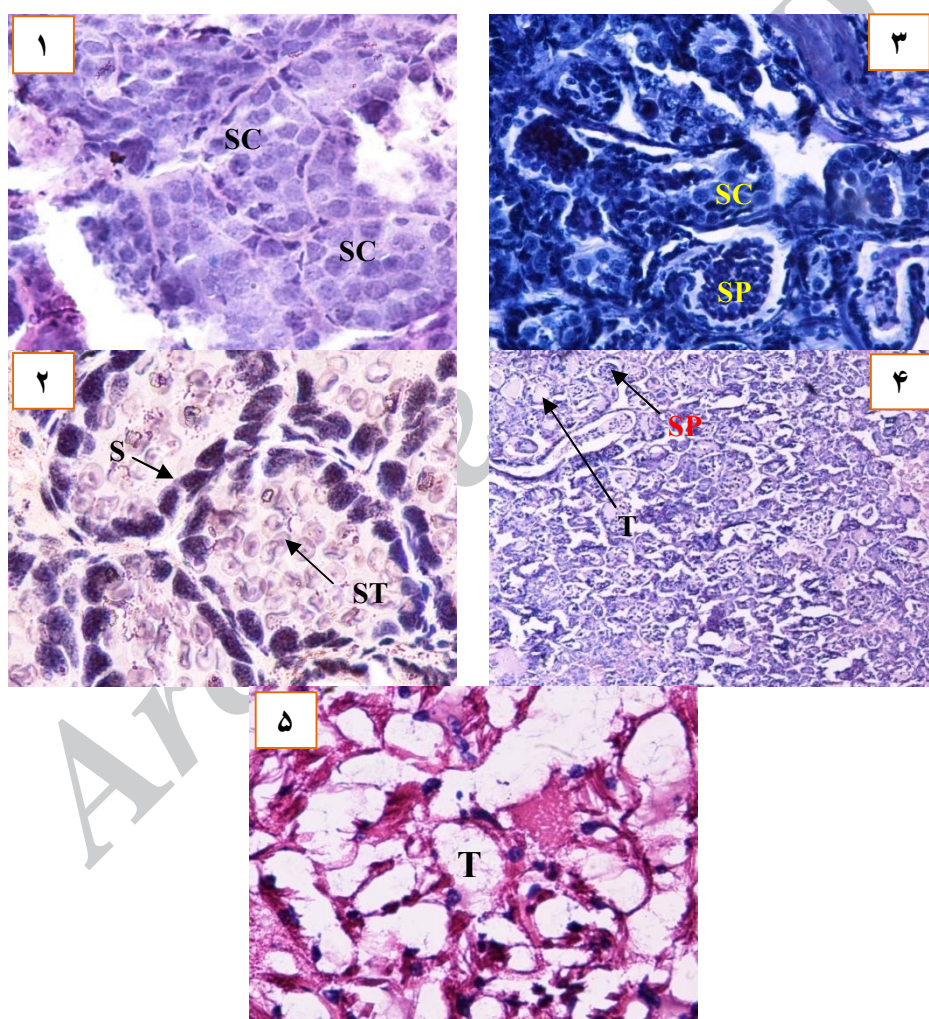
می‌توان جدا نمود اما از لحاظ بافت‌شناسی تمایز این دو مرحله امکان‌پذیر نشد. لذا مشخصات حضور اسپرماتوسیت‌ها در لوله‌های سمینی فر برای مرحله II در نظر گرفته شد.

همچنین مشخص شد که در ماه‌های خرداد تا اوایل شهریور بیشتر لوله‌های سمینی فر حاوی اسپرماتوسیت بوده‌اند به‌علاوه بخشی از لوله‌های سمینی فر در این برش‌ها مراحل دیگری از اسپرماتوزنر و اسپرمیوزنر از جمله اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و به‌طور نادر اسپرماتوزوآ مشاهده شد. در مقاطع بافت بیضه‌های متعلق به اواخر شهریور، بیشتر لوله‌های سمینی فر حاوی اسپرماتوزوآ بودند، اگرچه تعدادی لوله‌های سمینی فر حاوی اسپرماتوسیت و اسپرماتید و نیز تعداد معدودی لوله‌های سمینی فر خالی حضور داشتند. این مشخصات

در مطالعه مراحل رسیدگی گناد نر بر اساس کلید تشخیص ظاهری (Beatty *et al.*, 2005a)، شش مرحله مشخص شد. نمونه بیضه‌های بسیار نازک که واجد وازدفران شفاف شبیه نخ بودند از لحاظ ویژگی‌های ظاهری در مرحله I رسیدگی طبقه‌بندی شدند، درحالی‌که ویژگی‌های میکروسکوپی بافت این بیضه‌ها بسیار شبیه به مشخصات بافتی بود که برای مرحله II رسیدگی گناد نر در کلید تشخیص آورده شده بود. از طرفی نمونه گنادهایی که بافت بیضه و وازدفران در آن‌ها ضخیم بود بر اساس کلید تشخیص ظاهری در مرحله II رسیدگی طبقه‌بندی شدند. ویژگی‌های بافتی این نمونه‌ها کاملاً با ویژگی‌های تعریف شده برای مرحله II رسیدگی گناد نر مطابقت داشت. لذا اگرچه این دو مرحله را به لحاظ ظاهری

مقطع عرضی وازدفران دیواره واجد اپیتلیوم ستونی مژه دار مطبق کاذب مشاهده گردید. دیواره وازدفران در ابتدا و نزدیک به بافت بیضه دارای بافت اپیتلیوم مکعبی ساده بوده است (فاقد تصویر). ویژگی‌های ظاهری و میکروسکوپی مراحل رسیدگی بیضه در خرچنگ دراز آب شیرین نر پرورشی در جدول ۷ تشریح شده است.

در مقاطع بافت گناد مولدین مهر، آبان و آذر مشاهده شد با این تفاوت که با پیشرفت زمان، سلول‌های مراحل اولیه اسپرماتوزن کاهش و تعداد لوله‌های پر از اسپرماتوزوآ افزایش می‌یافت. نهایتاً در نمونه‌های ماه آذر اکثر لوله‌های سمینی فر خالی از اسپرماتوزوآ و بافت بیضه در حال تحلیل رفتن بود (جدول ۴) (شکل ۶). اسپرماتوفور از اواخر شهریور ماه در واز فران مشاهده گردید.



شکل ۶: تصاویر میکروسکوپی برش‌های عرضی بیضه مولدین نر خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptodactylus* در ماه‌های خرداد (۱)، تیر و مرداد (۲)، شهریور (۳)، آبان (۴)، آذر (۵). (۱) مرحله II رسیدگی، اکثر لوله‌های بیضه‌ای حاوی اسپرماتوسیت‌اند، (۲) $\times 400$ ، مرحله III رسیدگی، مشاهده اسپرماتید در لوله‌های سمینی فر، (۳) $\times 400$ ، مرحله IV رسیدگی، مشاهده اسپرماتوسیت و اسپرماتوزوآ و برخی از لوله‌های خالی از اسپرماتوزوآ، (۴) $\times 200$ ، مرحله V رسیدگی، لوله‌ها در حال خالی شدن از اسپرم‌ها، (۵) $\times 40$ ، مرحله VI رسیدگی، لوله‌ها در حال تحلیل رفتن و کاملاً خالی از اسپرم، $\times 200$ ، S = سلول سرتولی (Sertoli Cell)، SC = اسپرماتوسیت (Spermatocyte)، SP = اسپرماتوزوآ (Spermatozoa)، ST = اسپرماتید (Spermatid)، T = لوله سمینی فر (Seminiferous Tubule). رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین.

بحث

در مطالعه حاضر در ماه دی، با کاهش دما و به دلیل مخفی شدن مولدین خرچنگ دراز آب شیرین، صید و نمونه برداری با موفقیت همراه نبوده و هیچ مولدی صید نگردید. چنین پدیده‌ای در مطالعه روی *Astacus astacus* گزارش شده است. Lucić و همکاران (۲۰۰۶) علت در دام نیافتادن خرچنگ‌ها را مخفی شدن و کاهش فعالیت بدنی اعلام نمودند (Lucić et al., 2006).

در تحقیق حاضر، در مولدین ماده پرورشی بیشترین میزان شاخص گنادی به ماه آذر (دسامبر) و کمترین آن به اسفند اختصاص داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهند که زمان رسیدگی نهایی جنسی ماده‌ها در اواخر پاییز و اوایل زمستان و تخم ریزی و تکثیر در اواخر زمستان صورت گرفته است. بدین ترتیب در بهار و پس از تخم‌ریزی، مرحله بازیابی تخمدان به انجام رسیده است. Juchno و Chybowski (۲۰۰۳) در این راستا بیان نمودند که شاخص گنادی، قبل از تخم‌ریزی در بالاترین حد خود و بعد از تخم‌ریزی در پایین‌ترین میزان است. Lucić و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه بر روی گونه *A. astacus* در محیط طبیعی نیز مشاهده نمودند که بیشترین میزان شاخص گنادی ماده‌ها به ماه نوامبر (آبان تا آذر ماه) اختصاص داشت.

بررسی ظاهر تخمدان گونه مورد مطالعه حاضر نشان داد که تخمدان از دو بخش قدامی و یک بخش خلفی تشکیل شده بود و اختلافات ظاهری در اندازه و رنگ تخمدان طی مراحل رسیدگی جنسی گناد وجود داشت به طوری که تخمک‌ها از رنگ کرم روشن به زرد و رنگ زیتونی در آمدند. تخمک‌ها با نزدیک شدن به مراحل نهایی تیره‌تر شده و در نهایت زیتونی

تیره بودند. این تغییرات رنگی به نوعی تداعی گر تدریجی بودن فرایند تکامل تخمک‌ها در خرچنگ‌های پرورشی مطالعه حاضر بوده است. مطالعات انجام شده بر روی خرچنگ دراز آب شیرین گونه *Procambarus clarkii* هم دو بخشی بودن بخش قدامی و یک قسمتی بودن بخش خلفی تخمدان را نشان داده است (Ando and Makioka, 1998). تغییر رنگ تخمدان‌ها طی زرده‌سازی یک خصوصیت مشترک در سخت‌پوستان عنوان شده است و این مسئله در مورد گونه‌های *Macrophthalmus hirtipes* (Jacquinot, 1853)؛ *Crangon crangon* Linnaeus؛ *Portunus Callinectes danae* Smith, 1869؛ *Cyrtograpsus angulatus spinimanus* Latreille؛ *Cherax destructor* Clark, 1936؛ Dana, 1851؛ *Cherax quinquercarinatus* و *Cherax cainii*؛ *astacus* به ترتیب توسط Jones و Simons (۱۹۸۱)، Haefner و Spaargaren (۱۹۸۳)، Costa و Negreiros-Fransozo (۱۹۹۸)، Santos و Negreiros-Fransozo (۱۹۹۹)، Castiglioni و Santos (۲۰۰۱)، Beatty و همکاران (۲۰۰۳)، Beatty و همکاران (۲۰۰۵a,b) و Lucić و همکاران (۲۰۰۶) به ثبت رسیده است (Castiglioni et al., 2007). محققین مختلف از تغییر رنگ تخمدان به عنوان یک معیار ظاهری جهت توصیف مراحل رسیدگی جنسی استفاده نموده‌اند (Arculeo et al., 1995; Pinheiro and Fransozo, 1998; Lopez-Greco and Rodriguez, 1999; Flores et al., 2002). آن‌ها اظهار داشتند که چنین معیاری امکان ارزیابی سریع مراحل تولید مثلی در جمعیت، زمان و مکان فراهم می‌نماید. به علاوه مطالعه چرخه‌های توسعه تخمدان در یک گونه یا جمعیت را

تخم‌ها را به وسیله تغییر رنگ ظاهر آن‌ها از سفید تا قهوه ای مشخص نمودند. آن‌ها تخم‌های سبز زیتونی و بالغ را برای نخستین بار در ماه آگوست تا سپتامبر (شهریور) و ظهور نخستین تخم‌های بالغ قهوه‌ای را در این گونه در آگوست گزارش نمودند. این محققین ظهور تخم‌های قهوه‌ای را به ظاهر شدن اولین تخمک‌های زرده‌ای در برش بافت‌شناسی تخمدان در همان ماه ربط دادند. در این مطالعه شروع بلوغ تخم در *A. astacus* توسط ظهور تخم‌های زرد در ژوئن (خرداد) معین شده است. اما در *A. leptodactylus* تخم‌های زرد در ماه مرداد (آگوست) ظاهر شدند در حالی که یافته‌های بافت‌شناسی حاکی از آن است که بلوغ تخمک‌های پیش هسته‌ای در تیر ماه (جولای) آغاز شده است. بنابراین در تحقیق حاضر بدلیل عدم انطباق کامل تغییر رنگ گناد با هریک از مراحل رسیدگی، تعیین مرحله رسیدگی (به‌ویژه در مراحل نخست رسیدگی جنسی) از روی ظاهر و رنگ دقت کافی را نداشته و برای این امر نیاز به بررسی بافت‌شناسی می‌باشد.

آنچه از مطالعه بافت تخمدان *A. leptodactylus* در شرایط پرورشی حاصل شد نشانگر وجود هفت مرحله مشخص توسعه و رشد تخمدان و وجود شش نوع سلول تخمک از لحاظ ویژگی‌های میکروسکوپی بوده است. در مطالعات بافت‌شناسی تخمدان برخی از گونه‌های خرچنگ دراز آب شیرین شامل *Ch. destructor*، *Ch. cainii*، *Clark, 1936*، *Ch. quinquecarinatus*، *A. astacus* نیز تکامل و رسیدگی تخمدان به ۷ مرحله تقسیم شده و ۶ نوع تخمک بر اساس خصوصیات سلولی معرفی گردیدند که عبارت‌اند بودند از: (۱) اووگونی، (۲) تخمک‌های پیش هسته‌ای (مرحله ابتدایی رشد تخمک و قبل از زرده‌گیری) یا مرحله II

بدون انجام تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی امکان‌پذیر می‌سازد (Arculeo et al., 1995; Lopez-Greco and Rodriguez, 1999). در مطالعه حاضر تخمدان *A. leptodactylus* تمایز مشخصی در اندازه و رنگ در طی مراحل رسیدگی جنسی گناد نشان داد. آنچه در بررسی‌های ظاهری بر روی تخمدان *A. leptodactylus* حاصل شد تقریباً مانند نتایج به‌دست آمده در گونه‌های *Ch. destructor* Clark, 1936، *Ch. cainii*، *Ch. quinquecarinatus*، *A. astacus* بوده است. در این گونه‌ها در مراحل اولیه رسیدگی جنسی، تخمدان با اندازه‌ای کوچک و کم حجم و رنگ روشن کرم همراه با تخمک‌های بسیار ریز روشن مشخص شده است و هرچه به مراحل بالاتر رسیدگی نهایی جنسی پیش رفته و نزدیک به ریزش تخم می‌شود تخمدان بزرگ‌تر شده و تخم‌ها نیز بزرگ‌تر و پررنگ‌تر می‌شوند تا جاییکه در مراحل نهایی رسیدگی جنسی تمامی بافت تخمدان از تخم‌های قهوه‌ای تیره (در مورد *A. astacus*) و یا زیتونی تیره (در مورد *Ch. destructor* Clark, 1936) پر شده و قسمت قابل توجهی از محوطه پشتی ناحیه زیر کاراپاس را به خود اختصاص داده‌اند (Beatty et al., 2003; Beatty et al., 2005a,b; Lucić et al., 2006). همکاران (۲۰۰۷) بیان نمودند که مقدار زرده تخمک‌ها در مرحله دوم زرده‌سازی در تخمدان افزایش می‌یابد که این امر منجر به تغییر رنگ گناد می‌شود. علاوه بر این، بر اساس مطالعات Charniaux (۱۹۸۰) رنگ تخمدان به دلیل حضور رنگدانه‌های کاروتنوئید در ذخیره ویتلوژن تخمک‌ها ذکر شده است (Castiglioni et al., 2007). همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه روی *A. astacus*، رسیده شدن

بالا بودن در تیر و آبان بود. مطالعه بافت‌شناسی از نمونه‌های تیر ماه نشان داد با وجود بالا بودن میزان GSI در این نمونه‌ها برش‌های بافت‌شناسی بیضه حاوی لوله‌های سمینی فر محتوی اسپرماتوسیت بوده که بخشی از بافت بیضه هم حالت تحلیل رفته داشته به طوری که حتی لوله‌های سمینی فر هم در آن مشخص نبوده‌اند. اما نمونه‌های ماه آبان دارای لوله‌های سمینی فر مملو از اسپرم بوده‌اند و در آذر اکثر لوله‌های سمینی فر خالی بوده است. طبق محاسبه میانگین GSI برای مراحل مختلف رسیدگی جنسی در نرها و بررسی اختلاف معنی‌دار آماری بین آن‌ها مشاهده شد که مرحله II و VII به طور معنی‌داری کمتر از مراحل III، IV و V بودند و سه مرحله رسیدگی جنسی اخیر از نظر GSI تقریباً مشابه و فاقد اختلاف معنی‌دار آماری بودند. بنابراین می‌توان گفت که میزان GSI شاخص مناسبی جهت پی بردن به زمان پر شدن گناد از اسپرم نبوده است و در نتیجه برای تعیین زمان جفت‌گیری به مشاهدات میکروسکوپی بافت گناد نیاز است. در مطالعه بر روی *Ch. quinquecarinatus* مشاهده شد که الگوی پیشینه و کمینه میزان GSI در نر و ماده با هم مشابه بوده‌اند. در این مطالعه دلیل تشابه زمانی پیک‌های شاخص گنادی نرها و ماده‌ها و نیز وجود چندین پیک در زمان‌های مختلف، نشانه طیف زمانی وسیع جفت‌گیری برای این گونه بیان شد (Beatty et al., 2005b). در حالی که نتایج بافت‌شناسی در گناد مولدین نردر تحقیق حاضر نشان داد که در تیرماه لوله‌های سمینی فر محتوی اسپرماتوسیت بودند و در واقع گناد در مرحله II رسیدگی قرار داشت. در نمونه‌های ماه آبان لوله‌های سمینی فر مملو از اسپرم بودن که نشانگر مرحله V رسیدگی بود و در آذر اکثر لوله‌های سمینی

(Perinucleolar Oocyte)، ۳) تخمک‌های واجد وزیکول‌های زرده ای اولیه (مرحله III یا ابتدای مرحله زرده‌سازی)، ۴) تخمک‌های واجد وزیکول‌های زرده انتهایی (مرحله IV یا انتهای زرده‌سازی)، ۵) تخمک‌های واجد گرانول‌های زرده‌ای (مرحله V) و ۶) تخمک‌های رسیده (مرحله VI) (Beatty et al., 2003; Beatty et al., 2005a,b; Lucić et al., 2006).

تشخیص شش مرحله رسیدگی ظاهری در گناد نر در تحقیق حاضر، منطبق بر تقسیم‌بندی صورت گرفته برای مراحل رسیدگی گنادنر در گونه‌های *Ch. destructor* Clark, 1936، *Ch. cainii*، *A. astacus*، *quinquecarinatus* (Beatty et al., 2003; Beatty et al., 2005a,b) در حالی که برخلاف مطالعات مذکور، در نمونه‌های بافت‌شناسی مطالعه حاضر تنها پنج مرحله از شش مرحله رسیدگی جنسی مولدین نر تشخیص داده شد. تصاویر بافت‌شناسی از گناد نر در مطالعه حاضر، نشانه‌هایی از تحلیل یافتگی بافت گناد را در فصل پاییز (از شهریور تا آذر) نشان می‌دهد. همچنین اسپرماتوسیت‌ها در اکثر نمونه‌های ماه‌های مورد مطالعه حضور داشته‌اند اما میزان حضور لوله‌های سمینی فر حاوی اسپرماتوسیت در نمونه‌های مربوط به فصل پاییز کمتر بوده است. همچنین تصاویر بافتی نمونه‌های فصل پاییز وجود دو بخش مشخص در بافت بیضه را نشان می‌دهد بخشی که اکثر لوله‌های سمینی فر خالی بوده و تنها سلول‌های سرتولی در حاشیه لوله باقی مانده‌اند و بخش دیگر را لوله‌های سمینی فری تشکیل داده‌اند که محتوی مقدار زیادی اسپرماتوزوآ می‌باشند.

از سوی دیگر نتایج شاخص گنادی در تحقیق حاضر حاکی از کم بودن GSI در ماه آذر و در عوض

Borkowska (۱۹۹۹) در مطالعه روی *O. limosus* متوجه شدند که در بهار لوله‌های بیضه‌ای برخی از نرها حاوی اسپرم کافی است که این اجازه را می‌دهد تا لقاح در بهار انجام گیرد. همان‌طور که در بررسی میکروسکوپی بافت بیضه *A. leptodactylus* تحقیق حاضر نیز مشاهده شد که لوله‌های سمینی فر این گونه در فصل پاییز پر از اسپرم بوده است در این زمان نرها اسپرم را به ماده‌ها منتقل می‌کنند و لقاح انجام می‌گیرد زیرا تخمدان حاوی تخمک‌هایی است که رشدشان رو به کامل شدن است و آماده اوولاسیون می‌باشند. در حالی که در *O. limosus* با وجود انتقال اسپرم به ماده‌ها در پاییز لقاح نمی‌تواند در این زمان صورت گیرد چرا که تخمدان حاوی تخمک‌هایی است که رشدشان کامل نشده است و برای اوولاسیون آماده نمی‌باشند (Juchno and Chybowski, 2003).

مطالعه بافت‌شناسی تخمدان نمونه‌های آبان با وجود کم بودن میزان GSI در آن‌ها نشان داد که این نمونه‌ها در مرحله V رسیدگی جنسی قرار داشته‌اند و نمونه‌های مربوط به آذر و بهمن در مرحله VI بوده‌اند در حالی که نمونه‌های اسفند ماه در مرحله VII قرار داشته‌اند. آنچه در مورد زمان جفت‌گیری و تخم‌ریزی *A. leptodactylus* در شرایط پرورشی و از مطالعات بافت‌شناسی به‌دست آمده است با نتایج حاصل از تحقیق دانش و همکاران در سال ۱۳۸۴ که زمان آغاز تکثیر طبیعی در خرچنگ دراز سد ارس را از ۱۱ آذر تا ۱۶ خرداد ذکر نموده‌اند (دسامبر الی ژوئن) موافق می‌باشد. این در حالی است که در ترکیه زمان جفت‌گیری در اکتبر و نوامبر (از مهر تا اوایل آذر) ذکر گردیده است (Koksal, 1988) که می‌تواند

فر خالی بودند که مشخصات مرحله VI رسیدگی را داشتند. از طرفی وقتی در ماه آذر GSI ماده‌ها در بالاترین میزان بود GSI نرها در پایین‌ترین مقدار قرار داشت این نتیجه می‌تواند نشانگر این باشد که گناد نر از اسپرم خالی شده است و چون تخمک‌ها در مولدین ماده در همان زمان در مرحله آخر رسیدگی و آماده اوولاسیون بوده‌اند لذا می‌توان گفت عمل لقاح نیز در آذر صورت گرفته است. Chybowski و Juchno (۲۰۰۳) با مطالعه بر روی خرچنگ دراز آب شیرین *Orconectes limosus* RAF نشان دادند که در اکتبر (مهر تا آبان) شاخص GSI ماده‌ها ۳/۶۹ بوده و تخمک‌های پیش‌هسته‌ای نسبت به تخمک‌های فاز دوم زرده‌سازی (مرحله IV) تعدادشان کمتر بوده است. با نزدیک شدن زمستان از نوامبر (آذر) تا مارس (اسفند - فروردین) تصاویر بافت‌شناسی تخمدان در این گونه شبیه هم بود و تخمدان‌ها حاوی تخم‌های فاز دوم زرده‌سازی بودند که حجمشان افزایش یافته بود. در زمستان تخمدان‌ها سبز تیره بودند و شاخص GSI از ۴/۲۲ در نوامبر (آذر) به حداکثر ۵/۸۳ در مارس (اسفند - فروردین) رسید. آن‌ها همچنین بیان نمودند که برخلاف گونه‌های *A. astacus* و *A. leptodactylus* که در پاییز لقاح یافته و تخم‌ریزی می‌نمایند، گونه *O. limosus* در بهار لقاح می‌یابد و در همان زمان تخم‌های بالغ در زیر شکم ماده‌ها گذاشته می‌شوند. بنابراین در مطالعه روی *O. limosus* مشخص شد که با وجود انتقال اسپرم به ماده‌ها در پاییز، به‌دلیل آنکه تخمدان حاوی تخمک‌هایی بودند که رشدشان کامل نشده بود و برای اوولاسیون آماده نبودند بنابراین لقاح نمی‌توانسته در پاییز صورت گرفته باشد (Juchno and Chybowski, 2003). همچنین Ulikowski و

تخمندان فصل بهار بوده است. از آنجا که در مطالعات مربوط به بیولوژی تولید مثل این گونه در طبیعت موجود در دریاچه سد ارس (دانش و همکاران، ۱۳۸۴) فصل پاییز به عنوان زمان جفت گیری و زمستان تا بهار فصل تکثیر این گونه بیان شده است بنابراین می توان گفت که زمان تولید مثل خرچنگ های پرورشی به زمان تولید مثل آن ها در طبیعت نزدیک بوده است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند سپاسگزاری می کنیم.

منابع

- دانش خوش اصل، ع.، کریمپور، م.، حسین پور، ن.، ۱۳۸۴. بررسی زیست شناسی شاه میگوی آب شیرین *Astacus leptodactylus* دریاچه مخزنی سد ارس. اولین همایش بین المللی زیست شناسی دانشگاه گیلان، ص ۱۷۴-۱۷۳.
- صمدزاده، م.، ۱۳۷۴. بررسی امکان تکثیر نیمه طبیعی خرچنگ آب شیرین و پرورش نوزادان تا مرحله خرچنگ های جوان (*Astacus leptodactylus*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران. ۱۱۹ص.
- Abdu, U., Yehezkel, G., Sagi, A., 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction Evolution*, 37, 75-83.
- Adiyodi, K.G., Subramoniam, T., 1983. Arthropoda –Crustacea. In: Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. (Eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates: Oogenesis, Oviposition and Obsorption*, Wiley and Sons, London, 1, 443-495.
- Adiyodi, K.G., Anikumar, G., 1988. Arthropoda – Crustacea. In: Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. (Eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates: Accessory Glands*, Oxford and IBH Publishing, New Delhi, India, 3, 261-318.

به دلیل قرار داشتن ترکیه در شرایط آب و هوایی سردتر نسبت به منطقه ما باشد.

در مطالعه حاضر همچنین عدم اختلاف معنی دار بین سه تیمار تراکم در مورد شاخص گنادی نشانگر عدم تأثیر تراکم بر میزان رسیدگی جنسی بود. هرچند مطالعات زیستی و فیزیولوژیکی تولید مثل در آبزیان نشان دهنده آن است که فاکتورها و عوامل متعددی بر وضعیت تولید مثلی تأثیر گذارند اما قابلیت شاخص GSI در تعیین وضعیت تولید مثلی اهمیت ویژه ای دارد (Beatty *et al.*, 2003). بنابراین طبق نتایج به دست آمده در مورد مقایسه شاخص های گنادی مولدین ماده و نر در بین سه تیمار می توان گفت که مولدین تیمار سوم از وضعیت تولید مثلی بهتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند. هرچند که بالا بودن میزان GSI در این تیمار می تواند به علت زیادتر بودن میانگین وزنی مولدین تیمار مذکور نسبت به دو تیمار دیگر بوده باشد. لذا نظر قطعی در مورد تأثیر گذاری تراکم مولدین خرچنگ دراز آب شیرین در استخر پرورشی بر میزان رسیدگی جنسی و موفقیت تولید مثلی آن ها نیاز به مطالعات وسیع تری دارد.

با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر می توان نتیجه گرفت که شاخص تراکم مولدین در متر مکعب تأثیر قابل توجهی بر رسیدگی جنسی نداشته است. همچنین تعیین دقیق مراحل رسیدگی جنسی *leptodactylus* تنها از طریق بافت شناسی گناد امکان پذیر است و استفاده از مشخصات ظاهری و رنگ گناد تنها در مرحله نهایی رسیدگی جنسی مولدین ماده می تواند مفید واقع شود. در خرچنگ های دراز در شرایط پرورشی موجود در تحقیق حاضر، زمان لقاح آذر ماه، زمان تخم ریزی زمستان و زمان بازیابی

16. Charniaux-Cotton, H., 1980. Experimental studies of reproduction in Malacostraca crustaceans. In: Clark, W. H., Adams, T. S., (Eds). Description of vitellogenesis and of its endocrine control in Advanced Invertebrate Reproduction, North Holland, Elsevier. 177-185.
17. Costa, T.M., Negreiros-Fransozo, M.L., 1998. The reproductive cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba region, Brazil. *Crustaceana*, 71(6), 615-627.
18. Flores, A. A., Saraiva, J. and Paula, J., 2002. Sexual maturity, reproductive cycles, and juvenile recruitment of *Perisesarma guttatum* (Brachyura, Sesarmidae) at Ponta Rasa Mangrove swamp, Inhaca Island, Mozambique. *Journal of Crustacean Biology*, 22, 143-156.
19. Haefner, P. A., Spaargaren, D. H., 1983. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L). 1. Weight and volume relationships. *Journal of Crustacean Biology*, 13(3), 523-531.
20. Juchno, D., Chybowski, L., 2003. Histological Analysis of gonad development in female Spiny-cheek Crayfish *Orconectes limosus* RAF. *Archives of Polish Fisheries*, 11(1), 69-78.
21. Koksall, G., 1988. *Astacus leptodactylus* in Europe. In: *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation* (Eds by D.M. Holdich and R.S. Lowery), Chapman and Hall, London, 365-400.
22. Krol, R.M., Hawkins, W.E., Overstreet, R.M., 1992. Reproductive components. In: Harrison, F.W., Ruppert, E. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod Crustacea*, 10, 295-343.
23. Lopez-Greco, L. S., Rodriguez, E. M., 1999. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). *Cahiers de Biologie Marine*, 40, 155-164.
24. Lucić, A., Erben, R., Lackovic, G., 2006. Morphological Changes in *Astacus Astacus* gonads during the reproductive cycle. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture*, 380-381, 1183-1196.
25. Meusy, J.J., Payen, G.G., 1988. Female reproduction in malacostracan crustacean. *Zoological Science*, 5, 217-265.
26. Minagawa, M., Chiu, J.R., Kudo, M., Ito, F., Takashima, F., 1993. Female reproductive biology and oocyte development of the red
6. Alonso-Fernández, A., Alós, J., Grau, A., Domínguez-Petit, R., Saborido-Rey, F., 2011. The Use of Histological Techniques to Study the Reproductive Biology of the Hermaphroditic Mediterranean Fishes *Coris julis*, *Serranus scriba*, and *Diplodus annularis*. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, 3, 145-159.
7. Ando, H., Makioka, T., 1998. Structure of ovary and mode of oogenesis in a freshwater crayfish, *Procambarus clarkia* (Girard). *Zoological Science*, 15, 893-901.
8. Ando, H., Makioka, T., 1999. Structure of the ovary and mode of oogenesis in a freshwater crab *Potamon dehaani*. *Journal of Morphology*, 239, 107-114.
9. Arculeo, M., Payen, G., Cuttitta, A., Galieto, G., Riggio, S., 1995. A survey of ovarian maturation in a population of *Aristaeus antennatus* (Crustacea: Decapoda). *Animal Biology*, 4, 13-18.
10. Beatty, S. J., Morgan, D., Gill, H., 2003. Reproductive biology of the large fresh water cray fish *Cherax cainii* in south western Australia. *Marine and Freshwater Research*, 54, 597-608.
11. Beatty, S. J., Morgan, D., Gill, H., 2005a. Role of life history strategy in the colonisation of Western Australian aquatic systems by the introduced crayfish *Cherax destructor* Clark, 1936. *Hydrobiologia*, 549, 219-237.
12. Beatty, S. J., Morgan, D., Gill, H., 2005b. Life history and reproductive biology of the gilgie, *Cherax quinquecarinatus*, a fresh water cray fish endemic to south Western Australia. *Journal of Crustacean Biology*, 25(2), 251-262.
13. Browdy, C.L., Fainzilber, M., Tom, M., Loya, Y., Lubzens, E., 1990. Vitellin synthesis in relation to oogenesis in invitro-incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Journal of Experimental Zoology*, 255, 205-215.
14. Castiglioni, D.S., Santos, S., 2001. Reproductive aspects of *Cyrtograpsus angulatus* Dana, 1851 (Brachyura, Grapsidae) in the Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul State, Brazil. *Nauplius*, 9(1), 11-20.
15. Castiglioni, D.S., Negreiros-Fransozo, M.L., López Greco, L.S., Silveira, A.F., Silveira, S.O., 2007. Gonad development in females of fiddler crab *Uca rapax* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) using macro and microscopic techniques. *Iheringia, Sér. Zoology, Porto Alegre*, 97(4), 505-510.

32. Simons, M.J., Jones, M.B., 1981. Population and reproductive biology of the mud crab *Macrophthalmus hirtipes* (Jacquinot, 1983) (Ocypodidae) from marine and estuarine habitats. *Journal of natural Histology*, 15, 981-994.
33. Subramoniam, T., 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C125(2), 135-156.
34. Tan-Fermin, J.D., Pudadera, R.A., 1989. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 78, 229-242.
35. Ulikowski, D., Borkowska, I. 1999. Do Spiny-Cheek crayfish *Orconectes limosus* (RAF.) Mate in fall or spring?. *Komun. Ryb.*, 3, 4-6 (in polish).
36. Vogt, G., 2002. Functional Anatomy. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*, Blackwell Science, London, 53-152.
37. Yano, I., 1988. Oocyte development in the "kuruma" prawn, *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86B, 213-218.
27. O'Donovan, P., Abraham, M., Cohen, D., 1984. The ovarian cycle during the inter moult in ovigerous *Macrobarchium rosenbergi*. *Aquaculture*, 36, 347-358.
28. Obradovic, J., 1982. Histomorphological features of the male reproductive organs of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.). Doctoral disertation, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb 1-116 (in Croatian).
29. Pinheiro, M. A. A., and Fransozo, A., 1998. Sexual maturity of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Decapoda, Brachyura, Portunidae), in the Ubatuba littoral, São Paulo State, Brazil. *Crustaceana*, 71(4), 435-452.
30. Santos, S., Negreiros-Fransozo, M. L., 1999. Reproductive cycle of the swimming crab *Portunus spinimanus* Latreille (Crustacea, Decapoda, Brachyura) from the Ubatuba, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(4), 1183-1193.
31. Sellos, D., Legal, Y., 1981. Changes in basic nuclear proteins during sperm maturation in *Palaemon serratus* (Crustacea, Natantia). *Cell Growth Differentiation*, 10(2), 69-77.

Archive