

مطالعه هیستوفیزیولوژیک بیضه در گربه کوسه عربی *Chiloscyllium arabicum*

خلیج فارس طی دو فصل تولیدمثلی و غیر تولیدمثلی

فریده پرفروغ^۱، نگین سلامات^{۱*} و عبدالعلی موحدی‌نیا^۲

^۱ خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، گروه زیست دریا

^۲ بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم دریایی، گروه زیست دریا

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۶

چکیده

مطالعه حاضر باهدف بررسی ساختار بافتی و عملکرد ترشحی گناد نر در گربه کوسه عربی (*Chiloscyllium arabicum*) (Gubanov, 1980) خلیج فارس در طی دو فصل بهار و پاییز انجام گرفت. بدین منظور، ساختار بافتی گناد نر (بیضه) و سطح پلاسمایی هورمون تستوسترون در دو فصل پاییز (اواخر شهریور-آذر) و بهار (اسفند-خرداد) در *C. arabicum* ارزیابی شدند. بدین منظور، ۳۰ قطعه *C. arabicum* از بندر بحرکان واقع در هندلیجان به صورت فصلی صید شد. ماهی‌ها بیهوش شده و پس از بیومتری، نمونه‌های خونی از سیاهرگ دمی اخذ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، نمونه‌های بافتی از بیضه اخذ و در محلول ثبوت بوئن برای ۴۸ ساعت تثبیت شدند. مقاطع بافتی با استفاده از تکنیک‌های بافت‌شناسی معمول و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین تهیه شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. سطح پلاسمایی تستوسترون نیز در نمونه‌های پلاسمای اندازه‌گیری شد. براساس نتایج، بیضه گربه کوسه عربی لوبوله بوده و هر لوبول از تعدادی واحد کروی شکل به نام اسپرماتوسیت تشکیل شده بود که سلول‌های اسپرماتوزئیک در مراحل مختلف تکامل از جمله اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها در این واحدها مشاهده شدند. اسپرماتوسیت‌ها در هفت مرحله تکاملی متفاوت در بیضه ماهیان در طول فصل بهار مشاهده شد، در حالیکه، تنها پنج مرحله اول در ماهیان در طول فصل پاییز شناسایی شدند. سطوح پلاسمایی هورمون تستوسترون در فصل بهار نسبت به فصل پاییز بالاتر بود. در مجموع، گنادها در گربه کوسه‌های نر دارای فعالیت بیشتری در فصل بهار نسبت به فصل پاییز بودند و به نظر می‌رسد فصل بهار فصل تولیدمثلی گربه کوسه عربی خلیج فارس است.

واژه‌های کلیدی: بیضه، تستوسترون، تولیدمثل، خلیج فارس، گربه کوسه عربی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۱۶۵۱۴۶، پست الکترونیکی: salamatnegin@gmail.com

مقدمه

تخم‌گذاری (زمانی که جنین خارج از بدن مادر تکامل می‌یابد) و زنده‌زایی (زمانی که جنین درون بدن مادر تکامل می‌یابد) تقسیم‌بندی نمود (۱۹). تولیدمثل در ماهیان غضروفی همچون مهره‌داران به فعالیت‌های هماهنگ هورمون‌های مختلف محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد بستگی دارد (۲۶).

ساختار بافتی بیضه و مراحل اسپرماتوزئز ماهیان غضروفی

ماهیان غضروفی از دوره سیلورین تاکنون تغییرات عمده‌ای نداشته‌اند. بخشی از این موفقیت به علت ویژگی‌های تولیدمثلی آن‌ها از جمله لقاح داخلی می‌باشد (۱۳). رشد آهسته، تأخیر در بلوغ جنسی، باروری پایین و یک چرخه تولیدمثلی طولانی از دیگر ویژگی‌های تولیدمثلی این ماهیان می‌باشد (۲۴). روش‌های تولیدمثلی ماهیان غضروفی را می‌توان براساس تکامل جنین به دو نوع شامل

سیستم تولیدمثلی در کوسه‌ماهیان نر صورت نگرفته و مطالعات موجود در ارتباط با گربه کوسه‌ها به ساختار غده رکتال، کبد، طحال، کلیه و آبشش این ماهیان می‌پردازد (۲، ۵ و ۷). در سایر کشورها نیز عمده مطالعات صورت گرفته بر ماهیان الاسمویرانش در ارتباط با سفره ماهیان می‌باشد. کاساب و همکاران (۲۰۰۹)، شکل ظاهری و ساختار بافتی بیضه‌های گربه کوسه لکه‌دار را مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند لوبول‌های بیضه این ماهیان در ناحیه پشتی شکمی آرایش یافته‌اند (۱۵). همچنین کوندمورنو و گالواناگانا (۲۰۰۶) در بررسی زیست‌شناسی تولیدمثل کوسه (*Isurus oxyrinchus*) وجو هفت مرحله در بلوغ اسپرماتوزن این ماهیان را شرح دادند (۹). بنابراین، تحقیق حاضر باهدف مطالعه هیستولوژیک و هیستومتریک بیضه در طی دو فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی و همچنین بررسی تغییرات هورمون تستوسترون طی دو فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی در گربه کوسه عربی نر انجام پذیرفت.

مواد و روشها

۱. نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از آب‌های خور بحرکان (طول جغرافیایی $49^{\circ} 30'$ تا $49^{\circ} 55'$ شرقی و عرض جغرافیایی $30^{\circ} 15'$ تا $29^{\circ} 50'$ شمالی)، واقع در بندر هنديجان در شمال غرب خلیج فارس (شکل ۱)، در پاییز سال ۱۳۹۴ (شهریور-آذر) و بهار سال ۱۳۹۵ (اسفند-خرداد) با صید ۳۰ قطعه گربه کوسه عربی نر (C. *arabicum*) توسط تور ترال (به‌صورت زنده)، در هر فصل انجام شد (در این روش صیادان تور بزرگی را به آب انداخته و ماهیان زیادی را صید می‌کنند که در این میان تعدادی ماهی ناخواسته نظیر گربه کوسه عربی نیز صید و دور ریز می‌شود. که در تحقیق حاضر از صیادان خواسته شد به‌جای دورریز، این ماهیان در اختیار تحقیق حاضر قرار بگیرند). زمان نمونه‌برداری بر اساس اطلاعات موجود

منحصر به فرد است. از جمله اینکه ساختار بیضه این ماهیان به‌صورت قطعاتی سازماندهی شده است که به هر قطعه اسپرماتوسیت گفته می‌شود. همچنین آرایش مناطق در اسپرماتوسیت‌ها خاص بوده و ارتباط نزدیکی میان بیضه و اندام اپیگنال خونساز وجود دارد (۱۷). در برخی ماهیان غضروفی، فعالیت اسپرماتوزن در طول سال ادامه دارد و در برخی دیگر، این فعالیت تنها در دوره‌های مشخص قابل مشاهده است (۳). سلول‌های جنسی موجود در اسپرماتوسیت‌ها با استفاده از تقسیم میتوز و میوز در طول مراحل اسپرماتوزن به شکل اسپرم در می‌آیند (۸).

گربه کوسه عربی (*Persian Bamboo shark*) (*Chiloscyllium arabicum*) از رده ماهیان غضروفی و از خانواده گربه کوسه‌های دم بلند و از ماهیان بومی خلیج فارس می‌باشد. پرورش این کوسه‌ها در آکواریوم‌ها رایج بوده و به علت اندازه کوچک (بیشترین طول کل ۹۷ سانتی‌متر)، غیر مهاجر بودن و داشتن خوی رام، زمینه تحقیقات آزمایشگاهی فراوانی را به وجود آورده‌اند. علاوه بر این گربه کوسه‌ها به آسانی به اسارت سازش می‌یابند و به‌راحتی قابل استفاده و در دسترس هستند. به همین دلیل، گونه گربه کوسه یک مدل ایده آل برای مطالعات اکولوژی زیست‌شناسی است (۱۸).

صید گربه کوسه‌ماهیان این ماهیان در کشورهای نظیر تایلند، مالزی، فیلیپین و چین جهت مصرف خوراکی بسیار بالا است. همچنین تجارت آکواریومی این ماهیان به دلیل خوی آرام آن‌ها به‌طور گسترده‌ای انجام می‌شود (۱۸). اما باوجود اهمیت شیلاتی و اکولوژیک زیاد این ماهیان، مطالعات بسیار محدودی در زمینه زیست‌شناسی تولیدمثل آن‌ها صورت گرفته است و لذا، کسب اطلاعات پایه‌ای و توصیف ویژگی‌های زیست‌شناختی، جهت حفظ و نگهداری از ذخایر ارزشمند این ماهیان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنا به تحقیق نویسندگان مقاله حاضر، تا به حال مطالعه‌ای در ایران در ارتباط با ساختار بافتی

با استفاده از رنگ‌آمیزی معمولی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری (مدل Olympus CX21-Olympus-ژاپن) و با بزرگنمایی‌های متفاوت بررسی و تصاویر مناسب توسط دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ Dino-lite Digital Microscope و سیستم رایانه‌ای متصل به دوربین مجهز به نرم‌افزار Dino capture تهیه و ذخیره شد.

به منظور مطالعه هیستومتریک گناد نر گربه کوسه ماهیان، از هر نمونه ۵ مقطع بافتی و در هر مقطع، ۵ فیلد میکروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفت. در مقاطع بیضه، انواع اسپرماتوسیت‌های بیضه در مراحل مختلف رشد و قطر اسپرماتوسیت‌ها در هر دو فصل اندازه‌گیری شد.

۳. اندازه‌گیری سطح پلاسمایی هورمون تستوسترون: هورمون تستوسترون به روش رادیوایمونواسی توسط دستگاه گاما کانتر (LKB تمام اتوماتیک ساخت کشور فنلاند) و با استفاده از کیت تجاری Immunotech (شرکت Immunotech، مارسی فرانسه) مطابق روش فوستیر و جالبرت (۱۹۸۶) اندازه‌گیری شد.

۴. آنالیز آماری: تمام داده‌های بدست آمده در مطالعه حاضر به شکل میانگین \pm خطای استاندارد بیان شد. سپس، با استفاده از تست نرمالیتی Shapiro-wilk نرمالیتی داده‌ها کنترل شد و اختلاف بین این داده‌ها در دو فصل بهار و پاییز با استفاده از T-تست (Independent-samples T Test) در نرم‌افزار SPSS 16 انجام و اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵ درصد ($P < 0/05$) پذیرفته شد. در نهایت نمودارها در محیط Microsoft Office Excel 2007 ترسیم شدند.

نتایج

گربه کوسه عربی از لحاظ ریخت‌شناسی دارای بدنی دوکی‌شکل و کشیده است. بدن این ماهی به رنگ

در ارتباط با زمان تولیدمثل برخی از ماهیان دریایی موجود در خلیج فارس انتخاب شد.



شکل ۱- منطقه نمونه‌برداری درخور بحرکان واقع در شمال غرب خلیج فارس

در هر بار نمونه‌برداری پس از بیهوش کردن گربه کوسه-های عربی با استفاده از عصاره گل میخک در آب (20 mg/l)، طول کل بدن و وزن هر ماهی اندازه‌گیری و ثبت شد. ابتدا جهت اندازه‌گیری هورمون تستوسترون، مقدار ۵ میلی‌لیتر خون از ناحیه سیاهرگ دمی (درست در پشت باله مخرجی) با استفاده از سرنگ هپارینه اخذ و خون به آرامی به لوله‌های آزمایش هپارینه روی یخ منتقل شد. نمونه‌های خون سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rmp توسط دستگاه Hettich مدل D-7200 سانتریفیوژ شده و پلاسما تا زمان سنجش هورمون‌ها در 80°C -درجه سانتی-گراد ذخیره شد. سپس ماهیان تشریح شده و بیضه‌ها از بدن خارج و به ظروف حاوی محلول ثبوت بوئن منتقل شدند (۱۱).

۲. مطالعه بافتی: پس از ۴۸ ساعت نمونه‌ها جهت انجام مراحل پاساژ بافتی به درون سبدهای کوچکی منتقل گردیدند. کلیه مراحل پاساژ بافتی به صورت اتوماتیک و با استفاده از دستگاه پاساژ بافتی یا هیستوکینت (مدل RX-11B, Tissue tek rotary, Japon) انجام گرفت و پس از آن نمونه‌های بافتی قالب‌گیری شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم (مدل LEICA-RM2245)، برش‌هایی با ضخامت ۵-۶ میکرومتر، از آن‌ها تهیه شد. مقاطع بافتی سپس

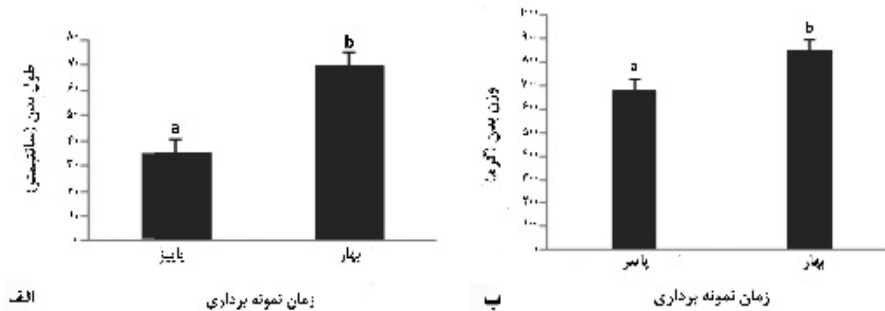
شکل ۳، مقادیر بدست آمده از زیست‌سنجی گربه کوسه عربی صید شده در دو فصل پاییز و بهار را نشان می‌دهد. براین اساس، گربه کوسه‌های صید شده در فصل بهار از نظر وزنی ($P < 0/05$ و $t = 6/32$) و طولی ($P < 0/05$ و $t = 24/12$) نسبت به فصل پاییز به‌طور معنی‌داری بزرگتر بودند.

بیضه‌های گربه کوسه عربی در هر دو فصل بهار و پاییز به‌صورت اندام‌های کشیده و صورتی کم‌رنگ در داخل حفره شکمی بدن و در سطح داخلی اندام اپیگونال (Epigonal organ) قرار داشته و توسط مزورکیوم (Mesorchium) از دیواره شکم معلق هستند.

خاکستری رنگ بوده و در ناحیه شکمی کمی روشن‌تر به نظر می‌رسد. این‌گونه دارای چشم‌های بزرگ، دهان بزرگ و نسبتاً ضخیم به حالت عرضی کاملاً در جلوی چشم‌ها می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- شکل ظاهری گربه کوسه عربی



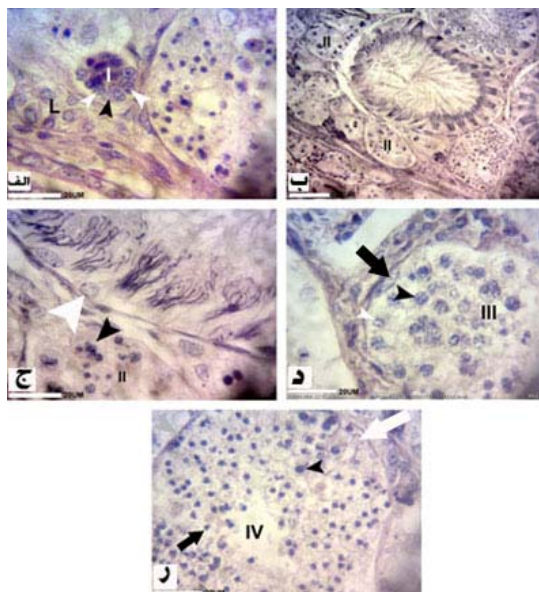
شکل ۳- میانگین وزن و طول کوسه‌های صید شده بر اساس فصل. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است ($P < 0/05$)

اسپرمتوزونیک در مراحل مختلف تکامل از جمله اسپرماتوگونی (Spermatogonia)، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها (Spermatids) می‌باشد که توسط سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی (Sertoli) و یک غشای پایه احاطه شده‌اند (شکل ۵ د). سلول‌های سرتولی دارای هسته‌ای کوچک و آمیبی شکل بوده و روی غشای پایه قرار دارند (شکل ۵ ج و د). فضاهای بین این اسپرماتوسیت‌ها را بافت همبند، رگ‌های خونی و سلول‌های آندوکرینی بینابینی (سلول‌های لایدیگ) (Leydig cells) پرکرده است (شکل ۵ ب). سلول‌های لایدیگ سلول‌هایی بزرگ با هسته کروی بزرگ، سیتوپلاسمی واکوئله و ائوزینوفیلی و غنی از قطرات چربی هستند و معمولاً به‌صورت منفرد یا به‌صورت اجتماعات سلولی کوچک در فضای بین بافتی و لوبول‌های بیضه دیده می‌شوند (شکل ۵ ب).

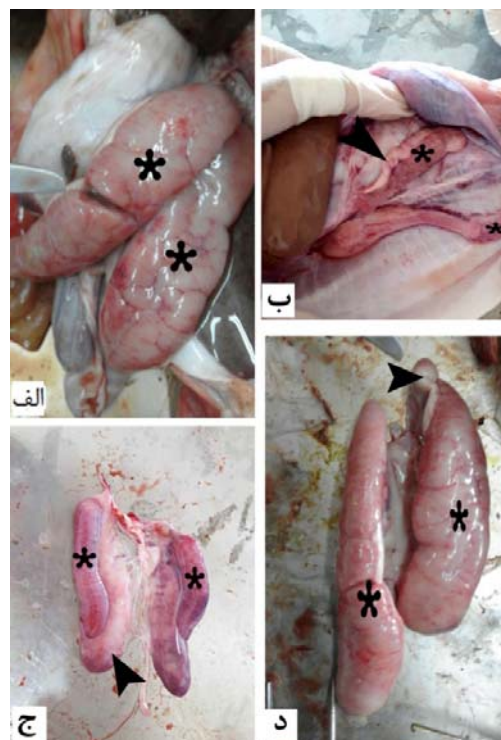
بیضه‌ی سمت راست از بیضه‌ی سمت چپ بزرگتر است (شکل ۴). در فصل بهار بیضه‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای بزرگ‌شده و حجم قابل توجهی از محوطه شکمی را اشغال کرده بودند.

براساس نتایج، ساختار بافتی بیضه‌های گربه کوسه عربی (*C. arabicum*) به شرح زیر بود: بیضه‌ها از بیرون توسط کپسول نازکی به نام سفید پرده (Tunica albuginea) پوشیده شده‌اند (شکل ۵ الف). تیغه‌هایی از سفید پرده به داخل بافت بیضه امتداد یافته و پارانشیم بافت بیضه را به قطعاتی به نام لوبول تقسیم می‌کنند (شکل ۵ الف). هر لوبول از تعدادی واحد کروی شکل به نام اسپرماتوسیت (Spermatocysts) تشکیل شده است (شکل ۵ ب و ج). اسپرماتوسیت‌ها، واحدهای عملکردی بیضه‌ها در گربه کوسه عربی بوده و ساختار آن‌ها متشکل از سلول‌های

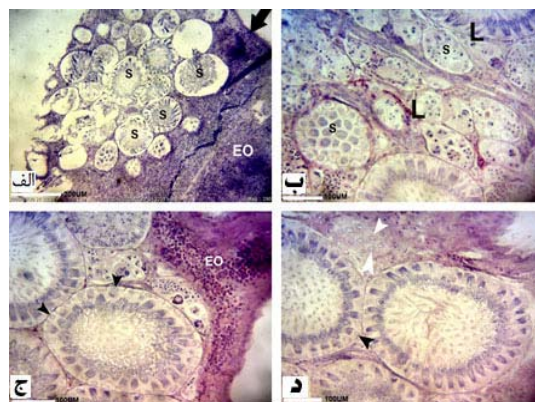
یافته‌اند. سلول‌های جنسی اسپرماتوگونیای دارای یک هسته‌ی بازوفیلی و هتروکروماتین هستند (شکل ۶ الف). مرحله II: در این مرحله اسپرماتوگونیای روند اسپرماتوژنز را آغاز نموده و قطر اسپرماتوسیت‌ها افزایش یافته (۱۷۰/۱۴ تا ۲۰۰/۷۵ میکرومتر)، که عمدتاً به دلیل افزایش اسپرماتوگونیایها در اثر تقسیم می‌باشد. سلول‌های اسپرماتوگونی که در اثر تقسیم میتوز به وجود آمده، کوچکتر از اسپرماتوگونیای موجود در مرحله ۱ است. این سلول‌ها رنگ هماتوکسیلین را به خود گرفته و به صورت متراکم و بنفش تیره دیده می‌شوند (شکل ۶- ب و ج).



شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ نوری بیضه *C. arabicum* در فصل بهار (مرحله I تا IV)، الف. اسپرماتوسیت در مرحله I (I)، سلول-های اسپرماتوگونیوم با هسته هتروکروماتین (رأس پیکان سفید)، سلول‌های سرتولی (رأس پیکان سیاه)، سلول لایدیگ (L) (H&E; $\times 2900$)، ب. اسپرماتوسیت در مرحله II (II) (H&E; $\times 725$)، ج. اسپرماتوسیت در مرحله II (II)، سلول اسپرماتوگونیوم در حال تقسیم میتوز (رأس پیکان سیاه)، سلول سرتولی (رأس پیکان سفید) (H&E; $\times 2900$)، د. اسپرماتوسیت در مرحله III (III)، اسپرماتوگونیوم (رأس پیکان سفید)، اسپرماتوسیت اولیه (رأس پیکان سیاه)، سلول سرتولی (پیکان سیاه) (H&E; $\times 2900$)، ر. اسپرماتوسیت در مرحله IV (IV)، اسپرماتوسیت اولیه (رأس پیکان سیاه)، اسپرماتوسیت ثانویه (پیکان سیاه) سلول سرتولی (پیکان سفید) (H&E; $\times 2900$)

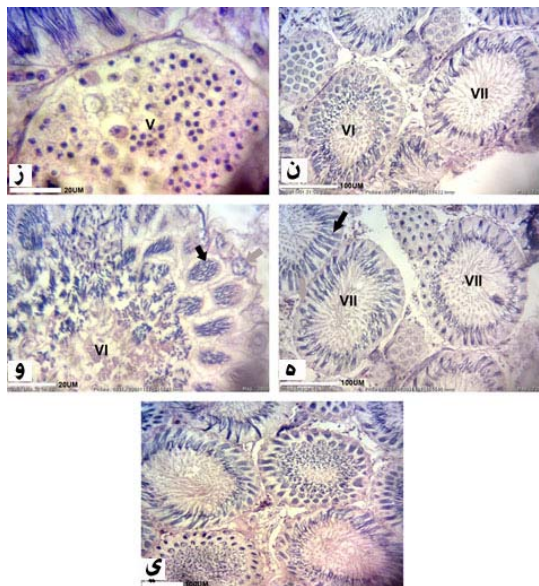


شکل ۴- شکل ظاهری بیضه‌های (ستاره سیاه) گربه کوسه عربی در فصل پاییز (A و D) و بهار (B و C). اندام اپیگونال (رأس پیکان سیاه)



شکل ۵- ساختار آناتومی و بافتی بیضه گربه کوسه عربی: سفید پرده (پیکان سیاه)، اندام اپیگونال (EO)، اسپرماتوسیت (S)، لوبول (L)، سلول سرتولی (رأس پیکان سیاه)، سلول لایدیگ (رأس پیکان سفید)؛ A (H&E; $\times 290$)، B، C، D (H&E; $\times 725$)

مراحل تکامل اسپرماتوسیت‌ها در فصل بهار گربه کوسه عربی به شرح زیر بود: مرحله I: در این مرحله قطر اسپرماتوسیت‌ها ۱۵۲/۶۵ تا ۱۶۴/۲۰ میکرومتر بوده و درون اسپرماتوسیت‌ها سلول‌های جنسی اسپرماتوگونیای و سلول‌های سرتولی وجود دارد که اطراف لومن آرایش

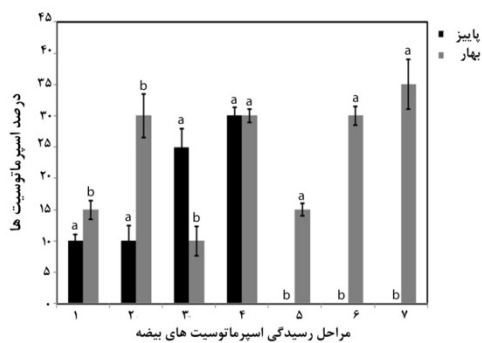


ادامه شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ نوری بیضه *C. arabicum* در فصل بهار (مرحله V تا VII)، ز. اسپرماتوسیت در مرحله V (V) (H&E; $\times 2900$)، ن. اسپرماتوسیت‌ها در مرحله VI (VI) و VII (VII) (H&E; $\times 725$)، و. اسپرماتوسیت در مرحله VI (VI)، سلول سرتولی (پیکان خاکستری)، اسپرماتید (پیکان سیاه) (H&E; $\times 2900$)، ه. اسپرماتوسیت در مرحله VII (VII)، سلول سرتولی (پیکان خاکستری)، اسپرماتوزوآ (پیکان سیاه) (H&E; $\times 725$)، ی. بیضه *C. arabicum* در مرحله تولیدمثلی (H&E; $\times 725$)

در فصل پاییز فقط چهار مرحله ابتدایی تکاملی بیضه در نمونه‌های بیضه اخذ شده از گربه کوسه‌های عربی در این فصل دیده شد: مرحله I: در این مرحله قطر اسپرماتوسیت‌ها $131/31$ تا $150/88$ میکرومتر است، درون اسپرماتوسیت‌ها سلول‌های جنسی اسپرماتوگونیا و سلول‌های سرتولی وجود دارد که اطراف لومن آرایش یافته‌اند. سلول‌های جنسی اسپرماتوگونیا دارای یک هسته‌ی بازوفیلی و هتروکروماتین هستند (شکل ۷-د). مرحله II: در این مرحله اسپرماتوگونیا روند اسپرماتوزوز را آغاز نموده و قطر اسپرماتوسیت‌ها افزایش یافته و به $157/44$ تا $186/51$ میکرومتر می‌رسد که عمدتاً به دلیل افزایش تعداد سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونیا در اثر تقسیم است. اسپرماتوگنیاهایی که در اثر تقسیم میتوز به وجود آمده‌اند، کوچکتر از اسپرماتوگنیای موجود در مرحله ۱ بوده و

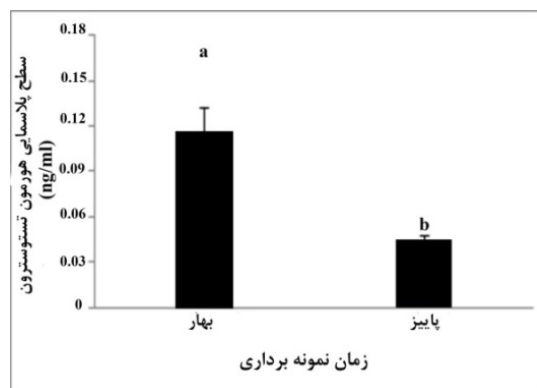
مرحله III: قطر اسپرماتوسیت تا حدود $322/40$ تا $331/48$ میکرومتر افزایش می‌یابد. در این مرحله اسپرماتوسیت شامل اسپرماتوسیت‌های اولیه (Primary spermatocyte) بوده که از اسپرماتوگونیا بزرگتر هستند. کروماتین هسته اسپرماتوسیت معمولاً متراکم‌تر و در مراحل مختلف تقسیم میوز است. در اثر افزایش تعداد سلول‌ها در فضای لومن، هسته سلول‌های سرتولی به سمت محیط اسپرماتوسیت جابه‌جا می‌شود (شکل ۶-د). مرحله IV: اندازه قطر اسپرماتوسیت‌ها $251/30$ تا $299/24$ میکرومتر است. هسته سلول‌های اسپرماتوسیت به علت تقسیم دوم میوز کشیده بوده و اسپرماتوسیت‌های ثانویه (Secondary spermatocyte) از تقسیم میوز اسپرماتوسیت اولیه به وجود می‌آیند. هسته همه سلول‌های سرتولی در حاشیه اسپرماتوسیت مشاهده می‌شود (شکل ۶-ر). مرحله V: قطر اسپرماتوسیت $300/68$ تا $312/16$ میکرومتر بوده و شامل اسپرماتیدهایی با هسته‌ای کوچکتر و نیمه بیضی است. اسپرماتیدها حاصل تقسیم میوز اسپرماتوسیت‌های ثانویه و کوچک‌تر از آن‌ها بوده و رنگ بازوفیلی بیشتری به خود می‌گیرند (شکل ۶-ز). مرحله VI: قطر اسپرماتوسیت $212/22$ تا $240/08$ میکرومتر است. اسپرماتیدها به سمت لومن اسپرماتوسیت قرار دارند (شکل ۶-ن، و). مرحله VII: اندازه اسپرماتوسیت‌ها کمی کوچکتر از مرحله ۶ است، در اسپرماتوسیت‌ها اسپرماتوزوآهایی با هسته کشیده که حاصل تغییراتی در اسپرماتید هستند، مشاهده می‌شود. این سلول‌ها گروه‌های متراکمی تشکیل می‌دهند که تاژک اسپرم به صورت مارپیچی به سمت مرکز اسپرماتوسیت قرار دارد (شکل ۶-و، ی).

قشر اسپرماتوسیت‌های بیضه در دو فصل بهار و پاییز اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$). شکل ۸ میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌های بیضه در دو فصل بهار و پاییز را نشان می‌دهد.



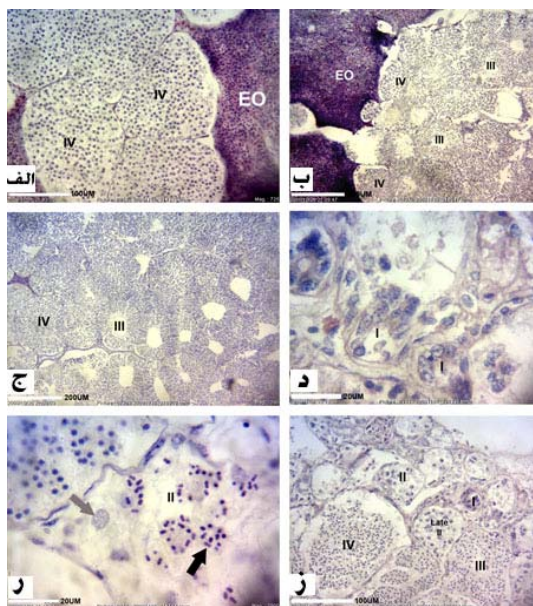
شکل ۸- میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌ها بیضه گربه کوسه عربی در دو فصل بهار و پاییز. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد

براساس نتایج آنالیز هورمون تستوسترون غلظت این هورمون در کوسه‌های نر صید شده در فصل تولیدمثلی بیشتر از فصل غیر تولیدمثلی بود و اختلاف معنی‌داری بین این دو فصل وجود داشت ($P < 0.05$ و $t=52/11$) (شکل ۹).



شکل ۹- غلظت هورمون تستوسترون در گربه کوسه‌های عربی نر صید شده بر اساس فصل. حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد

رنگ همتاکسیلین را به خود می‌گیرند و به صورت متراکم و بنفش تیره دیده می‌شوند (شکل ۷- و، ه). مرحله III: قطر اسپرماتوسیت تا حدود ۲۵۷/۶۷ تا ۳۲۴/۸۹ میکرومتر افزایش می‌یابد. در این مرحله اسپرماتوسیت شامل اسپرماتوسیت‌های اولیه بوده و از اسپرماتوگونیا بزرگتر هستند (شکل ۶- د). در اثر افزایش تعداد سلول‌ها فضای لومن اسپرماتوسیت کاملاً پر شده، هسته سلول‌های سرتولی به سمت محیط اسپرماتوسیت جابه‌جا می‌شوند (شکل ۷- الف، ب). مرحله IV: اندازه قطر اسپرماتوسیت‌ها ۲۰۱/۸۵ تا ۲۴۷/۹۱ میکرومتر است. اسپرماتوسیت‌های ثانویه از تقسیم میوز اسپرماتوسیت اولیه تشکیل شده‌اند. هسته همه سلول‌های سرتولی در حاشیه اسپرماتوسیت مشاهده می‌شود (شکل ۷- الف، ج).



شکل ۷- تصاویر میکروسکوپ نوری بیضه *C. arabicum* در فصل پاییز: الف. اسپرماتوسیت‌ها در مرحله IV (IV)، اندام اپیگونال (EO)، اسپرماتوسیت‌ها در مرحله III (III) و IV (IV)، اندام اپیگونال (EO)، ج. اسپرماتوسیت‌ها در مرحله III (III) و IV (IV)، د. اسپرماتوسیت‌ها در مرحله I (I)، ر. اسپرماتوسیت‌ها در مرحله II (II)، سلول سرتولی (پیکان خاکستری)، سلول اسپرماتوگونیم در حال تقسیم میتوز (پیکان سیاه) در اسپرماتوسیت مرحله II، ز. اسپرماتوسیت‌ها در مراحل II (II)، انتهای مرحله II (Late II) (III) III، (IV) IV و A. (IV) IV و B. (H&E; $\times 725$) F و D. (H&E; $\times 290$) C و E. (H&E; $\times 2900$) E و D.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی بافت‌شناسی تکامل گناد در گونه‌های مختلف ماهیان و تعیین دوره تخم‌ریزی و مشخص نمودن زمان اوج تخم‌ریزی، باعث برنامه‌ریزی بهتر جهت بازسازی ذخایر، تعیین حداقل اندازه صید مجاز و تعیین دوره ممنوعیت صید که هم‌زمان با دوره تخم‌ریزی است، خواهد شد. پرات (۱۹۸۸) در مطالعه ساختار گنادی الاسموبرانش-ها، کاساب و همکاران (۲۰۰۹)، در مطالعه هیستوشیمی و مورفولوژی بیضه‌های گربه کوسه لکه‌دار، و کاتکاولانیچ و همکاران (۲۰۰۵)، در بررسی ساختار بیضه و مجراهای تناسلی سفره‌ماهی (*Himantura signifer*) نیز همچون مطالعه حاضر، مشاهده کردند لوبول‌های بیضه از اسپرماتوسیت‌های متعددی تشکیل شدند که در ناحیه پشتی شکمی آرایش یافته‌اند (۸، ۱۵ و ۲۰). در مطالعه حاضر سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی در اطراف سلول‌های اسپرماتوژنیک کشیده شده و به شکل کپسولی دور تا دور این سلول‌ها را پوشش داده بودند این مشاهده با مطالعه بر بیضه ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، تأیید می‌شود (۴).

اسپرماتوژنز یک فرآیند پیچیده حاصل عملکرد متقابل سلول‌های جنسی و یک یا چند نوع سلول سوماتیک می‌باشد. در گربه کوسه عربی همانند پستانداران و دیگر مهره-داران، مراحل مختلف تکوین سلول‌های جنسی از نظر زمانی و مکانی بانظم خاصی رخ می‌دهند. همچون مطالعه حاضر، بنا به گزارش کنده مورنو و گالوان ماگانا (۲۰۰۶) اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم‌ها در کوسه‌ماهی *Isurus oxyrinchus* در طی هفت مرحله صورت می‌گیرد (۹). روزاس (۲۰۱۳)، در مطالعه ساختار بافتی بیضه ماهی غضروفی *Mustelus schmitti* عدم وجود اسپرماتید یا اسپرم در بیضه ماهیان نر نابالغ را گزارش نمودند. براساس مشاهدات این محققین، سلول‌های اسپرماتوگونیا و اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه تنها سلول‌های مشاهده

شده در بیضه ماهیان نابالغ بود و در فضا‌های بینابینی بیضه نیز سلول‌های لیدینگ وجود داشت (۲۱). در تحقیق حاضر نیز، عدم وجود سلول‌های جنسی بالغ در بیضه‌ها و وجود اسپرماتوسیت‌هایی در مراحل اولیه تکامل حاوی سلول‌های اسپرماتوگونیا و اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه در فصل پاییز نشان از غیرفعال بودن بیضه‌ها در این فصل بود. ایگدیری و همکاران (۱۳۸۵) نیز بیشترین تعداد سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوزوآ را در بافت کاملاً بالغ بیضه و در فصل تولیدمثلی سس ماهی بزرگ سر، گزارش نمودند (۱). گومز و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی زیست‌شناسی تولیدمثل گربه‌ماهی و الساخوی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه بیضه‌های *Oreochromis niloticus* نتایج مشابهی همسو با نتایج مطالعه حاضر را ارائه دادند (۹ و ۱۱). براساس نتایج مطالعه حاضر، سلول‌های اسپرماتوگونی بزرگترین سلول‌های جنسی بودند که در تمام مراحل چرخه تولیدمثلی حضور داشتند. مطالعه بیضه ماهی کفشک راستگرد (*Euryglossa orientalis*) این نتیجه را تأیید می‌کند (۳).

سلول‌های لیدینگ منبع اصلی آندروژن‌ها در بیضه‌ها هستند (۲۳). افزایش سطح پلاسمایی تستوسترون درست پیش از تخم‌ریزی و سپس کاهش آن توسط کوبوکاوا و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه ماهی آزاد ساک آی (سوکیه) و فلاحتکار و پورحسین سارمه (۱۳۹۲) در بررسی ماهی سوف سفید (*Sander lucioperca*) نیز گزارش شده بود (۶ و ۱۶). سولیستیو و همکاران (۲۰۰۰) نیز افزایش میزان تستوسترون در ماهی سوف حاج طرخان نر (*Perca fluviatilis*) قبل از تخم‌ریزی را گزارش نموده بودند. این محققین اظهار داشتند این افزایش مؤید نقش تستوسترون در اسپرماتوژنز و بلوغ سلول‌های جنسی می‌باشد (۲۵). تستوسترون در مهره‌داران ماده نیز دارای نقش‌های متفاوتی در تنظیم تولیدمثل می‌باشد از جمله این که این هورمون برای ذخیره اسپرم در ماده‌ها (۲۲)، مورد نیاز است. تستوسترون همچنین دارای نقش مهمی در تولید

هرچند، با توجه به نبود اطلاعات کافی در ارتباط با تولیدمثل کوسه‌ماهیان خلیج فارس بهتر است جهت تعیین روند سالانه تولیدمثلی این ماهیان، نمونه‌برداری ماهانه از این ماهیان صورت گرفته و رسیدگی گناد و همچنین سطح هورمون‌های جنسی آن‌ها بررسی شود که این موضوع در تحقیقات آتی نویسندگان این مقاله انجام خواهد گرفت.

استرادیول می‌باشد. این هورمون در جنس ماده توسط سلول‌های گرانولوزا فولیکول‌های تخمدانی ساخته شده و با واسطه آنزیم آروماتاز P₄₅₀ به استرادیول تبدیل می‌شود (۱۲).

در مجموع، به نظر می‌رسد که فصل تولیدمثلی گربه کوسه عربی خلیج فارس از اسفندماه تا اواسط خردادماه باشد.

منابع

- ۱- ایگدری، س.، مجازی امیری، ب.، و میرواقفی، ع.، ۱۳۸۵. مطالعه بافت‌شناسی ساختار بیضه و چرخه تولیدمثل جنس نر سس ماهی بزرگ سر مهاجر به رودخانه‌های سفیدرود و پلرود، مجله منابع طبیعی ایران، ۵۹ (۱)، صفحات ۱۴۸-۱۳۹.
- ۲- پرفروغ، ف.، سلامات، ن.، و موحدی نیا، ع.، ۱۳۹۵. مطالعه ساختار بافتی کبد و طحال گربه کوسه عربی خلیج فارس، (*Chiloscyllium arabicum*). نشریه اقیانوس‌شناسی، ۲۸، صفحات ۱۹-۱۲.
- ۳- خلیفی، خ.، سلامات، ن.، موحدی نیا، ع.، و سلاطی، ا. پ.، ۱۳۹۳. بررسی ساختار بافتی گناد ماهی کفشک راستگرد (*Euryglossa orientalis*) خلیج فارس، مجله علوم و فنون دریایی، ۱۳ (۴)، صفحات ۲۳-۲۷.
- ۴- عرفانی مجلد، ن.، مصباح، م.، و رحیمی زرنه، س.، ۱۳۹۳. مطالعه هیستومورفومتری تخمدان ماهی کپور نقره‌ای changes in plasma hormone levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2, PP: 87-99.
- 8- Chatchavalvanich, K., Thongpan, A., and Nakai, M., 2005. Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifier* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Dasyatidae). *Ichthyological Research*, 52, PP: 123-131.
- 9- Conde-Moreno, M., and Galvan-Magana, F., 2006. Reproductive biology of the mako shark *Isurus oxyrinchus* on the south-western coast of Baja California, Mexico. *Cybiun*, 30 (4), PP: 75-83.
- 10- El-Sakhawy, M. A., El-Saba, A. A., Abd Rabou, M. I., El-Shammaa, M. A., and Hussein, S. H., 2011. Seasonal histology of the testes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Veterinary Anatomy*, 4 (2), PP: 61-75.
- 11- Fostier, A., Jalabert B., 1986. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages: 12- Gomes, I. D., and Araujo, F. G., 2004. Reproductive biology of two marine catfishes (*Siluriformes, Ariidae*) in the Sepetiba Bay. *Revista Brasileira de Biologia*, 52 (1), PP: 143-156.
- 13- Greenspan, F. S., and Strewler, G. J., 1997. *Basic and Clinical Endocrinology*. Stamford, CT: Appleton and Lange.
- 14- Hamlett, W. C., 2005. Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids and chimaeras. Science Publishers, Enfield, New Hampshire. Hazon, N. and Balment, R. J., 1997. *Endocrinology*. In: Evans, D. H. (Ed), The

- Physiology of Fishes. 2 ed, CRC Press, Boca Raton, Florida, PP: 441-463.
- 15- Kassab, M., Yanai, T., Ito, K., Sakai, H., Mesegi, T., and Yanagisawa, M., 2009. Morphology and Lectin histochemistry of the testes of brown-banded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). Journal of Veterinary Anatomy, 2, PP: 49 – 66.
 - 16- Kubokawa, K., Watanabe, T., Yoshioka, M., and Iwata, M., 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. Aquaculture, 172, PP: 335-349.
 - 17- Liguoro, A., Prisco, M., Mennella, C., Ricchiari, L., Angelini, F., and Andreuccetti, P., 2004. Distribution of terminal sugar residues in the testis of the spotted ray *Torpedo marmorata*. Molecular Reproduction and Development, 68, PP: 524-530.
 - 18- Morris, A. L., 2010. The relationship between water chemistry and goiter development in tow species of Bamboo shark, *Chiloscyllium spp*, University of Florida.
 - 19- Musick, J., and Ellis, J., 2005. Reproductive evolution of chondrichthyans. In Hamlett W. (ed.) Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes. Volume 3. Endfield, A. Z: Science Publishers, Inc, PP: 45-71.
 - 20- Pratt, H. L., 1988. Elasmobranch gonad structure: a description and survey. Copeia, 3, PP: 719-729.
 - 21- Rojas, F. O., 2013. Testicular histology of *Mustelus schmitti* springer, 1939 (elasmobranchii, triakidae). BioScriba Vol. 6(1), PP: 16-32.
 - 22- Roy, V. K., and Krishna, A., 2010. Evidence of androgen-dependent sperm storage in female reproductive tract of *Scotophilus heathi*. General and Comparative Endocrinology, 165, PP: 120-126.
 - 23- Schulz, R. W., Bogerd, J., and Goos, H. J. T. h., 2000. Spermatogenesis and its endocrine regulation. In: Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E., Stefansson, S. O., (Eds.), Reproductive Physiology of Fish. John Grieg Forlag AyS, Bergen, PP: 225-232.
 - 24- Stevens, J. D., Bonfil, N. K., and Walker, P. A., 2000. The effects of fishing on shark, rays and chimaeras (chondrichthyans), and implications for marine ecosystem. ICES Journal of Marine Science, 57, PP: 476-494.
 - 25- Sulisty, I., Fontaine, P., Rinchar, J., Gardeur, J. N., Migaud, H., Capdeville, B., and Kestemont, P., 2000. Reproductive cycle and plasma levels of steroids in male Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquatic Living Resources, 13, PP: 99-106.
 - 26- Wourms, J. P., and Demski, L. S., 1993. The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes: introduction, history, overview, and future prospects. Environmental Biology of Fishes, 38, PP: 7-21.

Histophysiological study of the testis in the Arabian carpet shark, *Chiloscyllium arabicum*, from the Persian Gulf during the reproductive and nonreproductive seasons

Porforugh F.,¹ Salamat N.¹ and Movahedinia A.²

¹Dept. of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, I.R. of Iran

² Dept. of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Mazandaran University Babolsar, I.R. of Iran

Abstract

The present study aimed to assess the tissue structure and secretions of the male gonads in Arabian carpet shark, *Chiloscyllium arabicum* Gubanov, 1980 from the Persian Gulf during the spring and autumn. For this purpose, the tissue structure of the testis and the plasma level of testosterone were evaluated during autumn (August-November) and spring (April-June) seasons in *C. arabicum*. For this purpose, a total of 30 specimen of *C. arabicum* were caught at the Bahrakan Port, located at the Hendijan in the north of the Persian Gulf, seasonally. Fish were euthanized and blood samples were taken from caudal vein after biometrical tests and then, centrifuged for 10 min. Fish were dissected after bleeding and samples were taken from the testis and fixed in Bouin solution for 48h. Tissue sections were prepared using routine histological techniques and stained with hematoxylin and eosin. Stained tissue sections were studied under light microscope. The amount of testosterone was also measured in plasma samples. The results showed that, the testis of *C. arabicum* was lobulated and each lobol consisted of golobolar units called spermatocyst with various spermatogenic cells in different developmental stages such as spermatogonia, spermatocytes and spermatids. Spermatocysts in seven developmental stages were observed in fish testis during spring season. Only spermatocysts in the first five stages of development were detected in the male fish during autumn. The plasma level of testosterone was also higher in fish during spring season. In conclusion, according to the results of the present study the spring is the reproductive season of *C. arabicum* of the Persian Gulf.

Key words: Testis, Testosterone, Reproduction, Persian Gulf, *Chiloscyllium arabicum*