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

محدثه احمدنژاد*[1]، محمد صیاد بورانی[1]، مهدی مؤمنی[1]

۱- پژوهشکده آبزی 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 آبزیان 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 بافت شناسی گناد 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 گناد با 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 تاثیری 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 آبزیان با ارزش و اقتصادی دریای خزر و حوضه آبریز آن بشمار می‌رود که از ارزش صادراتی قابل توجهی نیز برخوردار است. عمده پراکنش آن در سواحل و رودخانه‌های واقع در بخش غربی دریای خزر و همچنین تالاب انزلی است. این آبزی همچنین از سال ۱۳۶۸ در دریاچه پشت سد ارس مشاهده گردیده است (صمدزاده، ۱۳۷۴).

خرچنگ‌های آب شیرین جانورانی تک جنسی‌اند که دارای جنس نر و ماده می‌باشند اما گاهگاهی افراد دو جنسی هم در بین آن‌ها دیده می‌شود. در هر دو جنس، گنادها در قسمت پشت ناحیه سینه قرارگرفته‌اند و اندازه و ظاهر آن‌ها به سن و شرایط تولید مثلی خرچنگ بستگی دارد. تخمدان‌ها شامل دو لوب قدامی و یک لوب خلفی‌اند که به‌وسیله یک لایه بافت همبند و ماهیچه ای نازک پوشیده شده‌اند (Vogt, 2002). در مرکز هر یک از لوب‌های تخمدان اپیتلیوم زاینده قرار دارد که از اووگونی و سلول‌های فولیکولی مشتق شده است (Krol *et al*., 1992). در طی رشد تخمک و زرده‌سازی، سلول‌های فولیکول از اپیتلیوم زاینده به داخل منطقه رشد حرکت می‌کنند و به محیط هر تخمک متصل می‌شوند. بدین ترتیب کیسه‌های مخصوصی برای رشد و نمو تخمک می‌سازند. هر کیسه شامل یک تخم رسیده یا یک تخمک مرحله ابتدایی رشد یا یک تخمک زرده‌دار است (Ando and Makioka,1999). Meusy و Payen (۱۹۸۸) تکامل تخمدان را به مراحل پیش زرده‌ای، زرده‌سازی، رشد تخمک و رسیدگی نهایی تقسیم نمودند. در زمان پیش زرده‌ای، اووگونی ثانویه ناحیه زاینده را ترک می‌کند و به‌صورت تخمک پیش زرده ساز تکامل می‌یابد 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 می‌باشد (Browdy *et al*., 1990). در ادامه، زرده تجمع پیدا می‌کند و تخمک‌ها به‌طور همزمان در لوب‌های تخمدان بالغ می‌شوند. تخمک‌های واجد زرده در نهایت رسیده می‌شوند و به سمت محیط تخمدان حرکت می‌کنند که باعث انبساط لوب‌های تخمدان به سمت فضای هموسل می‌شوند (Krol *et al*., 1992). اوج رسیدگی تخمک‌ها چند ساعت قبل از تخم‌ریزی رخ می‌دهد (Yano, 1988). Adiyodi و Subramoniam (۱۹۸۳) اووژنز را به دو مرحله تقسیم نمودند: مرحله تکثیر و مرحله تمایز. در مدت مرحله تکثیر، اووگونی‌های ثانویه در ناحیه زاینده توسط تقسیم میتوزی تولید می‌شوند. در مرحله تمایز، اووگونی ثانویه وارد پروفاز میوز I می‌شود و اووسیت های اولیه از آن‌ها مشتق می‌شوند و به سوی ناحیه رشد حرکت می‌کنند. اندازه تخمک زیاد می‌شود تخمک می‌رسد و هنگامی‌که اوولاسیون رخ می‌دهد تخمک وارد مرحله متافاز میوز I می‌شود (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 می‌شوند. مجرای تخم بر به‌وسیله بافت همبند رشته‌ای و رشته‌های ماهیچه‌ای احاطه شده است (Krol *et al*., 1992).

بیضه‌ها که توسط غشای نازکی پوشیده شده‌اند، دارای یک جفت لوب قدامی و یک لوب خلفی می‌باشند. غشای نازک احاطه کننده بیضه از یک لایه

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 اسپرماتوژنز فرق می‌کند. اسپرماتوژنز 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 باز می‌شوند، می‌رسد. آن‌ها از یک اپیتلیوم ترشحی 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 به‌وسیله 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 گناد ده پایان بر روی اعمال تخمدان‌ها (Yano, 1988; Minagawa *et al*., 1993)، زرده‌سازی (Subramoniam, 2000; Abdu *et al*., 2000) و تغییرات فصلی فعالیت‌های تخمدان (O´Donovan *et al*., 1984) در طبیعت متمرکز شده است در حالی‌که بیضه‌ها مطالعه چندانی نشده‌اند (Sellos and Legal, 1981; Obradovic, 1982; Adiyodi and Ankumar, 1988). در ایران نیز مطالعات فراوانی درمورد بیولوژی و روش‌های تکثیر و پرورش خرچنگ دراز آب شیرین (دانش خوش اصل و همکاران، ۱۳۸۴) به انجام رسیده است. اما تاکنون درمورد چرخه تولیدمثلی و تغییرات بافت تخمدان این گونه در شرایط پرورشی مطالعه‌ای صورت نپذیرفته است. لازمه موفقیت در معرفی یک گونه وحشی به آبزی‌پروری، شناخت چرخه تولید مثلی آن گونه می‌باشد. مطالعات بافت‌شناسی گناد یکی از قابل اعتمادترین روش‌ها برای ارزیابی تاکتیک‌های تولید مثلی و تاییدی برمشاهدات ماکروسکوپی (Alonso-Fernández *et al*., 2011) است. بافت‌شناسی در بسیاری از پدیده‌های زیستی مانند تولید مثل آبزیان کمک می‌کند تا روش‌های جدید و موثری برای افزایش کارایی مولدین، افزایش تولید و نهایتاً راندمان و پیش‌بینی برای تولید آبزیان بهتر ابداع شود. گونه *A. leptodactylus* یک گونه بومی و دارای ارزش اقتصادی و پتانسیل فراوان برای تکثیر و پروش به منظورصادرات می‌باشد و عدم اطلاعات کافی و لازم در مورد روند رسیدگی جنسی و ساختار بافت گناد در مولدین نر و ماده این گونه سبب شکل‌گیری تحقیق حاضر گردید. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی تغییرات ظاهری و بافت شناسی گناد نر و ماده خرچنگ درازآب شیرین درطی یک چرخه تولید مثلی در شرایط پرورشی و تأثیر تراکم مولدین بر برخی از شاخص‌های تولید مثلی بوده است.

مواد و روش‌ها

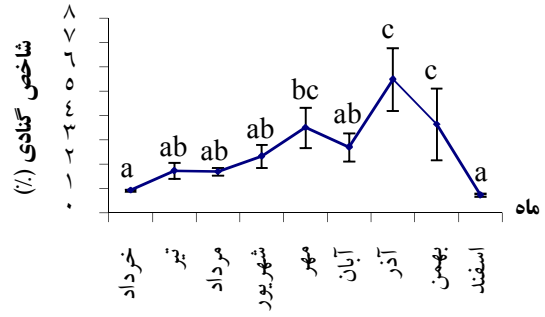
در تحقیق حاضر از خرچنگ‌های دراز آب شیرین ۲ ساله ایستگاه تحقیقات شیلاتی سفیدرود وابسته به پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی (بندر انزلی) استفاده شد که از سال ۱۳۸۵ در ۹ استخر خاکی ۱۵۰ متر مربعی در سه تیمار با سه تکرار و براساس تراکم ۳، ۵ و ۷ عدد در متر مربع پرورش یافتند. تعداد ۵۰ خرچنگ ماده و ۵۰ خرچنگ نر، طی مدت خرداد الی اسفند ۱۳۸۷ به‌صورت 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 دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم اندازه‌گیری شد. شاخص گنادی (Gonadosomatic Index:GSI) به‌صورت درصد نسبت وزن گناد به وزن بدن محاسبه گردید.

جهت مطالعه بافت شناسی، گناد هر یک از مولدین، پس از بررسی و مشاهده ظاهری در محلول بوئن به مدت ۲۴ ساعت تثبیت گردید. آبگیری 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 ائوزین 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 مراحله 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<۰/۰۵) استفاده شد. برای انجام کارهای آماری از نرم‌افزار Spss نسخه ۱۳ و جهت رسم نمودار از نرم‌افزار Excell استفاده شد.

نتایج

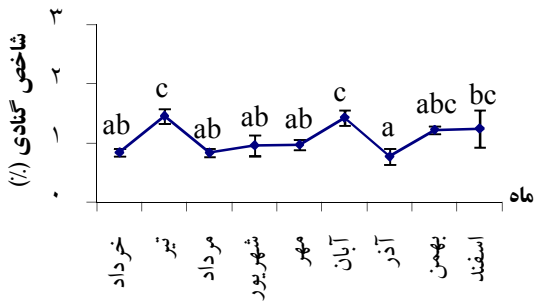
میانگین طول و وزن در مولدین ماده به ترتیب ۰/۹± ۱۳ (۱۰/۲ - ۱۴/۷) سانتی‌متر و ۱۳/۵±۵۹/۵ (۲۸/۷۶-۸۶/۲۶) و در مولدین نر به ترتیب ۰/۹± ۱۳/۵ (۱۱/۶-۱۵/۳) سانتی‌متر و ۲۴/۶±۹۱/۳ (۴۳/۴۳-۱۳۷/۶) گرم بود.

در مولدین ماده، کمترین مقدار میانگین شاخص گنادی (GSI) در ماه اسفند (۰/۰۶± ۰/۷۴ درصد) و بیشترین آن (۱/۲۹± ۵/۵ درصد) در ماه آذر قرار داشت (شکل ۱).



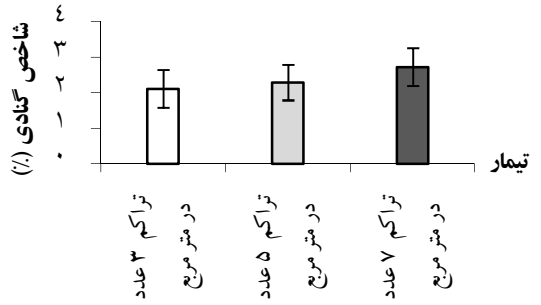
شکل ۱: میانگین شاخص گنادی (± انحراف معیار) مولدین ماده پرورشی خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptoductylus* درماه‌های مختلف سال ۱۳۸۷

کمترین مقدار میانگین شاخص گنادی مولدین نر به نمونه‌های ماه آذر (۰/۱۳± ۰/۷۷ درصد) و بیشترین آن به ماه‌های تیر (۰/۱۲± ۱/۴۶ درصد) و آبان (۰/۱۳± ۱/۴۳ درصد) تعلق داشت (شکل ۲).



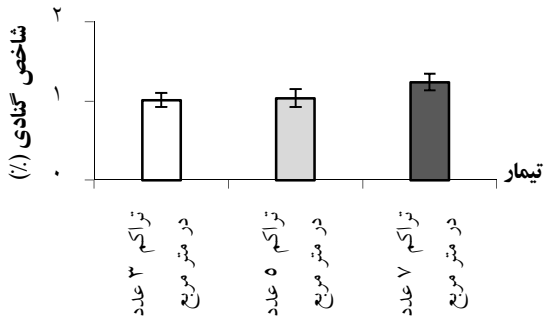
شکل ۲: میانگین شاخص گنادی (± انحراف معیار) مولدین نر پرورشی خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptoductylus* در ماه‌های مختلف سال ۱۳۸۷

در مقایسه بین تیمارها، میانگین شاخص گنادی مولدین ماده تیمار ۳ (تراکم ۷ عدد در متر مربع) با مقدار ۰/۵۳± ۲/۷۲ درصد، نسبت به دو تیمار دیگر (تراکم‌های ۳ و ۵ عدد در متر مربع) بالاتر بود، اما بین سه تیمار مذکور اختلاف معنی‌دارآماری مشاهده نشد (P> ۰/۰۵) (شکل ۳).



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

همچنین میانگین شاخص گنادی مولدین نر مربوط به تیمار۳ با مقدار ۰/۱۰± ۱/۲ درصد، نسبت به دو تیمار دیگر بیشتر بود درحالیکه بین سه تیمار مذکور اختلاف معنی دارآماری وجود نداشت (P> ۰/۰۵) (شکل ۴).



شکل ۴: مقایسه میانگین شاخص گنادوسوماتیک مولدین نر پرورشی خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptoductylus* 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 به‌طوری‌که میزان آن در مرحله V (مرحله بلوغ) و VI (درحال تخم‌ریزی) به‌طور 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<۰/۰۵) (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 به‌طور معنی‌داری بیشتر مراحل II و VI بودند (جدول ۲).

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/ درحال بازیابی)	مرحله III (در حال توسعه)	مرحله IV (توسعه یافته)	مرحله V (بالغ)	مرحله VI (در حال تخم ریزی)	مرحله VII (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 (نابالغ)	مرحله II (در حال بالغ شدن)	مرحله III (بالغ)	مرحله IV (رسیده)	مرحله V (در حال اسپرم ریزی)	VI (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

تخمدان *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. به‌طوری‌که 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 پیش هسته‌ای (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 تخمک‌های واجد زرده (اعم از تخمک‌های مراحل ابتدایی زرده گیری تا تخمک‌های مراحل نهایی زرده-گیری) 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 به‌دلیل 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 جفت گیری 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.

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		+							
مراحل رسیدگی گناد	مرحله IV		+	+	+	+				
	مرحله V						+	+		
	مرحله VI						+	+		
	مرحله VII								+	+

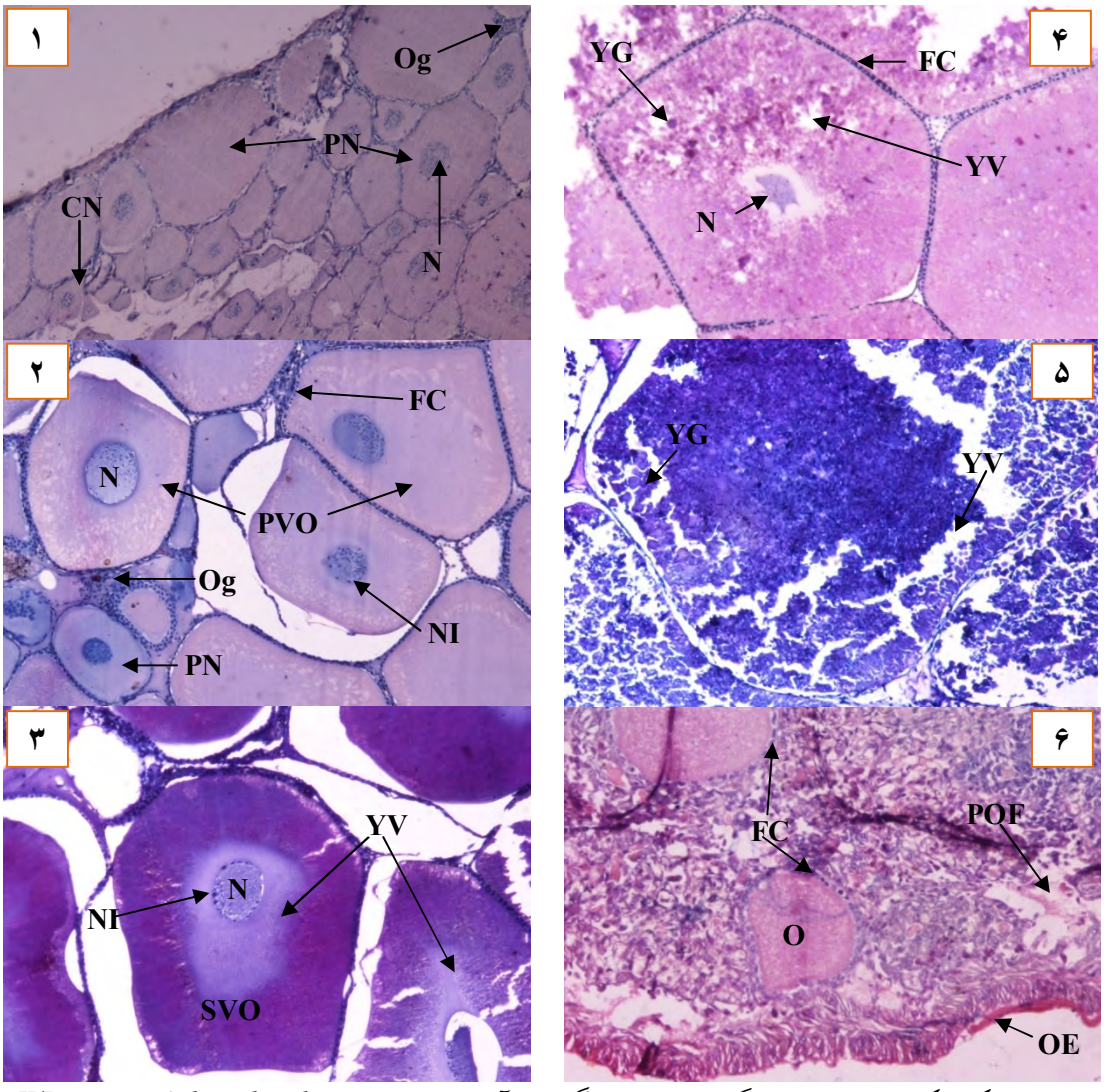
جدول ۴: تغییرات ظاهری و مراحل رسیدگی گناد خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی نر طی خرداد تا اسفند سال ۱۳۸۷

ماه		خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند
	بیضه‌ها و وازدفران	+									
	بیضه‌های شیری رنگ		+	+	+						
	ضخیم و طولانی شدن					+	+				
	رسیدگی بیضه					+	+	+			
ویژگی‌های ظاهری و بافتی	جفت گیری						+	+			
	اسپرماتوسیت	+	+	+	+	+	+				
	اسپرماتید					+	+				
	اسپرماتوزوئید					+	+				
	اسپرماتوفور					+	+	+			
	مرحله I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	مرحله II	+	+								
مراحل رسیدگی	مرحله III			+							
جنسی	مرحله IV				+	+					
	مرحله V					+	+				
	مرحله VI							+			

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 ویژگی های میکروسکوپی مراحل توسعه تخمدان شباهت زیادی با مراحل ظاهری تخمدان 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.

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

مرحله رسیدگی جنسی	مشخصات ظاهری	مشخصات بافت شناسی
مرحله II/I (نابالغ یا درحال بازیابی)	تخمدان 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 درحال تحلیل و فولیکول‌های خالی از تخمک، می‌باشند.
مرحله III، در حال توسعه (وزیکول‌های زرده‌ای)	تخمدان 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	تخمدان بزرگ‌تر و ضخیم‌تر و حاوی تخم‌های درشت قابل تشخیص خردلی رنگ	تخمک‌های در حال طی کردن مراحل ثانویه ویتلوژنز غالب‌اند، واجد گرانول‌های زرده ای کاملاً مشخص در سیتوپلاسم‌اند. تخمک‌های پیش هسته ای و اووگونی ها همچنان حضور دارند .
مرحله V ، بالغ	تخمدان 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	تخمدان بسیار بزرگ مملو از تخمک‌های بزرگ سبز زیتونی تیره که بیشتر فضای شکم را پر کرده‌اند	سیتوپلاسم تخک‌ها مملو از وزیکول‌های زرده‌ای است. هنوز کمی تخمک‌های پیش هسته‌ای حضور دارند
مرحله VII، پس از تخم‌ریزی	تخمدان 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. leptoductylus* . ۱) مرحله II/I (نابالغ یا درحال 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= هستک (Nucleoli)، O=تخمک درحال 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). رنگ‌آمیزی ائوزین- هماتوکسیلین، بزرگنمایی ۴۰ × .

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).

در بررسی مقاطع بافتی بیضه‌ها، مرحله II تا VI رسیدگی جنسی در نرهای پرورشی تشخیص داده شد (جدول ۷).

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

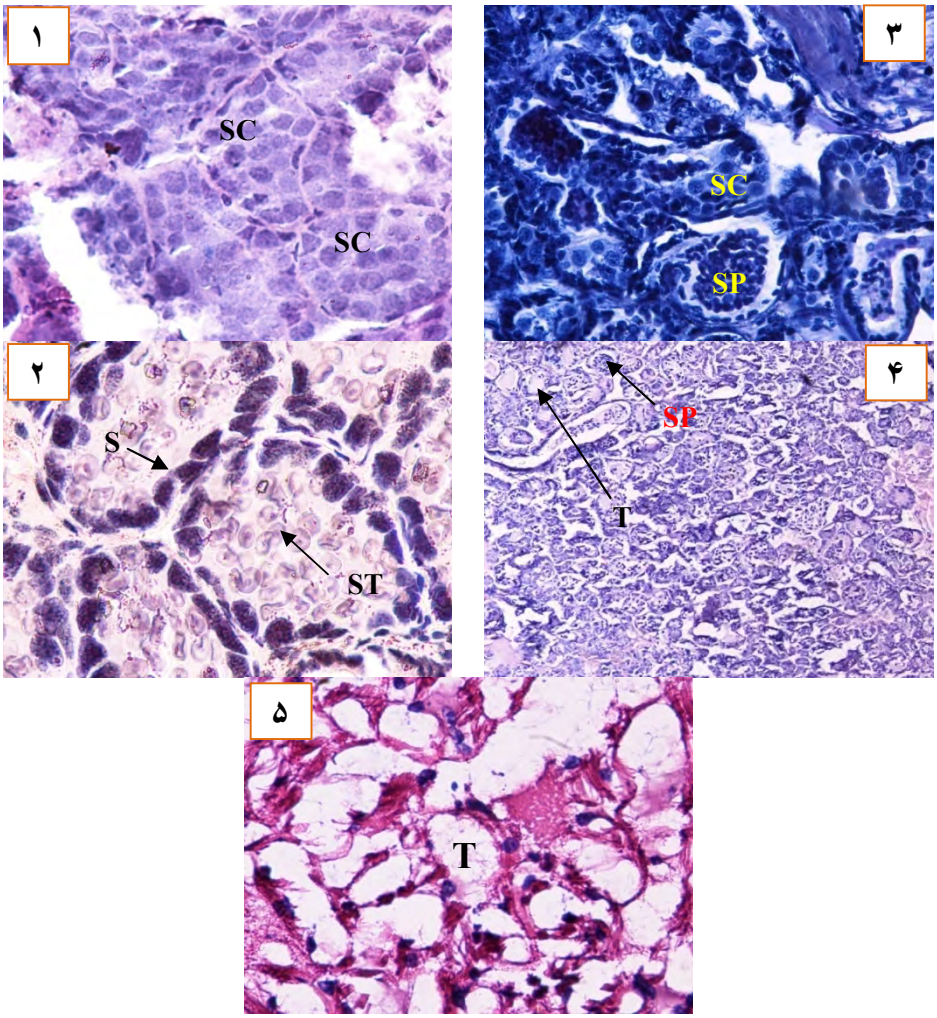
جدول ۷: مشخصات ظاهری و بافت شناسی در مراحل مختلف توسعه گناد مولدین نر خرچنگ دراز آب شیرین پرورشی

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	حضوراسپرماتوسیت‌ها در لوله‌های سمینی فر
مرحله III (بالغ)	بیضه‌ها ضخیم، وازدفران مات	ظاهر شدن اسپرماتید در لوله‌های سمینی فر
مرحله IV	بیضه‌های متورم، وازدفران مات و شیری رنگ	ظاهر شدن اسپرماتوزوآ در برخی از لوله‌های سمینی فر،
(رسیده و قبل از اسپرم ریزی یا Gravid)		هنوز مراحل پایین تر اسپرماتوژنز در برخی مناطق از بیضه قابل مشاهده است، تعداد معدودی از لوله‌های سمینی فر خالی از اسپرم‌اند
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 واز دفران شفاف	لوله‌های سمینی فر کاملاً خالی ازاسپرماتوزوآ

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 طبقه بندی 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 می‌توان جدا نمود اما از لحاظ بافت‌شناسی تمایز این دو مرحله امکان‌پذیر نشد. لذا مشخصات حضوراسپرماتوسیت‌ها 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 اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز 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 مقاطع بافت گناد مولدین مهر، آبان و آذر مشاهده شد با این تفاوت که با پیشرفت زمان، سلول‌های مراحل اولیه اسپرماتوژنز 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. در 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.



شکل ۶: تصاویر میکروسکوپی برش‌های عرضی بیضه مولدین نر خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptoductylus* در ماه‌های خرداد (۱)، تیر و مرداد (۲)، شهریور(۳)، آبان (۴)، آذر (۵). ۱)مرحله II رسیدگی، اکثر لوله‌های بیضه‌ای حاوی اسپرماتوسیت‌اند، ۴۰۰ × ، ۲) مرحله III رسیدگی، مشاهده اسپرماتید در لوله‌های سمینی فر، ۴۰۰ × ، ۳) مرحله IV رسیدگی، مشاهده اسپرماتوسیت و اسپرماتوزوآ و برخی از لوله‌های خالی از اسپرماتوزوآ، ۲۰۰ ×، ۴) مرحله V رسیدگی، لوله‌ها در حال خالی شدن از اسپرم‌ها، ۴۰ × ، ۵) مرحله VI رسیدگی، لوله‌ها درحال تحلیل رفتن و کاملاً خالی از اسپرم، ۲۰۰ × . S = سلول سرتولی (Sertoli Cell) ، SC = اسپرماتوسیت (Spermatocyte) ، SP = اسپرماتوزوآ (Spermatozoa) ، St = اسپرماتید (Spermatid) ، T = لوله سمینی فر (Seminiferous Tubule). رنگ آمیزی ائوزین–هماتوکسیلین.

بحث

در مطالعه حاضر در ماه دی، با کاهش دما و به دلیل مخفی شدن مولدین خرچنگ دراز آب شیرین، صید و نمونه‌برداری 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 به‌طوری‌که 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؛ *Callinectes danae* Smith, 1869؛ *Portunus spinimanus* Latreille؛ *Cyrtograpsus angulatus* Dana, 1851 ; Clark, 1936 *Cherax destructor*؛ *Cherax cainii*؛ *Cherax qunquecarinatus* و *A. astacus* به ترتیب توسط Simons و Jones (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 به‌عنوان 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. به‌علاوه مطالعه چرخه‌های توسعه تخمدان در یک گونه یا جمعیت را

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. qunquecarinatus*، *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). Castiglioni و 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 ویتلوژنین تخمک‌ها ذکر شده است (Castiglioni *et al*., 2007). Lucić و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه روی *A. astacus*، رسیده شدن تخم‌ها را به‌وسیله 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. leptoductylus* تخم‌های زرد در ماه مرداد (آگوست) ظاهر شدند در حالی‌که 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* Clark, 1936، *Ch. cainii*، *Ch. qunquecarinatus*، *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 وقبل از زرده‌گیری) یا مرحله II

(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 تقسیم بندی صورت گرفته برای مراحل رسیدگی گنادنر در گونه‌های *Ch. destructor* Clark, 1936، *Ch. cainii*، *Ch. qunquecarinatus* و *A. astacus* بود (Beatty *et al.*, 2003 ; Beatty *et al.*, 2005a,b ; Lucić *et al.*, 2006) در حالی‌که 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 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 بافت شناسی بیضه حاوی لوله‌های سمینی فر محتوی اسپرماتوسیت بوده که بخشی از بافت بیضه هم حالت تحلیل رفته داشته به‌طوری‌که 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 به‌طور معنی‌داری کمتر از مراحل III، IV و V بودند و سه مرحله رسیدگی جنسی اخیر از نظر GSI تقریباً مشابه وفاقد اختلاف معنی دار 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 جفت گیری به مشاهدات میکروسکوپی بافت گناد نیاز است. در مطالعه بر روی *Ch. quinquecarinatus* مشاهده شد که الگوی بیشینه 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 حالی‌که نتایج بافت‌شناسی درگناد مولدین نردرتحقیق 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

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 نیزدر آذر صورت گرفته است. Juchno و Chybowski (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 پیش هسته‌ای نسبت به تخمک‌های فاز دوم زرده‌سازی (مرحله IV) تعدادشان کمتر بوده است. با نزدیک شدن زمستان از نوامبر(آذر) تا مارس (اسفند – فروردین) تصاویر بافت شناسی 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. leptoductylus* 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 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. leptoductylus* 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 حالی‌که در *O. limosus* با وجود انتقال اسپرم به ماده‌ها در پاییز لقاح نمی‌تواند در این زمان صورت گیرد چراکه 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 حالی‌که نمونه‌های اسفند ماه در مرحله VII قرار داشته‌اند. آنچه در مورد زمان جفت گیری و تخم‌ریزی *A. leptoductylus* در شرایط پرورشی و از مطالعات بافت شناسی 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

به‌دلیل 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 نشاندهنده آن است که فاکتورها و عوامل متعددی بر وضعیت تولید مثلی تاثیرگذارند اما قابلیت شاخص GSI در تعیین وضعیت تولیدمثلی اهمیت ویژه‌ای دارد (Beatty *et al*., 2003). بنابراین طبق نتایج به‌دست آمده در مورد مقایسه شاخص‌های گنادی مولدین ماده و نر در بین سه تیمار می‌توان 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 می‌تواند 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 آن‌ها نیاز به مطالعات وسیع تری دارد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که شاخص تراکم مولدین در متر مکعب تأثیر قابل توجهی بر رسیدگی جنسی نداشته است. همچنین تعیین دقیق مراحل رسیدگی جنسی *A. leptoductylus* تنها از طریق بافت‌شناسی گناد امکان پذیر است و استفاده از مشخصات ظاهری و رنگ گناد تنها در مرحله نهایی رسیدگی جنسی مولدین ماده می‌تواند مفید واقع شود. در خرچنگ‌های دراز در شرایط پرورشی موجود در تحقیق حاضر، زمان لقاح آذر ماه، زمان تخم‌ریزی زمستان و زمان بازیابی تخمدان 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 به‌عنوان زمان جفت گیری و زمستان تا بهار فصل تکثیر این گونه بیان شده است بنابراین می‌توان گفت که زمان تولید مثل خرچنگ‌های پرورشی به زمان تولیدمثل آن‌ها در طبیعت نزدیک بوده است.

سپاسگزاری

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

منابع

۱. 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.

۲. صمدزاده، م.، ۱۳۷۴. بررسی امکان تکثیر نیمه طبیعی خرچنگ آب شیرین و پرورش نوزادان تا مرحله خرچنگ‌های جوان (*Astacus leptoductylus*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران. ۱۱۹ص.

3. 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.
4. 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.
5. 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.

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 Morphoogy, 239, 107-114.
9. Arculeo, M., Payen, G., Cuttitta, A., Galioto, 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 semisulculatus* (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.
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 Crayfi*sh Orconectes limosus* RAF. Archives of Polish Fisheries, 11(1), 69-78.
21. Koksal, 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.), , Wiley-Liss Inc., New York, 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

frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan. Marine Biology, 115, 613-623.
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 Differertioation, 10(2), 69-77.
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 habitate. 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.