

مقاله پژوهشی

مطالعه استریولوژیکی تغییرات بافتی بیضه خفاش میوه خوار مصری (*Rousettus aegyptiacus*) در طول سال

فرنگیس قاسمی^{۱*}، عصمت عباس فرد^۲

^۱ گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، اداره آموزش و پرورش، فسا، ایران

* Email: ghassei.fr@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۱۱

چکیده

با توجه به اهمیت خفاش‌ها در اکوسیستم و اطلاعات محدودی که در رابطه با تولید مثل این موجود نافع در دست است چرخه اسپرماتوزن خفاش میوه خوار مصری (*Rousettus aegyptiacus*) برای اولین بار در سه فصل بهار تا پاییز مورد مطالعه استریولوژیکی قرار گرفت. بدین منظور از غار سنگ‌تراشان جهرم (فارس) در اواخر هر فصل، ۷ خفاش نر با تور نامرئی صید و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از بیهوشی و تشریح خفاش‌ها، بیضه‌ها را خارج و اندازه گیری نموده، سپس تثبیت شدند. از نمونه‌های تثبیت شده مقاطع ۵ میکرونی تهیه و رنگ آمیزی شدند. حجم پارامترهای مورد بررسی با روش کواولیه تعیین و قطر لوله‌ها و تعداد سلول‌های بیضه با استفاده از نرم افزار stereo Lite اندازه گیری گردید. داده‌های حاصل با آزمون کروسکال والیس تحلیل و توسط آزمون فریدمن مقایسه گردیدند. طبق نتایج حاصل، بیضه‌ها در اسکروتوم با اختلاف معنی دار بین وزن و حجم بیضه چپ و راست بود. بیشترین وزن ($0.19g \pm 0.0765$) و حجم ($41mm^3 \pm 0.862$) در فصل بهار بود. انواع سلول جنسی و اسپرم زیاد در مرکز لوله‌های اسپرم‌ساز در همه فصول مشاهده گردید. قطر لوله اسپرم‌ساز با اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین بهار ($235/90 \pm 1/06 \mu m$) و پاییز ($227/82 \pm 1/29 \mu m$) مشاهده شد. بیشترین میانگین تعداد اسپرماتوسیت ($294/6 \times 10^6$)، سرتولی ($11/59 \times 10^6$) و لایدیگ ($39/30 \times 10^6$) در بهار و کمترین آنها در پاییز بود اما اسپرماتید در پاییز ($284/2 \times 10^6$) بیشترین تعداد داشت. طبق این نتایج، اوج فعالیت جنسی این گونه خفاش، در فصل بهار و تابستان است.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های جنسی، لوله منی ساز، بافت شناسی، خفاش میوه خوار مصری.

مقدمه

دلایل زیست‌محیطی و شرایط اقلیمی متفاوت، استراتژی‌های مختلف تولید مثلی ایجاد شده است [۳۰، ۲۰، ۱۳]. گر چه اکثر خفاش‌ها وابسته به فصل

خفاش با بیش از ۱۳۰۰ گونه شناخته شده، دومین راسته بزرگ پستانداران است [۱۶]. در خفاش‌ها به

مرکبات و نخل و پراکندن دانه آنها دارد [۱۰, ۱۸, ۲۴] تحقیق حاضر انجام گرفت تا گامی در جهت شناخت بیشتر این موجود نافع برداشته شده باشد.

نمونه مورد مطالعه (*R. aegyptiacus*) متعلق به راسته خفاش‌های بزرگ جثه^۱ دارای توزیع گسترده در آفریقا، مدیترانه، شرق میانه و جنوب‌غربی آسیا می‌باشد و در جنوب ایران از جمله استان فارس در دستجات بزرگ یافت می‌شود [۹]. وزن آنها بین ۸۰ تا ۱۷۰ گرم است و جنس نر معمولاً بزرگ‌تر از ماده‌ها هستند. جنس نر با داشتن اندام تناسلی خارجی کاملاً مشخص و نسبتاً حجیم شامل بیضه‌ها و آلت تناسلی به راحتی از جنس ماده قابل تفکیک است [۳]. برای خفاش میوه خوار مصری چند همسری با دو فصل برای پرورش نوزاد^۲ گزارش شده [۲۷] ولی در عرض‌های جغرافیایی بالا یک بار زایش^۳، در طول سال ثبت شده است [۶] با توجه به کاهش زیستگاه‌های خفاش در نتیجه دخالت انسان در اکوسیستم‌ها در سال‌های اخیر [۶] و هشدار انجمن حفاظت از خفاش [۲۳]، حفاظت از آنها به راهکارهای جدی نیاز دارد و بی شک دانش بیشتر در رابطه تولیدمثل آنها کمک مؤثری در جهت حفاظت آنها است.

مواد و روش‌ها

محل جمع آوری نمونه

جهرم در ۵۳ درجه و ۳۴ دقیقه طول شرقی و ۲۸ درجه و ۳۳ دقیقه عرض شمالی و در ارتفاع ۹۸۵ متری از سطح دریا در استان فارس جای دارد. این شهرستان با آب و هوای نسبتاً گرم و خشک دارای

جفت‌گیری می‌کنند [۱۷, ۳۰] اما بعضی در تمام طول سال فعالیت جنسی دارند [۳۱, ۳۶].

تغییرات اقلیمی منجر به نوسانات نیازهای موجودات شده و در تغییرات جمعیت آنها اثر زیادی دارد. عمده خفاش‌ها چرخه تولیدمثلی خود را با فراوانی متابع غذایی و امکاناتی که بقای آنها را تأمین کند هماهنگ می‌کنند [۲۱, ۳۰] لذا مانند بسیاری از پستانداران دارای استراتژی‌های مختلف باروری هستند [۲۶, ۳۱, ۳۵]. زمان باروری خفاش‌ها علاوه بر موقعیت جغرافیایی زیستگاه و آب و هوای منطقه [۴, ۵]، تا حد زیادی به وضعیت جنس ماده و آمادگی وی برای لقاح مربوط است [۲۱, ۲۸].

در رابطه با چرخه تولید مثلی خفاش‌ها مطالعات زیادی در خارج از کشور انجام گرفته است [۷, ۱۱, ۱۲, ۱۳, ۱۴, ۲۵, ۳۲] اما با توجه به تنوع زیاد این راسته از یک طرف و تأثیر مستقیم شرایط اقلیمی بر تنوع چرخه تولید مثلی [۲۹] از طرف دیگر، مطالعات بیشتر در این رابطه ضروری است.

در ایران نیز بافت‌شناسی دستگاه تولید مثلی جنس نر خفاش میوه خوار مصری [۱] و دستگاه تولید مثلی جنس ماده این گونه خفاش [۱۹] مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین توانایی ذخیره اسپرم در خفاش‌های گوش موشی انگشت دراز [۲]، تفاوت الگوی رقابت و ظرفیت یابی اسپرم در دو گونه مختلف از خانواده خفاش‌های شامگاهی [۲۲] و تحقیقاتی مشابه در رابطه با گونه‌های مختلف خفاش در ایران انجام شده است.

نظر به اهمیت اکولوژیکی خفاش میوه‌خوار مصری *Rousettus aegyptiacus* (E. Geoffroy, 1810)

به‌عنوان تنها خفاش بزرگ جثه ایران [۹] و نقش بسیار ارزنده‌ای که در گرده افشانی گیاهانی چون

^۱. Megachiroptera

^۲. polygamous

^۳. monoestros

نخلستان‌ها و باغ‌های میوه فروان است.

منطقه مورد بررسی غار سنگ تراشان در شهرستان جهرم واقع شده است. با وجودی که این غار مصنوعی یکی از تفریح‌گاه‌های شهر و محل پرترددی است ولی تنوع و تراکم بالایی از خفاش و بخصوص خفاش میوه‌خوار مصری در این غار سکونت دارند. ابعاد بزرگ غار (حدود ۲۰ هزار متر مربع وسعت با ارتفاع متوسط سه متر)، واقع شدن در منطقه ای همجوار با باغ‌های مرکبات و نخل و آب و هوای نسبتاً گرم جهرم، شرایط مناسبی برای زیست این گروه خفاش‌ها فراهم کرده است.

روش جمع‌آوری نمونه

در اواخر سه فصل بهار، تابستان و پاییز با مراجعه به غار مورد نظر و بستن تورهای نامرئی با ابعاد ۲۰ متری و سوراخ‌های ۲ در ۲ سانتی متری جلوی کانال‌های موجود در غار، اقدام به جمع‌آوری خفاش گردید. در هر نمونه برداری ۷ سر خفاش میوه‌خوار مصری نر صید و در کیسه‌های پارچه‌ای جداگانه به آزمایشگاه منتقل گردید. برای جلوگیری از وارد کردن شوک به خفاش‌هایی که احتمالاً در خواب بودند در فصل زمستان نمونه‌برداری انجام نگرفت. لازم به ذکر است که خفاش میوه‌خوار بواسطه جثه بزرگش از همه خفاش‌های موجود در غار قابل تفکیک بود و بقیه گونه‌ها را شدند.

در آزمایشگاه با رعایت اخلاق کار با حیوانات، خفاش‌ها را با کلروفورم بیهوش کرده و پس از توزین، تشریح شدند. بلافاصله بیضه‌ها را از بدن خارج نموده و بعد از توزین با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم، با محلول ۹۰۰ سی‌سی آب مقطر و ۱۰۰ سی‌سی فرمالین ۳۷٪ و ۶/۵ گرم Na_2HPO_4 با PH

خنثی ۲ بار شستشو داده شد و هر بار به مدت ۱ ساعت در دمای یخچال نگهداری گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ روز در محلول فیکساتیو MDF (Davidson's Fluid Modified) شامل ۳۰ میلی‌لیتر فرمالین تجاری (۳۷٪)، ۱۵ میلی‌لیتر اتانول، ۵ سی‌سی آب مقطر و ۱۰۰ سی‌سی فرمالین ۳۷٪ و ۶/۵ گرم Na_2HPO_4 با PH خنثی ۲ بار شستشو داده شد و هر میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۵۰٪ آب مقطر قرار داده شد. سپس از کل نمونه به فواصل مساوی و بصورت شعاعی ۱۰ الی ۱۳ برش (اسلاب) با ضخامت ۵ میکرون با دستگاه میکروتوم تمام اتوماتیک مدل DS9502 تهیه شد. از برش‌های تهیه‌شده به روش استاندارد اسلاید تهیه و با هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شد.

برای محاسبه حجم بیضه از روش کوالیه و پروب نقطه‌ای استفاده شد [۱۵]. بدین ترتیب که سری‌های کاملی از مقاطع موازی (اسلاب) از نمونه بدست آورده و سطح مقطع (A) آن اندازه‌گیری شد. حجم کل بیضه از رابطه زیر حساب شد.

$$V = (t.A1) + (t.A2) + \dots + (t.An):$$

$$\bar{V} = \frac{\sum p \cdot a_p \cdot t}{m^2}$$

حجم میانگین نیز از رابطه

محاسبه و سپس حجم بیضه از رابطه زیر تعیین شد.

$$a_p = \Delta x \cdot \Delta y$$

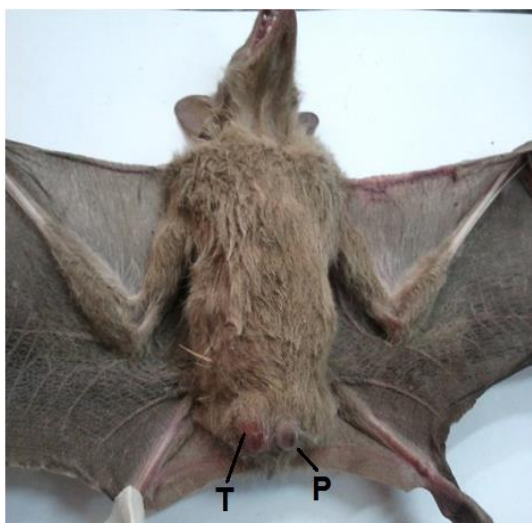
میانگین حجم نمونه مورد نظر: V

سطح هر نقطه: a_p

بزرگنمایی میکروسکوپ: m

فاصله اسلاب‌ها: t

تعداد نقاط برخورد کرده با سطح نمونه: p



شکل ۳. خفاش میوه خوار مصری
P: Penis T: testis

در شمارش سلول‌ها از خصوصیات تشخیصی هر سلول استفاده شد و تمرکز کار روی شکل هسته سلول‌ها و محل قرار گرفتن آنها بود. پس از شمارش سلول‌ها با قرار دادن مجموع سلول‌های شمارش شده به صورت جدا در فرمول زیر چگالی عددی سلول‌ها بدست آورده شد [۱۵].

$$N_V = \frac{\sum Q}{\sum p \times h \times a(\text{frame})}$$

N_V : تعداد در واحد حجم

$\sum Q$: تعداد کل سلول‌های شمارش شده

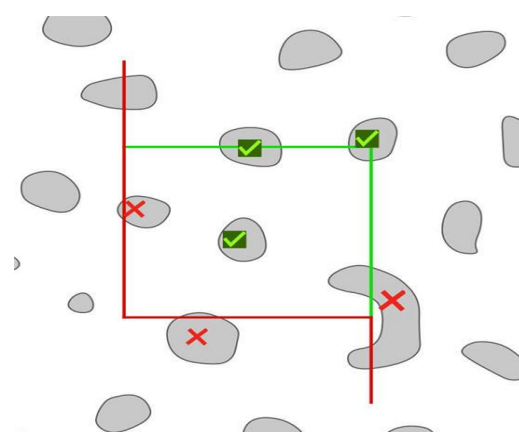
h : ضخامتی که شمارش سلول در آن انجام شد

$\sum p$: تعداد فریم‌هایی که سلول‌ها در آن شمارش شد

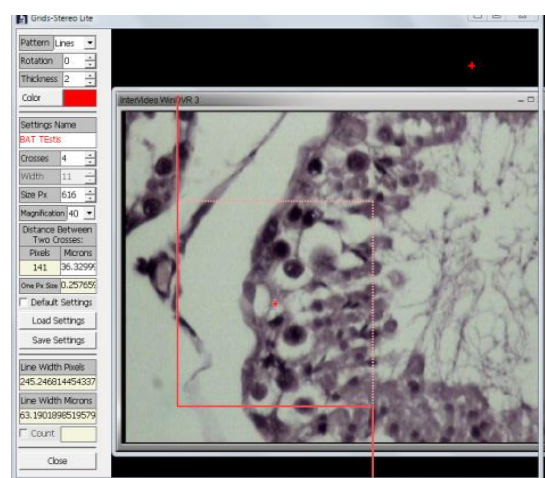
a/frame : مساحت فریم شمارش شده

با ضرب کردن N_V در حجم کل بافت بیضه که در بالا از روش کواویری محاسبه شد تعداد دقیق سلول‌های شمارش شده در کل بافت بیضه محاسبه گردید.

برای محاسبه چگالی عددی و تعداد مطلق سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، لایدیگ و سرتولی از تکنیک Disector Optical و Unbiased Counting Frame استفاده شد. دارای اضلاع خط قرمز و خط سبز روی فتومیکروگراف‌هایی که با میکروسکوپ مشاهده می‌شد انتخاب نموده و انواع سلول‌های جنسی که کاملاً درون این فریم و یا بر روی خطوط آن^۲ قرار گرفته بودند (شکل ۱ و ۲) با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ و روش تصادفی منظم شمارش گردید.



شکل ۱. شمارش سلول با Unbiased Counting Frame



شکل ۲. استفاده از نرم افزار Stereo Lite

¹ Counting Frame

² Acceptance Line

مختلف اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) نشان دادند. بیشترین اندازه‌ها در پارامتر مورد بررسی مربوط به فصل بهار بود (جدول ۱). میانگین وزن و حجم بیضه چپ در مقایسه با بیضه راست در همه فصول مقدار بیشتری را بخود اختصاص داد (نمودار ۱ و جدول ۱).

در اواخر فصل بهار در مرکز لوله سمنی فروس (شکل A ۴) و بخصوص تابستان (شکل B ۴) پر از اسپرماتوزوئید بود در حالیکه در فصل پاییز لوله فضای خالی بیشتر نشان می‌دهد (شکل C ۴). سلول‌های بینابینی یا لایدیگ (در بین لوله‌های منی‌ساز) مدور یا چند سطحی با سیتوپلاسم قرمز، هسته بیضی و درشت و بنفش رنگ مشاهده شدند که در فصل بهار و بخصوص تابستان متراکم‌تر بودند (شکل A-C ۴).

بافت پوششی اپیدیدیم مطبق کاذب با سلول‌های قاعده‌ای گرد و هسته گرد و سیتوپلاسم روشن (b.c) است. اپیدیدیم در هر سه فصل پر از اسپرم‌های (شکل C - ۵B) کشیده با سر بیضی و دم‌ی طویل دیده شد (D ۵).

در سمت داخلی مجرا تعداد زیادی مژه ثابت (ci) و در اطراف آن بافت همبند (C.T) مشاهده گردید (شکل ۵A). اپیدیدیم در دو فصل بهار و تابستان پر از اسپرم‌های کشیده با سر بیضی و دم‌ی طویل (D ۵) دیده شد که در پاییز کمتر بود (شکل C - ۵B).

بحث و نتیجه‌گیری

در خفاش مورد مطالعه نیز مانند بسیاری از پستانداران، یک جفت بیضه در کیسه اسکروتوم و خارج از حفره شکم مشاهده شد (شکل ۳ و A ۴). گر

جهت محاسبه قطر لوله‌های سمینیفروس نیز از نرم‌افزار *stereo Lite* استفاده گردید. بدین صورت که قطر کوچک و بزرگ ۱۲۰ لوله سمنی فروس اندازه‌گیری و میانگین آنها محاسبه شد (شکل ۲). داده‌های حاصل از اندازه‌گیری حجم و وزن بیضه و لوله‌های سمنی فروس بصورت میانگین با انحراف معیار ($\text{mean} \pm \text{SD}$)، با استفاده از نرم‌افزار آماری کروسکال والیس تحلیل گردید. برای مقایسه پارامترهای مورد بررسی از آزمون فریدمن استفاده شد و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انتخاب گردید.

نتایج

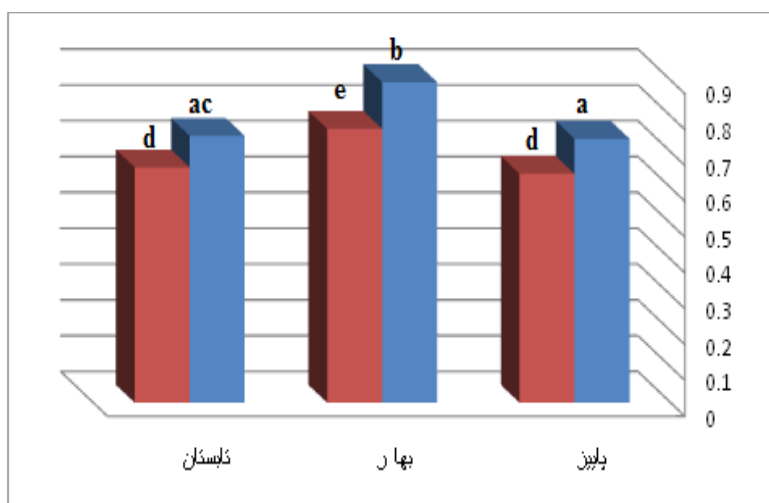
در خفاش میوه‌خوار مصری (شکل ۳) بیضه‌ها شیری رنگ، متقارن، پر خون و حجیم، در اسکروتوم نازک خارج از بدن قرار داشت. بیضه نسبت به جثه خفاش از اندام‌های نسبتاً درشت به نظر می‌آید و اطراف آن، در هر سه فصل نمونه‌گیری، بافت چربی شیری رنگ دیده شد که بوضوح در فصل بهار بیشتر بود مشاهده گردید (شکل A ۴).

همه انواع سلول‌های جنسی در فصل بهار در مقایسه به پاییز افزایش معنی‌دار نشان دادند (جدول ۲). با توجه به عمر کوتاه اسپرماتوسیت اولیه، میانگین تعداد اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه با هم در نظر گرفته شد. اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) بین میانگین تعداد انواع سلول‌ها در فصول مختلف بخصوص بهار و اطلاعات مرفومتری و میکرومتری بیضه در جدول ۱ و تعداد سلول‌های داخل آن در جدول ۲ آورده شده است. نظم ساختار بافت بیضه در فصول مختلف از مدل پستانداران تبعیت کرده و اسپرماتوزوئید از سطح به مرکز لوله سمنی فروس اتفاق می‌افتد (شکل A-C ۴). مطابق نتایج حاصل قطر لوله اسپرم ساز در فصول

جنسی نر در بعضی گونه‌های دیگر خفاش نیز به آن اشاره شده است [۱, ۳, ۸]. وزن و حجم بیضه در خفاش‌ها تابع عوامل مختلف از جمله شرایط اقلیمی و فصلی، توانایی ذخیره اسپرم، مدل جفت‌گیری و حتی اندازه کلنی جمعیت آنهاست [۳۴]. مشاهده اختلاف وزن بیضه چپ و راست نشان می‌دهد که بیضه‌ها بطور متناوب عمل نمی‌کنند و بیضه چپ فعالتر از بیضه راست است. گرچه قاطعیت در ابراز این مطلب نیاز به استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر و بررسی بافت بیضه در فواصل کوتاه‌تر (ماهانه) دارد.

چه تحقیقات نشان داده که در بعضی گونه‌ها از جمله گونه *Tadarida molossid aegyptiaca* [۲۰] یا گونه‌های خفاش دم موشی^۱ بیضه به‌طور دائمی درون شکم قرار دارد اما در بیشتر گونه‌های خفاش‌های بزرگ^۲ مهاجرت بیضه از شکم به کیسه اسکروتوم در خارج شکم گزارش شده است [۱۲, ۳۶] که با نتایج حاصل از این تحقیق کاملاً مطابقت داشت.

اختلاف میانگین وزنی بیضه چپ و راست (نمودار ۱ و جدول ۱) به فعالیت بیشتر بیضه چپ و تولید سلول‌های جنسی بیشتر آن مربوط می‌باشد که در مطالعات بافت‌شناسی انجام شده بر روی اندام



نمودار ۱. مقایسه میانگین وزن بیضه راست (ستون قرمز) و چپ (ستون آبی) در خفاش بالغ در فصول مختلف

جدول ۱. نتایج مرفومتری و میکرومتری بیضه خفاش میوه خوار براساس میانگین \pm خطای معیار میانگین ($\bar{X} \pm SEM$)

فصل	میانگین وزن بدن (gr)	وزن بیضه چپ (gr)	وزن بیضه راست (gr)	حجم بیضه چپ (gr)	حجم بیضه راست (mm ³)	قطر لوله اسپرم ساز (μm)
بهار	113 ± 0.09 ^a	0.895 ± 0.13 ^b	0.765 ± 0.19 ^e	0.862 ± 0.41 ^b	0.859 ± 0.28 ^e	235.9 ± 1.06 ^a
تابستان	108 ± 0.30 ^b	0.745 ± 0.03 ^{ac}	0.757 ± 0.21 ^d	0.859 ± 0.28 ^{ab}	0.857 ± 0.22 ^{ed}	229.7 ± 0.81 ^{ab}
پاییز	102 ± 0.21 ^c	0.730 ± 0.27 ^a	0.739 ± 0.30 ^d	0.857 ± 0.45 ^a	0.855 ± 0.45 ^d	227.8 ± 1.29 ^b

حروف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$)

¹ Rhinopomatidae

² Pteropodidae

است شروع پروسه دوم اسپرماتوزنز در زمستان باشد که با توجه به خصوصیت پلی استروس بودن ماده‌های این گونه [۲۷] و ارتباط اسپرماتوزنز در جنس نر با آمادگی جنس ماده برای لقاح توجیه می‌شود [۲۶]. افزایش میانگین سلول‌های لایدیگ در فصل بهار و تابستان نیز توجیهی برای افزایش سلول‌های اسپرماتوزنیک و پیشرفت اسپرماتوزنز است چون این سلول‌ها با ترشح هورمون تستسترون باعث پیشرفت روند اسپرماتوزنز می‌شوند [۳۲].

از آنجا که اسپرماتوزنز در پستانداران و از جمله خفاش‌ها تا حدودی به طول چرخه آمادگی جنسی در فرد ماده بستگی دارد [۳۴] و برای ماده‌های این گونه خفاش چند همسر گزینی و تولید مثل در دو فصل از سال گزارش شده است [۳۲]، انتظار دو نقطه اوج در اسپرماتوزنز در طول سال منطقی می‌باشد. گر چه اوج فعالیت جنسی در این تحقیق مطابق با نتایج تحقیقات [۲] در فصل بهار و تابستان است ولی اثر متفاوت شرایط اقلیمی هر منطقه و تفاوت در زمان آمادگی جنس ماده و حتی نوع تغذیه بر استراتژی‌های تولید مثلی در گونه‌های متفاوت خفاش نمی‌توان چشم پوشی کرد [۳۴، ۲۵، ۸].

چون برای خفاش میوه خوار مصری نر و ماده خواب زمستانی گزارش نشده است [۲۷] و در محل مورد بررسی (جهرم) شرایط در طول سال برای زیست این گونه خفاش مساعد است، حضور انواع سلول‌های جنسی و بخصوص اسپرماتید و اسپرم در لوله‌های اسپرم ساز می‌تواند حاکی از استمرار اسپرماتوزنز در طول سال باشد.

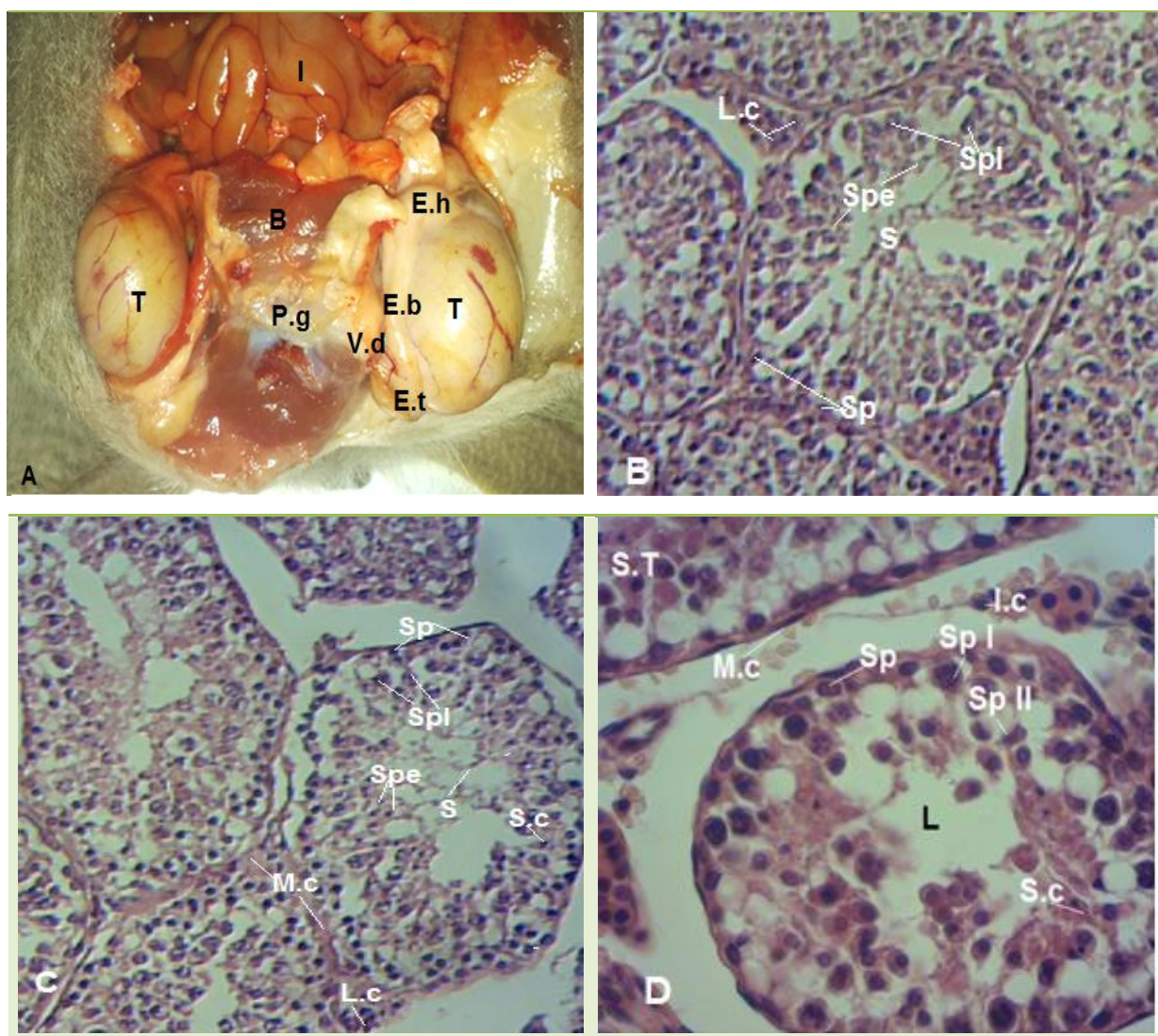
با این همه عدم آگاهی از طول پروسه اسپرماتوزنز این گونه خفاش در منطقه و تعداد کم نمونه صید شده در این تحقیق اظهار نظر قطعی در این رابطه را مشکل می‌سازد.

گر چه روند اسپرماتوزنز در این گونه طبق انتظار تابع طرح عمومی آن در دیگر پستانداران تابع نوسانات فصلی بود ولی حضور انواع سلول‌های جنسی و بخصوص تعداد زیاد سلول‌های اسپرماتید و مشاهده اسپرم زیاد در لوله سمنی فرس (شکل ۴) و در دم اپیدیدیم (شکل ۵) حاکی از وجود فعالیت جنسی در طول سال است که با مشاهدات [۱۳، ۸] در رابطه با خفاش میوه‌خوار *Artibeus lituratus* نیز تطابق دارد. آب و هوای نسبتاً گرم منطقه در غالب ماه‌های سال و اقامت این دسته از خفاش‌ها در غار با دمای تقریباً ثابت در طول سال از یک طرف و دسترسی همیشگی به منابع غذایی از طرف دیگر امکان فعالیت جنسی در طول سال را برای آنها مهیا می‌کند [۲۸، ۶]. گر چه از تأثیر نوسانات فصلی بر تغییرات توده سلولی در بیضه‌ها و به تبع آن تغییرات وزن و حجم بیضه‌ها نمی‌توان چشم پوشی کرد (جدول ۱). به دلیل توسعه اسپرماتوزنز و افزایش تعداد سلول‌های جنسی در فصول بهار و تابستان، پارامترهای مورد بررسی اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ با فصل پاییز نشان دادند (جدول ۲). بنا به این نتایج، به نظر می‌رسد در تابستان اسپرم‌ها حرکت به سمت اپیدیدیم را شروع می‌کنند که با کاهش توده سلولی و به تبع آن وزن و حجم بیضه در فصل پاییز همراه است (جدول ۱ و شکل ۴). کاهش میانگین تعداد سلول‌های جنسی باستثنای اسپرماتید در در فصل پاییز (جدول ۲) احتمالاً مربوط به طی مراحل نهایی پروسه اسپرماتوزنز در تابستان و آمادگی برای لقاح است تا حیوان ماده دوره بارداری را در زمستان گذرانده و پرورش نوزاد در بهار (فصل فراوانی غذا و دمای مناسب) صورت گیرد. از طرفی چون در فصل بهار نیز نقطه اوج دیگری در فعالیت جنسی حیوان نر دیده می‌شود (جدول ۱ و ۲)، ممکن

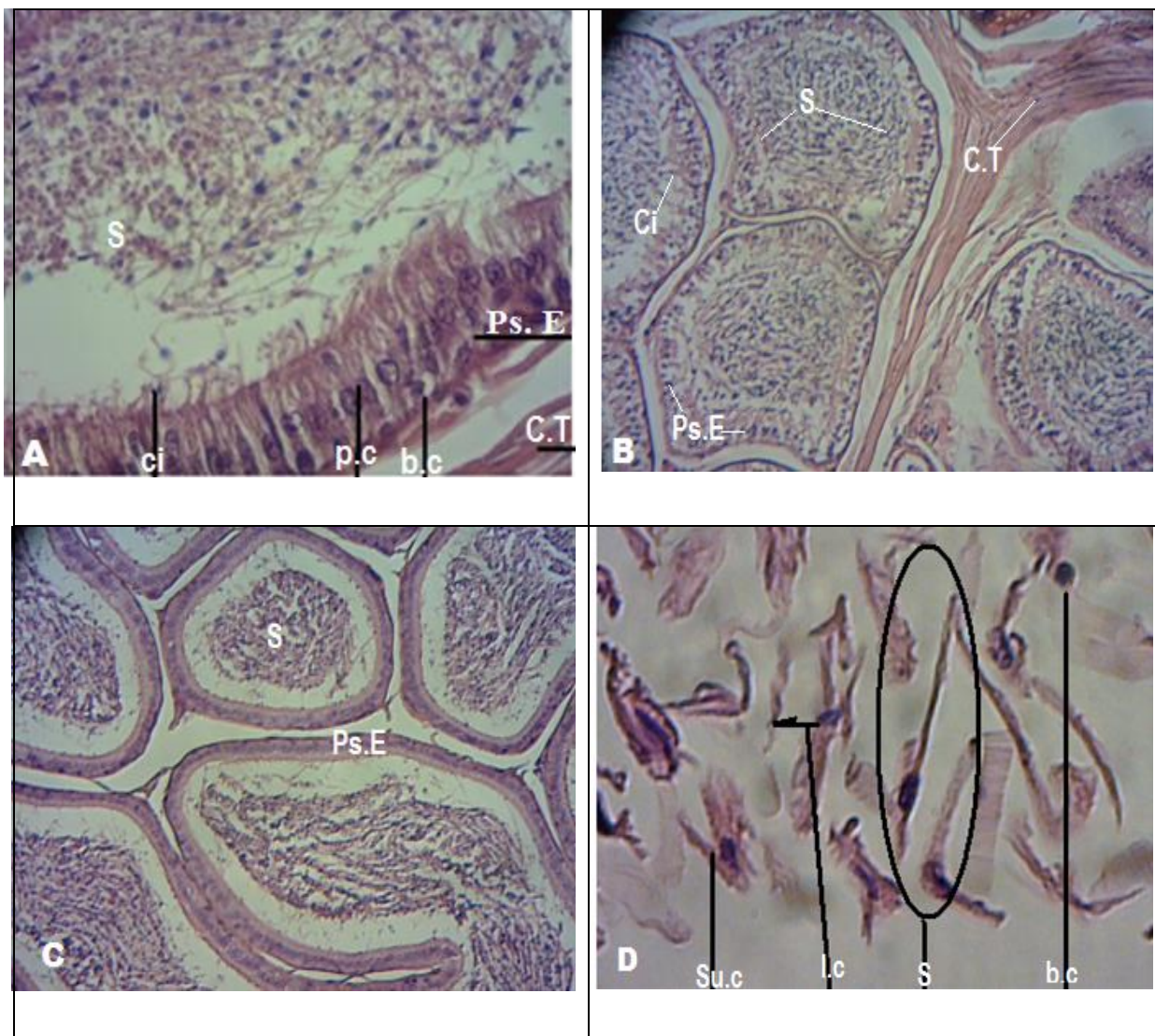
جدول ۲. نتایج شمارش سلول‌های بیضه خفاش میوه خوار براساس میانگین \pm خطای معیار میانگین

فصل نمونه برداری	تعداد نمونه	اسپرمتوگونی ($\bar{X} \pm SEM$)	اسپرمتوسیت ($\bar{X} \pm SEM$)	اسپرمتاید ($\bar{X} \pm SEM$)	سرتولی ($\bar{X} \pm SEM$)	لایدیگ ($\bar{X} \pm SEM$)
بهار	۷	۱۵۸/۸×۱۰ ^۶ a	۲۹۴/۶×۱۰ ^۶ a	۳۸۲/۷×۱۰ ^۶ a	۱۱/۵۹×۱۰ ^۶ a	۳۹/۳×۱۰ ^۶ a
تابستان	۷	۱۴۸/۴×۱۰ ^۶ b	۲۶۲/۵×۱۰ ^۶ b	۳۲۱/۷×۱۰ ^۶ b	۱۰/۶×۱۰ ^۶ b	۳۷/۵×۱۰ ^۶ b
پاییز	۷	۱۴۰/۵×۱۰ ^۶ bc	۲۴۸/۹×۱۰ ^۶ c	۲۸۴/۲×۱۰ ^۶ c	۱۰/۲×۱۰ ^۶ bc	۳۶/۴×۱۰ ^۶ b

حروف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی دار (P<0.05)



شکل ۴. موقعیت بیضه در بدن خفاش میوه خوار مصری (A)، بافت بیضه در فصل بهار (B)، تابستان (C)، پاییز (D) بیضه (T)، سر اسپیدیوم (E.h)، بدن اسپیدیوم (E.b)، دم اسپیدیوم (E.t)، غده پروستات (P.g)، مجرای دفران (V.d)، مثانه (B)، روده (I)، اسپرم (S)، اسپرمتوگونی (Sp)



شکل ۵. بافت اپیدیدیم خفاش میوه خوار مصری در فصل بهار (A)، تابستان (B)، پاییز (C) و ریخت شناسی اسپرم (D) سلول لایدیگ (L.c)، سلول میوید (M.C)، مجرای لوله منی ساز (L)، سلول های قاعده ای (b.c)، سلولهای اصلی (P.c)، مزک ثابت (Ci)، اسپرماتوسیت I و II (SpI, II)، سلول سرتولی (S.c)، اپیتلیوم مطبق کاذب (Ps.E)، بافت همبند (C.T)، اسپرم (S)

اسپرماتوزن همراه با کاهش وزن بیضه در پاییز شاهدهی برای کاهش فعالیت جنسی موجود در این فصل است که مطابق با تحقیقات [۲۵، ۱۰] است. کاهش سلول های لایدیگ در فصل پاییز نیز باعث کاهش سطح تستوسترون (گر چه در این تحقیق اندازه گیری سطح تستوسترون میسر نشد) شده که نتیجه آن، کاهش اسپرماتوزن و انواع سلول های جنسی است.

در این تحقیق جهت جلوگیری از وارد شدن شوک و آسیب های احتمالی به جمعیت خفاش های ساکن هیچ بازدید و نمونه برداری در فصل زمستان انجام نشد لذا از تغییرات این پروسه از پاییز تا زمستان اطلاعاتی حاصل نشد.

کاهش قطر لوله ها در پاییز در مقایسه با دو فصل دیگر، می تواند به علت کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایشی باشد که خود تابع کاهش اسپرماتوزن و کاهش جمعیت سلول های اسپرماتوزنیک است. کاهش

Reference

- [1] Abas Fard E., Ghassemi F. 2017. Histological and Morphometrical study of male reproductive tract in *Rousettus aegyptiacus* (Mammalia: Megachiroptera) in Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(1): 229-234.
- [2] Akmalı V., Sharifi, M., Esmaeili R.S., Ghorbani R. 2008, Evidence of sperm storage in *Myotis capaccinii* (Chiroptera: vespertilionidae) in western Iran. *Journal of Veterinary Research*, 63(2): 47-52.
- [3] Albayrakı I., Asan N., Yorulmaz T. 2008, The Natural History of the Egyptian Fruit Bat, *Rousettus aegyptiacus*, in Turkey (Mammalia: Chiroptera). *Turkish Journal of Zoology*, 32: 11 -18.
- [4] Barclay R. M. R., Jacobs D.S., Harding, C. T., McKechnie A. E., McCulloch S.D. 2017, Thermoregulation by captive and free-ranging Egyptian rousette bats (*Rousettus aegyptiacus*) in South Africa. *Journal of Mammalogy*, 98 (2), 572–578.
- [5] Barros M. S., Morais D. B., Araújo M. R., Carvalho TF., Matta S.P. 2013. Seasonal variation of energy reserves and reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae) *Journal of Biology*. 73 (3), 629.
- [6] Baydemir N.A., 2014. Bat Fauna of Turkey and Northern Cyprus: Species Diversity, Anthropogenic Roost Disturbance and Conservation Status. *Journal of International Environmental Application & Science*, 9 (5): 590-596
- [7] Beguelini M. R., Taboga S. R., Morielle-Versute E. 2012, Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in Pallas's mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Microscopy research technique*. 75 (7): 856–868.
- [8] Beguelini, M. R., Puga C. C., Martins F. F., Betoli A. H., Taboga S. R., Morielle-Versute E. 2013, Morphological variation of primary reproductive structures in males of five families of neotropical bats. *Anatomical Research*. 296 (1):156-67.
- [9] Benda, P., Faizoláhi, K., Andreas, M., Obuch J., Reiter A., Sevcík S., Ashraf, I.S., and *et al.* 2012. Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean

با وجود این، افزایش معنی‌دار سلول‌های اسپرماتید در فصل پاییز حاکی از پیشرفت پروسه اسپرماتوژنز و آمادگی برای لقاح است که با طول دوره بارداری ماده (حدود ۴/۵ ماه) در زمستان هماهنگ است [۳]. سلول‌های سرتولی نیز تابع روند تغییرات مشاهده شده در بقیه سلول‌هاست که دور از انتظار نبود. با توجه به نقش حمایت‌کننده این سلول برای اسپرماتید و اسپرم و همچنین کمک به آزاد شدن آنها بدخل مجرای لوله اسپرم‌ساز طبیعی است که در زمان فعالیت جنسی تعداد بیشتری از آن باشد. عدم اختلاف تراکم آن در پاییز و تابستان هم شاید بدلیل استمرار اسپرماتوژنز در این گروه باشد که این سلول‌ها بتوانند نقش تنظیمی و حمایتی خود را در اسپرماتوژنز ایفا کنند [۳۲، ۳۳].

نتیجه‌گیری

مطالعات استریولوژیکی انجام شده بر روی مقاطع بافتی تهیه شده از بیضه‌ها حاکی از تبعیت این گروه از خفاش‌ها از طرح عمومی اسپرماتوژنز در پستانداران است و حضور اسپرماتید و اسپرم در مرکز لوله‌های سمی فروس و حتی اپیدیدیم در همه فصول مورد بررسی، می‌تواند نشان دهنده استمرار اسپرماتوژنز در کل طول سال باشد و اوج آن در فصل بهار و تابستان است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حوزه پژوهش اداره کل حفاظت محیط زیست فارس و دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم جهت همکاری ارزشمندشان نهایت سپاسگزاری را داریم.

- and Middle East. Part 10. Bat fauna of Iran.
- [10] Carrie E. S., Henry J. N., Norbert J. C. 2013. Seed Dispersal in the Dark: Shedding Light on the Role of Fruit Bats in Africa. *Biotropica*.45(4).450-456.
- [11] Gloriana G., Vonhof M.J. 2011.Reproduction and Growth in a Neotropical Insectivorous Bat *Acta Chiropterologica* 13 (1):147-155.
- [12] Danmaigoro, A., Onu J., Sonfada M., Umaru, M., Hena, S., Mahmuda, A. 2014. Histology and Histometric Anatomy of the Male Reproductive System of Bat (*Eidolon helvum*), *Journal of Histology*, 1-6.
- [13] Duarte, A. P. G., Talamoni, S. A. 2010, Reproduction of the large fruit-eating bat *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Brazilian Atlantic forest area. *Mammalian Biology*, 75: 320-325.
- [14] Durant K. A., Hall L. M., Cisneros, R. M., Hyland Wilig, M. R. 2013. Reproductive phenologies of phyllostomid bats in Costa Rica. *Journal of Mammalogy* 94:1438–1448.
- [15] Erfani M., Dorost G. M. 2009, Principles of Stereological and Micrometric Techniques. 1th Ed. Shahid Chamran. University of Ahvaz Publications, 310 pp.
- [16] Fenton M. B., Simmons N. B. 2014. Bats: A World of Science and Mystery. Hardcover. The University of Chicago press. 240 pp.
- [17] Frick W. F., Paul M. F., Heady P. A, Earl A. D., Arteaga M. C., Calva P. C. 2018, Seasonal ecology of a migratory nectar-feeding bat at the edge of its range . *Journal of Mammalogy*, 99(5), 1072–1081.
- [18] Furey N. M., Racey P. A, Touch V., Cappelle J. 2018, Reproductive Ecology of Wrinkle-Lipped Free-Tailed Bats *Chaerephon plicatus* (Buchanan, 1800) in Relation to Guano Production in Cambodia. *Diversity*, 10(91). 2-12.
- [19] Ghobadian Z., Ghassemi F. 2017, The ovary of fruit bat *ROSSETUS AEGYPTIACUS* (Megachiroptera Pteropodidae) in southern of Iran. *Cibtech Journal of Zoology*, 4 (1): 57-61.
- [20] Grange, A., Mac, V. D., Merwe, M., Bester, M. 2011. Reproductive Strategy of the Egyptian Free-Tailed Bat, *Tadarida aegyptiaca*, from a Subtropical Latitude (25°S) in South Africa. *African Zoology* 46 (1):169-175.
- [21] Heese, M. S., Rogah, J., Schulkeh, O. 2013. Food abundance affects energy intake and reproduction in frugivorous female Assamese macaques. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67:1053–1066.
- [22] Javanbakht H., Sharifi M., Akmali V., Ghaderi H., Salehzadeh A. 2014, Variation Pattern of Sperm Competition in Two Bats, *Pipistrellus kuhlii* and *Hypsugo savii* (Chiroptera: Vespertilionidae) During Winter in Iran. *Journal of Zoological and Bioscience Research*, 1 (4): 44-48.
- [23] Korine, C. 2016. *Rousettus aegyptiacus*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. e.T29730A22043105.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20162.RLTS.T29730A22043105.en>
- [24] Kunz T. H., Braun D., Torrez E., Bauer D., Lobova T., Fleming TH. 2011. Ecosystem services provided by bats. *Ann N Y Acad Sci*. 1223:1-38.
- [25] Lee J. H. 2018. Male reproductive cycle of hibernating Korean greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum korai* (Chiroptera: Rhinolophidae): annual cycle of the seminiferous epithelium and morphological changes of the testes. *The European Zoological Journal*, 85:1, 105-118.
- [26] Linton D. M., Macdonald D. W. 2018. Spring weather conditions influence breeding phenology and reproductive success in sympatric bat populations. Available at <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12832>.
- [27] Lucan R., Bartonicka T., Artonica T., Benda P., Bilgin R., Jedlicka P., et al. 2014. Reproductive seasonality of the Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*) at northern limits of its distribution. *Journal of Mammalogy*, 95(5), 1036-1042.
- [28] Mello M. A. R., Kalko, E. K. V., Silva, W. R. 2009. Ambient temperature is more important than food availability in explaining reproductive timing of the bat *Sturniralilium* (Mammalia: Chiroptera) in

- a montane Atlantic Forest. Canadian Journal of Zoology, 87: 239–245.
- [29] Moadjem A., Reside A. E. 2012, Breeding season of *Epomophorus walhbergi* in the Lowveld of Swaziland. African Zoology 47:321–325.
- [30] Research 30-Molinari J., Soriano P. 2014. Breeding and agestructure seasonality in *Carolliabrevicauda* and other frugivorous bats (Phyllostomidae) in cloud forests in the Venezuelan Andes. *Therya*, 5, 81-109.
- [31] Montiel S, Estrada A., Leon P. 2011. Reproductive Seasonality of Fruit-Eating Bats in Northwestern Yucatan, Mexico. *Acta Chiropterologica*. 139-145.
- [32] Morais D. B., Barros M. S., Freitas M. B., Paula TA.,Matta SL. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in the testes of the bat *Sturniralilium*. *AnimReprodSci* 2014; 147 (3–4):180–186.
- [33] Morais D. B., Heringer L. C., Puga P., Antônio R., Paula R, Freitas M. B., et al. 2017. The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodusrotundus* under a histomorphometric view. *PLoS One*. 2 (3): e0173856.
- [34] Notini A. A., Farias T. O., Talamoni S. A., Godinho H. P. 2015. Annual male reproductive activity and stages of the seminiferous epithelium cycle of the large fruit-eating *Artibeuslituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) *Zoologica* 32 (3): 195–200
- [35] Racey P. A., Entwistle A. C. 2000, Life history and reproductive strategies of bats. In: *Reproductive Biology of Bats*, (eds) E.G. Crichton & P.H. Krutzsch, pp. 363–401.
- [36] Ruiz-Ramoni D., Ramoni-Perazzi P., Muñoz-Romo M. 2017, Reproductive pattern of the large fruit-eating bat, *Artibeus amplus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in the Venezuelan Andes. *Revista de Biología Tropical*. 65 (1): 335-344.

Stereological study of changes of testicular tissue in Egyptian Fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*) throughout the year

Ghassemi F.^{1*}, Abasfard E.²

1. Department of Biology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

2. Department of Biology, Education, Fasa, Iran

* Email: ghassei.fr@gmail.com

Received: 2 July 2018

Accepted: 10 June 2019

Abstract

Due to importance of bats in ecosystem and the limited information about reproduction of this useful organism, the spermatogenesis of the Egyptian Fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*) was studied stereologically in three seasons, spring to autumn, as the first record. For this purpose, 7 male bats were captured by mistnet in Sangtārashan Cave (Fars- Jahrom), and transferred to the laboratory at the end of every season. After anesthetization and dissection of bats, their testicles were removed, measured and fixed. The sections (5µm) were prepared from fixed samples and stained. The volume of studied parameters was determined by using Cavallier method, and seminiferous diameters and testicular cells number were measured with stereo Lite software. Obtained data were analyzed by Kruskal–Wallis, and compared by Friedman test. According to obtained results, the testicles were in the scrotum out of the body with significant difference of weight and volume in the left and right testis. The maximum weight ($0.765 \pm 0.19\text{g}$) and volume ($862 \pm 0.41 \text{ mm}^3$) in spring. The germ cells and many sperm were observed in the lumens in all seasons. The diameter of seminiferous tubule with significant difference ($P < 0.05$) between spring ($235/90 \pm 1.06 \text{ µm}$) and autumn ($227.82 \pm 1.29 \text{ µm}$) were observed. Maximum mean of number of spermatocyt (294.6×10^6), sertoli (11.59×10^6) and lydig (39.30×10^6) were estimated in spring and the lowest of them in autumn, but the maximum number of spermatid (284.2×10^6) were in autumn. According to these results, the peak of sexual activity of this bat species is in spring and summer.

Keywords: Germ cells, Seminiferous tubule, Stereological study, Egyptian fruit bat.