ارزیابی پارامترهای باروری اسپرم افعی زنجانی (*Vipera albicornuta*) در بستان آباد و طارم

پروانه صفدریان[۱]، فاطمه توده دهقان[۲]، عبدالحسین شیروی[۱*]

۱ـ گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
۲ـ بخش جانوران سمی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک کرج، ایران
*مسئول مکاتبات: shiravi738@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۱

چکیده

ارزیابی کیفیت اسپرم به عنوان یک ابزار کارآمد در بررسی پتانسیل تولیدمثلی جانور نر به منظور تکثیر و تداوم نسل گونه‌های مورد مصرف پزشکی، حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه ٦٦ حلقه مار زنجانی نر از سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ از دو زیستگاه کوهستانی و سردسیری، بستان آباد در استان آذربایجان شرقی و طارم زنجان ایران، جمع‌آوری شدند. خصوصیات مورفولوژی جانور شامل، وزن بدن، طول بدن از پوزه تا کلوآک، مشخصات مجرای وازدفران و پارامترهای اسپرم مجرایی شامل: غلظت، تحرک و بقاء اسپرم مورد مطالعه قرار گرفت و مجرا از لحاظ حضور و عدم حضور اسپرم بررسی گردید. نتایج نشان داد که حداکثر وزن بدن و طول پوزه تا کلوآک در نمونه-های هر دو منطقه در فصل پاییز بود. مورفولوژی مجرای وازدفران افعی زنجانی نر شامل سه قسمت پروکسیمال، مدین و دیستال می‌باشد. بیشترین میانگین طول مجرای وازدفران راست و چپ در نمونه‌های بستان آباد در پاییز و کمترین اندازه آن در بهار بود در حالیکه در نمونه‌های طارم بر عکس آن بود. بیشترین میانگین درصد غلظت اسپرم در نمونه‌های بستان آباد در بهار و در نمونه‌های طارم در پاییز بود. بر اساس یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که میزان اسپرم‌های بالغ با کیفیت تولیدمثلی قابل قبول در مجرای وازدفران در اردیبهشت، مهر و آبان در بالاترین حد ممکن است و این افعی‌ها در بهار و پاییز دارای اسپرم‌های پرتحرک و به میزان نسبتا زیاد در بخش دیستال هستند و به نظر می‌رسد آماده جفتگیری باشند.

کلمات کلیدی: افعی زنجانی نر، مجرای وازدفران، کیفیت اسپرم

مقدمه

کیفیت اسپرم بعنوان شناسه پتانسیل باروری جانور نر از عوامل اصلی مورد توجه در برنامه‌های افزایش تنوع ژنتیکی و باروری یاری شده در جانوران اهلی و حیات وحش است. ارزیابی کیفیت اسپرم از تکنیک‌های اصولی و ارزشمند برای تولیدمثل، تکثیر و تداوم نسل گونه‌های جانوری با محدوده‌های جغرافیائی خاص، مصارف درمانی و تحقیقاتی است. مطابق استاندارد سازمان سلامت جهانی، پارامترهای اسپرم شامل تعداد، تحرک، بقاء و شکل ظاهری اسپرم می‌باشد و در گونه‌های مختلف جانوری و شرایط زیستگاهی متفاوت متغیر است [٤١]. افعی زنجانی *Vipera albicornuta* متعلق به خانواده Viperidae جزء مارهای سمی، زنده زا و بومی ایران بوده و هیچ زیرگونه‌ای ندارد. از لحاظ انتشار جغرافیایی و پراکندگی در دره‌های زنجان وکوه های اطراف در شمال غرب ایران و محل مشخص آن ابهر در استان زنجان می-باشد [۲۷]. حداکثر طول بدن افعی ۸۲ سانتی‌متر، دم ۵ سانتی‌متر، تغذیه از موش و مارمولک، از لحاظ زادآوری بین ۸-۳ نوزاد در فصل تابستان است [۱۰].

تولید اسپرم در مارها معمولاً در دو دوره انجام می گیرد یکی قبل از جفت گیری و پس از زمستانخوابی، شروع در فصل بهار و پایان پس از عمل جفت‌گیری و دوره دوم تولید اسپرم پس از دوره اول یعنی در همان فصل بهار شروع می شود و در آخر تابستان به پایان می‌رسد. اسپرم

تولید شده در دوره دوم برای مصرف در بهار سال بعد در مجرای وابران ذخیره می‌شود [۸].

مطالعات زیادی در بسیاری از خزندگان و در مارهای نر نشان داد که مکان اصلی ذخیره اسپرم، مجاری بویژه مجرای دفران می‌باشد [۱، ۲، ۱۱، ۱۲، ۱۷، ۳٦]. اسپرم در اکثریت نرها در این مجرا درسراسر سال وجود دارد [٤، ۳٤].

ذخیره سازی اسپرم متناسب با دمای بهینه تولید گامت می‌باشد [۳، ۱۹، ۲۰، ۳۵].

تنوع و تغییر در کیفیت اسپرم می‌تواند بعنوان یک اصل در رابطه با زمان ذخیره‌سازی اسپرم دارای پیامدهای مهمی برای زنده ماندن اسپرم، داشتن نیروی توانائی انتخاب طبیعی برای انتخاب جفت در طول مدت ذخیره سازی باشد [۲۱، ۳۰، ۳۱].

مطالعه‌ای در رابطه با ذخیره اسپرم در جنس نر گونه *Crotalus durissus terrificus* در جنوب شرقی برزیل صورت گرفت. در این راستا اطلاعاتی در رابطه با تغییرات فصلی در تعداد، تحرک و ذخیره اسپرم در امتداد مجرای دفران در طول سال بدست آمده است که نشان می‌دهد ذخیره سازی و تحرک اسپرم در طول کل مجرای دفران در طول سال است. این مشخصه مربوط به یک چرخه تولید مثل وابسته به بعد از جفت‌گیری در مارهایی با مناطق آب و هوایی معتدل می‌باشد [۳۷].

در کشور برزیل در طی تحقیقی که بر روی مار زنگی صورت گرفت از کل مقدار اسپرم به دست آمده، بخشی برای محاسبه تراکم اسپرماتوزوئیدها و بخش دیگر آن برای بررسی تحرک و آزمایش‌های زمان بقاء استفاده شد. بطور کلی شکل طبیعی اسپرم در انواع خزندگان از جمله افعی‌ها دارای آکروزوم خارشکل اند لذا تنوع مورفولوژیکی اسپرم نه تنها در مارها بلکه در تمام اعضای فلس‌داران می‌تواند با ویژگی‌های تولیدمثلی این گونه‌ها در ارتباط باشد [٤۲] و اگر اسپرم از اشکال غیر طبیعی کمتری برخوردار باشد و درصد سلول‌های نرمال بالاتر باشد شرایط مساعدتری را برای لقاح خواهد داشت [۲۳].

حجم کل اسپرم بدست آمده متناسب با اندازه مار بود و تنوع فصلی در حجم آن به چشم می‌خورد. مدت زمان ماندگاری اسپرم در دمای آزمایشگاه در حدود ۸ ساعت بود که به طور متوسط میانگین درجه دما در تابستان ^{o}C ۲٤ و در زمستان ^{o}C ۲۰ بود.

اسپرم استخراج شده از این گونه که فریز شده بودند پس از مدت زمان ۲٤ ساعت باز شدن یخ آنها هنوز دارای تحرک بودند. در مطالعه‌ای بر روی مجاری تولید مثل لاک پشت پوسته نرم نر، *Trionyx sinensis*، اسپرماتوژنز در بهار در ماه اردیبهشت آغاز شد و سپس در پاییز به اسپرم بالغ تبدیل شد که به عنوان یک رویداد دوره‌ای است. اسپرماتوژنز در زمستان غیرفعال است اما، با این وجود، در این گونه اپیدیدیم در طول کل سال حاوی اسپرم است. برای سنجش تحرک اسپرم از میکروسکوپ استفاده شد و تحرک اسپرماتوزوآ به گروه‌های B، A، D و C تقسیم‌بندی شدند.

مطالعات بسیاری در رابطه با پارامترهای پویای اسپرمی بعنوان کمک به استراتژی های تولیدمثلی که خود می‌تواند منجر به بهبود حفاظت از گونه‌ها باشد، صورت گرفته است [٤۰].

بنابراین در این مطالعه با در نظر گرفتن گونه ارزشمند افعی زنجانی در ایران، سعی بر آن شد تا پی به میزان حضور اسپرم‌های بالغ با کیفیت تولید مثلی قابل قبول در مجرای وازدفران برد تا بتوان به حفظ این گونه انجامید.

مواد و روش کار

در این مطالعه خصوصیات مورفومتریک جانور شامل اندازه‌گیری وزن بدن، طول بدن از پوزه تا کلوآک، مشخصات مجرای وازدفران و سپس پارامترهای اسپرم شامل: غلظت، حرکت و بقاء اسپرم در مجرای وازدفران و در نهایت مطالعه ماکروسکوپی بافتی مجرا از لحاظ حضور و عدم حضور اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از ٦٦ حلقه زنجانی نر در اوایل بهمن ماه سال ۱۳۹۰ تا اواخر دیماه سال ۱۳۹۱ از مناطق بستان آباد

در آذربایجان شرقی که از نظر جغرافیایی بین ٤٦ درجه و ۳۰ دقیقه و ٤٧ درجه و ١٤ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۳۲ دقیقه و ۳۸ درجه و ٤ دقیقه عرض شمالی قرار دارد و طارم–زنجان که در مدارهای جغرافیایی ٤٨ درجه و ۳۰ دقیقه تا ٤٩ درجه و ١٤ دقیقه طول جغرافیایی از نصف‌النهار گرینویچ و ۳٦ درجه و تا ۳۸ دقیقه تا ۳۷ درجه و ۱۳ دقیقه عرض شمال از خط استوا قرار گرفته و اقلیم سردسیر دارند جمع آوری شد.

مارها پس از جمع آوری، انتقال به آزمایشگاه، انگل‌زدایی و قرنطینه، در شرایط متعارف در قفس‌های مخصوص مار تا زمان انجام مطالعه، نگهداری شدند.

بعد از تعیین جنسیت، مارها ابتدا با ماده بیهوشی، بیهوش و سپس از طریق تزریق الکل ۹٦٪ درون حفره چشمی کشته شدند.

وزن بدن با استفاده از ترازوی (ساعتی، ساخت آلمان با حساسیت ۵ گرم) و طول بدن از پوزه تا کلوآک (SVL) و طول دم (TL) با متر ثابتی اندازه گیری گردید [٤٤،١٤].

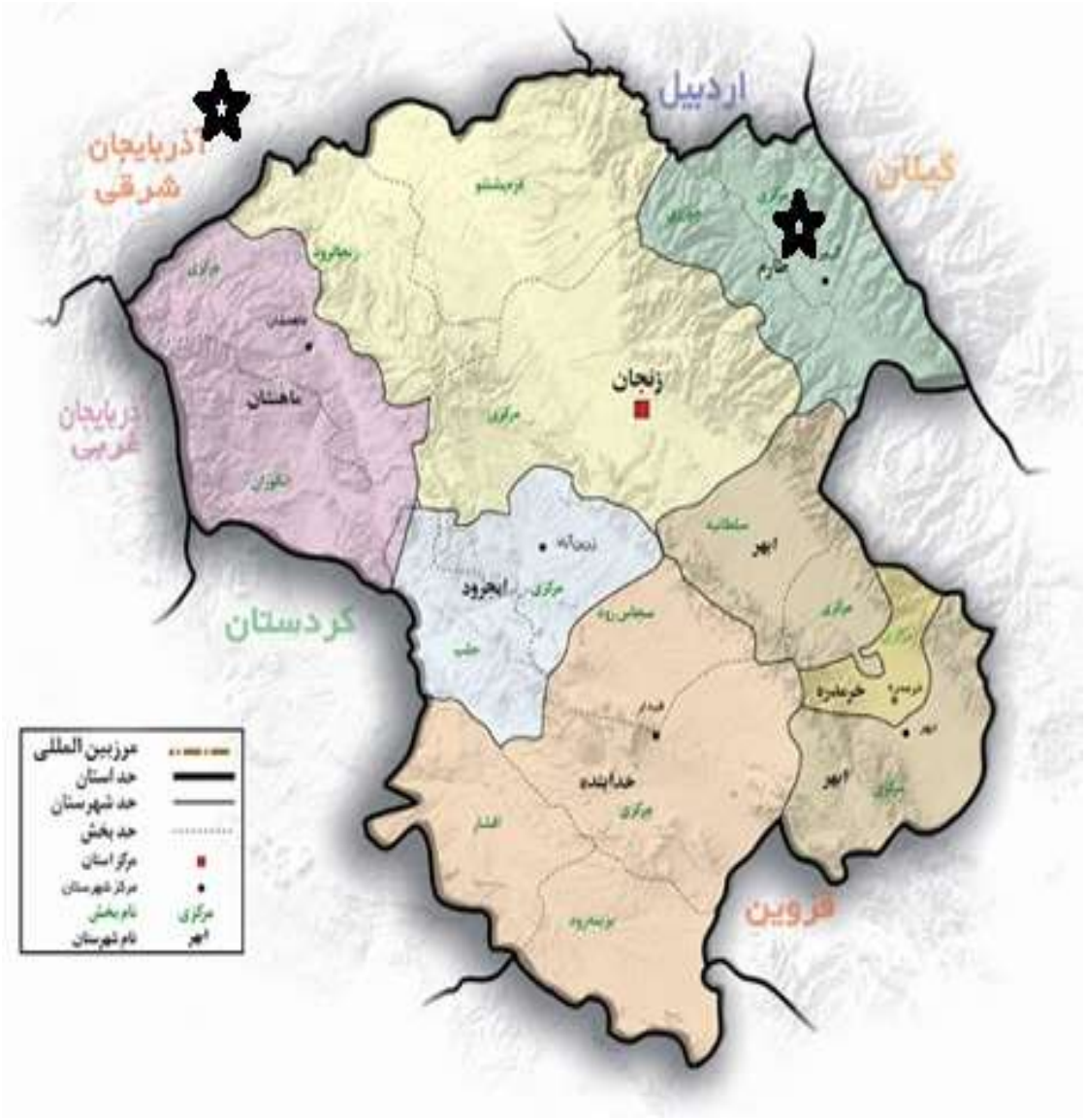
پس از کالبدگشائی جانور، مجرای وازدفران در زیر استریومیکروسکوپ بررسی و خارج گردید و طول آن با استفاده از خط‌کش کالیبره شده، اندازه گیری شد.

برای جمع‌آوری اسپرم، مجرای وازدفران با قیچی استریل در بافر PBS و یا نرمل سالین خرد شد و به روش مظفری و همکاران [۲۸]، نمونه‌های اسپرم آماده گردید. پارامترهای کمی و کیفی اسپرم شامل غلظت، میزان تحرک و زنده ماندن (درصد بقا) در نمونه‌های اسپرم حاصل از مارهای زنجانی بستان آباد و طارم و بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO: Worl Health Organization) مطالعه شد [٤۳].

برای بررسی غلظت اسپرم از لام هموسیتومتر (نئوبار) استفاده شد [٤٠،۳۳]. برای مطالعه تحرک اسپرم چهار کلاس، A (پیش رونده مستقیم سریع)، B (پیش رونده مستقیم و غیرمستقیم آرام)، C (در جا متحرک) و D (بدون حرکت) در نظر گرفته شد و تعداد اسپرم‌ها در ۵ میدان در بزرگنمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری شمارش گردید. سپس درصد اسپرم‌های متحرک (A+B+C) و اسپرم‌های غیر متحرک (D) محاسبه شد [٦].

جهت بررسی اسپرم‌های مرده و زنده، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم روی یک لام گذاشته و با یک قطره کوچک (۷ میکرولیتر) از ائوزین (۰/۵ درصد در نرمال سالین) مخلوط شد و بلافاصله لامل گذاری انجام گرفت و با بزرگنمایی ٤٠ × میکروسکوپ نوری اسپرم‌های زنده (بی‌رنگ) و اسپرم‌های مرده (رنگ گرفته) شمارش شدند. مورفولوژی اسپرم‌ها بر اساس شکل ظاهری طبیعی یا اشکال غیر طبیعی تععین شدند و اسپرم‌ها در دو گروه نرمال و غیرنرمال قرار گرفتند [۳۲،١٦].

برای مقایسه آماری پارامترهای دو متغیره از روش t.test استفاده گردید و پارامترهای توصیفی به صورت میانگین ارائه شدند.



شکل ۱ـ نقشه جغرافیایی آذربایجان شرقی (بستان آباد) و زنجان (طارم)
(ستاره ها محل صید نمونه را نشان می دهند)

نتایج

پارامترهای مورفومتریک افعی زنجانی نر بستان آباد و طارم شامل وزن بدن، طول بدن از پوزه تا کلوآک و طول دم در جدول ۱، علاوه بر آن مشخصات مجرای تولیدمثلی نمونه‌های بستان آباد در جدول ۲ و برای جانوران طارم در جدول ۳ آورده شده اند. میانگین غلظت، درصد تحرک و بقاء اسپرم از نمونه های منطقه بستان آباد در جدول ٤ و در مورد نمونه‌های طارم در جدول ۵ بیان شده است. نتایج مربوط به میزان اسپرم در جدول ٦ نشان داده شده است.

جدول ۱ـ میانگین پارامترهای مورفومتریک افعی زنجانی نر بستان آباد و طارم در فصول مختلف (Mean ± SD)

پارامتر	بستان آباد			طارم		
	وزن بدن (g)	طول بدن SVL(cm)	طول بدن TL(cm)	وزن بدن(g)	طول بدن SVL(cm)	طول بدن TL(cm)
فصل / ماه						
بهار	۱۵۱ ± ٤۷/۲۵ n = ۱۰	٦۷/۳۵ ± ٤/۲٦ n = ۱۰	٦ ± ۰/٤۱ n = ۱۰	۱۷۸ /۳۳±۳۹/۱۳ n =۱۰	٦٦/۹٤ ± ۵/۲۵ n =۱۰	۵/۷۷ ± ۰/٤٤ n =۱۰
فروردین	۲۲۵ ± ٤۲/٤۳ n = ۲	۷۳/۲۵ ± ٦/۷۱ n = ۲	۵/۷۵ ± ۰/۳۵ n = ۲	۱۵٦/٦۷±۲۲/ ۵۵ n = ۳	٦٦/۵۰ ± ۵/۲۲ n = ۳	۵/۵ n = ۳
اردیبهشت	–	–	–	۱۷۲/۵۰±٤۳/٤۹ n = ۵	٦٦/٤۰ ± ٦/۰۷ n = ۵	۵/۹۰ ± ۰/۵٤ n = ۵
خرداد	۱۳۲/۵۰ ±۲۵/٦۳ n = ۸	٦۵/۸۷ ± ۲/۱۱ n = ۸	٦/۰٦ ± ۰/٤۹ n = ۸	۱۸۷/۵۰±٦۰/۱۰ n = ۲	٦۹/۵۰±۲/۱۲ n = ۲	٦ n = ۲
تابستان	۱٦۲/۵۰±۳۲/۱٦ n = ۸	۷۱/۷۵ ± ۵/۰۱ n = ۸	۵/۹۳ ± ۰/٦۲ n = ۸	۱۰۰ ±۱٤/۱٤ n = ۲	٦٦ ± ۳/۵۳ n = ۲	٦/۲۵ ± ۰/۳۵ n = ۲
تیر	۱٦۲/۵۰ ± ۳۲/۱٦ n = ۸	۷۱/۷۵ ± ۵/۰۱ n = ۸	۵/۹۳ ± ۰/٦۲ n = ۸	۱۰۰ ±۱٤/۱٤ n = ۲	٦٦ ± ۳/۵۳ n = ۲	٦/۲۵ ± ۰/۳۵ n = ۲
پاییز	۲۳۲/٤۳ ± ٤۸ n = ۱٤	۷۵/۲۵ ± ٤/٤۷ n = ۱٤	٦ ± ۰/٤۳ n = ۱٤	۱۹۵/۸۳±٦۵/۷٦ n = ٦	٦۹/۵۸ ± ۷/٤۳ n = ٦	٦ ± ۰/٤٤ n = ٦
مهر	۲٦۰ ± ۳٦/۰٦ n = ۳	۷۷/۱٦ ± ۵/۱۰ n = ۳	۵/۸۳ ± ۰/۲۸ n = ۳	–	–	–
آبان	۲۳۰/٦۳±۵۲/۵٤ n = ۸	۷٤/۷۵ ± ٤/۹۵ n = ۸	٦ ± ۰/۵۳ n = ۸	–	–	–
آذر	۲۱۰ ± ٤۵/۸۳ n = ۳	۷٤/٦٦ ± ۳/۳۲ n = ۳	٦/۱٦ ± ۰/۲۸ n = ۳	۱۹۵/۸۳±٦۵/۷٦ n = ٦	٦۹/۵۸ ± ۷/٤۳ n = ٦	٦ ± ۰/٤٤ n = ٦
زمستان	۲۳۲/۷۳±۳۳/۹٤ n = ۱۱	۷۵/۸٦ ± ٤/۸۵ n = ۱۱	۵/۱۸ ± ۰/۹۸ n = ۱۱	۱۸۱/۲۵±۵٤/۳۷ n = ٤	٦۸/۷۵ ± ٦/۹۵ n = ٤	۵/۳۷±۰/۹٤ n = ٤
دی	۱۹۰ n = ۱	۷۳/۵ n = ۱	٦ n = ۱	۱۸۱/۲۵±۵٤/۳۷ n = ٤	٦۸/۷۵ ± ٦/۹۵ n = ٤	۵/۳۷±۰/۹٤ n = ٤
بهمن	۲٤۸/۳۳ ±۳۲ /۸۱ n = ٦	۷٦/٤۱ ± ٤/۱۲ n = ٦	٤/٦٦ ± ۱/۰۸ n = ٦	–	–	–
اسفند	۲۲۰ ± ۲۷/۰۸ n = ٤	۷۵/٦۲ ± ٦/۹۰ n = ٤	۵/۷۵ ± ۰/۲۸ n = ٤	–	–	–

مقایسه آماری طول بدن در فصول بهار، پاییز و زمستان از لحاظ آماری با یکدیگر معنی دار می باشد ($P < 0.001$).

جدول ۲ ـ میانگین پارامترهای مورفومتریک مجرای تولید مثلی افعی زنجانی نر بستان آباد در فصول مختلف (Mean ± SD)

فصل/ ماه	مشخصات مجرا					
	طول کل مجرا (cm)		طول از بیضه تا کلوآک (cm)		طول پنیس (cm)	
	راست	چپ	راست	چپ	راست	چپ
بهار n = ۱۰	۲۰/۵۰ ± ۳/۱۶	۱۶/۴۵ ± ۲/۳۱	۱۶/۹۰ ± ۲/۱۹	۱۳/۶۰ ± ۱/۲۶	۲/۷۰ ± ۰/۳۵	۲/۶۰ ± ۰/۵۱
فروردین n = ۲	۲۵/۵۰ ± ۱/۴۱	۲۰/۵۰ ± ۰/۷۰	۱۹/۷۵ ± ۱/۰۶	۱۵/۵۰± ۰/۷۰	۳ ± ۰/۷۰	۲/۷۵ ± ۰/۳۵
خرداد n = ۸	۲۱/۸۷ ± ۱/۹۴	۱۷/۹۳ ± ۱/۲۹	۱۶/۱۸ ± ۱/۷۷	۱۳/۱۲ ± ۰/۸۳	۲/۶۲ ± ۰/۳۵	۲/۵۰ ± ۰/۴۶
تابستان n = ۸	۲۲/۹۳ ± ۳/۲۵	۱۹/۵۶ ± ۳/۰۸	۱۷/۱۸ ± ۲/۰۶	۱۴/۴۳ ± ۲/۳۲	۲/۱۲ ± ۰/۵۸	۲/۳۱ ± ۰/۲۵
تیر n = ۸	۲۲/۹۳ ± ۳/۲۵	۱۹/۵۶ ± ۳/۰۸	۱۷/۱۸ ± ۲/۰۶	۱۴/۴۳ ± ۲/۳۲	۲/۱۲ ± ۰/۵۸	۲/۳۱ ± ۰/۲۵
پاییز n = ۱۴	۲۲/۹۶ ± ۲/۲۶	۲۰/۲۵ ± ۲/۱۲	۱۸/۵۰ ± ۲/۰۱	۱۶/۴۶ ± ۱/۹۱	۲/۳۹ ± ۰/۴۰	۲/۳۵ ± ۰/۳۰
مهر n = ۳	۲۲/۸۳ ± ۲/۷۵	۲۰/۱۶ ± ۱/۷۵	۱۸/۶۶ ± ۲/۵۱	۱۶/۵۰ ± ۱/۵۰	۲	۲/۵
آبان n = ۸	۲۳/۳۷ ± ۲/۵۴	۲۰/۱۸ ± ۲/۶۹	۱۸/۸۱ ± ۲/۲۳	۱۶/۳۷ ± ۲/۴۱	۲/۵۰ ± ۰/۴۶	۲/۳۱ ± ۰/۳۷
آذر n = ۳	۲۲ ± ۱/۰۰	۲۰/۵۰ ± ۰/۸۶	۱۷/۵۰ ± ۰/۸۶	۱۶/۶۶ ± ۱/۰۴	۲/۵۰	۲/۳۳ ± ۰/۲۸
زمستان n = ۱۱	۲۳/۴۲ ± ۱/۶۴	۲۱/۸۳ ± ۲/۹۴	۱۷/۶۶ ± ۱/۸۱	۱۶/۴۵ ± ۲/۰۴	۲/۷۷ ± ۰/۴۱	۲/۶۳ ± ۰/۳۹
دی n = ۱	۲۴	۱۹	۱۹/۵	۱۶	۲	۲
بهمن n = ۶	۲۱/۵۳ ± ۲/۳۶	۲۱/۱۱ ± ۳/۸۵	۱۶/۹۶ ± ۱/۸۲	۱۶/۶۶ ± ۲/۵۴	۲/۷۵ ± ۰/۵۲	۲/۷۵ ± ۰/۴۱
اسفند n = ۴	۲۲/۵۰ ± ۱/۹۵	۲۰/۱۲ ± ۱/۸۸	۱۸/۲۵ ± ۱/۷۰	۱۶/۲۵ ± ۱/۷۰	۲/۷۵ ± ۰/۲۸	۲/۶۲ ± ۰/۲۵

مقایسه آماری طول مجرای وازدفران راست و چپ از بیضه تا کلوآک در فصول بهار و پاییز به ترتیب ($p < 0.0001$) و ($p = 0.0060$) و از نظر آماری با هم معنی‌دار می‌باشد و در فصل زمستان ($p = 0.0920$)، با هم معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول۳ ـ میانگین پارامترهای مورفومتریک مجرای تولیدمثلی افعی زنجانی نر طارم در فصول مختلف (Mean ± SD)

فصل/ ماه	مشخصات مجرا					
	طول کل مجرا (cm)		طول از بیضه تا کلوآک (cm)		طول پنیس (cm)	
	راست	چپ	راست	چپ	راست	چپ
بهار n = ۱۰	۲۱/۱٦ ± ۲/٦۳	۱۸/۷۷ ± ۲/۲۲	۱۷/۲۲ ± ۲/۰٦	۱۵/۷۲ ± ۱/٦۹	۲/۸۸ ± ۰/۲۲	۲/۸۳ ± ۰/٤۳
فروردین n = ۳	۲۲/۵۰ ± ۲/۵۰	۲۰ ± ۳/۱۲	۱۸/۱٦ ± ۱/۷۵	۱٦/۵۰ ± ۲/۱۷	۲/۸۳ ± ۰/۲۸	۲/۸۳ ± ۰/۵۷
اردیبهشت n = ۵	۲۱± ۲/٦۲	۱۸/٦ ± ۱/۳۸	۱۷/۱ ± ۲/۲٤	۱۵/۷ ± ۱/۳	۲/۹۰ ± ۰/۲۲	۲/۷۰ ± ۰/۲۷
خرداد n = ۲	۲۰/۷۵ ± ۰/۳۵	۱۹ ± ۰/۷۰	۱۳/۵۰ ± ۲/۱۲	۱۲/۲۵ ± ۱/۷٦	۳	۳/۲۵ ± ۰/۳۵
تابستان n = ۲	۲۲/۲۵ ± ۰/۳۵	۲۱ ± ۱/٤۱	۱٦/۵	۱٦ ± ۰/۷۰	۲/۵	۲/۵
تیر n = ۲	۲۲/۲۵ ± ۰/۳۵	۲۱ ± ۱/٤۱	۱٦/۵	۱٦ ± ۰/۷۰	۲/۵	۲/۵
پاییز n = ٦	۲۱/۰۸ ± ۲/۹۵	۱۷/۵۸ ± ۲/۳۵	۱٦/۹۱ ± ۲/۳۵	۱٤/۳۳ ± ۱/۷۵	۳ ± ۱/۳۰	۲/۲۵ ± ۰/٤۱
آذر n = ٦	۲۱/۰۸ ± ۲/۹۵	۱۷/۵۸ ± ۲/۳۵	۱٦/۹۱ ± ۲/۳۵	۱٤/۳۳ ± ۱/۷۵	۳ ± ۱/۳۰	۲/۲۵ ± ۰/٤۱
زمستان n = ٤	۲۱/۲۵ ± ۲/۲۵	۱۷/۱۲ ± ۱/٦۵	۱۷/۲۵ ± ۱/۸۹	۱٤/۱۲ ± ۰/۹٤	۲/۲۵ ± ۰/۲۸	۲/۱۲ ± ۰/۲۵
دی n = ٤	۲۱/۲۵ ± ۲/۲۵	۱۷/۱۲ ± ۱/٦۵	۱۷/۲۵ ± ۱/۸۹	۱٤/۱۲ ± ۰/۹٤	۲/۲۵ ± ۰/۲۸	۲/۱۲ ± ۰/۲۵

مقایسه آماری طول مجرای وازدفران راست و چپ از بیضه تا کلوآک در فصول بهار، پاییز و زمستان به ترتیب ($P = 0.0216$) ، ($P = 0.0090$) و($P = 0.0071$)، با یکدیگر دارای تاثیر معنی داری می باشند.

جدول ٤ ـ میانگین غلظت، درصد تحرک و بقاء اسپرم افعی زنجانی نر بستان آباد در فصول مختلف سال (Mean ± SD)

فصل – ماه	غلظت اسپرم $\times 10^6$ ml^{-1}	اسپرم‌های متحرک				اسپرم‌های غیر متحرک (D)	درصد بقاء اسپرم	
		اسپرم های متحرک (A+B+C)	متحرک (A)	متحرک (B)	متحرک (C)		زنده	مرده
بهار n = ٧	٠/٨١±٠/١٢	٦/٠٨ ± ١/٢٤	٠	٤/٧٧	١٢/٦٠± ٨/٠٧	٩٣/٩١ ±٨/٩٩	٧٠/٣٧±٢٠/٦٦	٢٩/٦٢± ٣/٦٦
فروردین n = ١	٠	٢٥	٠	٠	٢٥	٧٥	٦٦/٦٦	٣٣/٣٤
خرداد n = ٦	٠/٨١±٠/١٢	٢/٩٢ ± ٠/٥٢	٠	٤/٧٧	٦/٤٠ ± ٣/٨١	٩٧/٠٧±٣/٦٨	٧٠/٩٩±٢٢/٥٦	٢٩ ± ٢٢/٥٦
تابستان n = ٥	٦/٩ × ١٠^{٦}	٠/٠٤	٠	٠	٠/٠٤	٩٩/٩٩ ± ٠/٠١	٤١/٥٦±١٢/٤١	٥٨/٤٣ ± ١١/٤١
تیر n = ٥	٦/٩ × ١٠^{٦}	٠/٠٤	٠	٠	٠/٠٤	٩٩/٩٩ ± ٠/٠١	٤١/٥٦±١٢/٤١	٥٨/٤٣ ± ١١/٤١
پاییز n = ١٢	٠/٤٨±٠/١٠	٤٠/٢٤±١٤/١٥	١/٩٤±٠/٨٩	٧/٠١±٢/٧٧	٣٣/٦٣±١٧/٩٠	٥٩/٢١±١٤/٢٥	٥٧/٦١ ±٥/٥٥	٤٢/٣٨ ± ٥/٥٥
مهر n = ٢	٠/٥	٥٢/٧٣ ± ٨/٦١	٠/٦٧	٣/٢٧±١/٦٨	٤٩/١٢ ±٥/٤٠	٤٧/٢٦ ±٨/٦١	٦٢/١٢±١٣/١٤	٣٧/٨٧± ١٣/١٤
آبان n = ٨	٠/٤٨±٠/٣٦	٤٤/٨٧±١٨/٤٩	٢/١٢±١/٣٨	٧/٩٤±١/٧٢	٣٥/٠٥±١٧/٢٦	٥٥/١٢±١٨/٤٩	٥٧/٤٩±٣/٦١	٤٢/٥٠ ± ٣/٦١
آذر n = ٢	٠	١٢/٤٥ ± ٤/١٤	٠	٠	١٢/٤٥ ±٤/١٤	٨٧/٥٥ ±٤/١٤	٥٣/٥٩±١/٣٥	٤٦/٤٠ ± ١/٣٥
زمستان n = ٥	٠/١٢±٠/٠٣	٢٣/٥١± ٧/٠٣	٠	٥/٥٩ ١١/٠٩±	٢٣/٤٨±١٩/٧٣	٧٦/٤٩±١٧/٠٣	٧٨/٥٥±٥/٦	٢١/٤٤±١٢/٦١
دی n = ١	٠	٢٥	٠	٠	٢٥	٧٥	٦٦/٦٦	٣٣/٣٤
بهمن n = ٢	٠/١٥	١١/٣٥± ٨/١٨	٠	٢٠	٢/٧٧	٨٨/٦١±١٢/١٨	٧٦/٠٧ ±١/٥١	٢٣/٩٣ ± ١/٥١
اسفند n = ٢	٠/١	٣٤/٨٩±٢١/٣٦	٠	٢/١٩	٣٣/٧٩±٢٢/٩١	٦٥/١١±٢١/٣٦	٨٦/٩٨±١٨/٤٠	١٣/٠١ ±١٠/٤٠

مقایسه آماری غلظت اسپرم در فصل زمستان (P = 0.1257) و غیرمعنی‌دار می‌باشد و درصد اسپرم‌های متحرک و اسپرم‌های غیرمتحرک (P = 0.0254) و بقاء اسپرم (P =0.0072) به ترتیب، و با یکدیگر دارای تاثیر معنی داری می‌باشند.

جدول ۵ـ میانگین غلظت، درصد تحرک و بقاء اسپرم افعی زنجانی نر طارم در فصول مختلف (Mean ± SD)

فصل / ماه	غلظت اسپرم $\times 10^6$ ml^{-1}	اسپرم‌های متحرک				اسپرم‌های غیرمتحرک (D)	درصد بقاء اسپرم	
		اسپرم های متحرک (A+B+C)	متحرک (A)	متحرک (B)	متحرک (C)		زنده	مرده
بهار n = ٦	± ۰/۰۹ ۰/۳۰	۸/٦۰ ± ۰/۳۵	۰	٦/۷۱ ±۵/۳۸	۱۹/۰۹± ٦/٤۹	۹۱/۳۹±۱٤/۳۵	۸۰/۹٤±۱٦/۸۸	۱۹/۰۵± ۳/۸۸
فروردین n = ۳	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۸۵/۱۸±۲۵/٦٦	۱٤/۸۱±۷/٦٦
اردیبهشت n = ۳	± ۰/۱۵ ۰/۳۰	۱۷/۲۰±۱۰/۱۱	۰	٦/۷۱ ±۵/۳۸	۱۹/۰۹±٦/٤۹	۸۲/۷۹±۱۷/۱۱	۷٦/۷۰ ± ۰/٦۲	± ۰/٦۲ ۲۳/۲۹
پاییز n = ٤	± ۰/۱۰ ۰/۷۳	۲۱/٦۹ ± ۲/٦۱	۱/۳۳±۰/۱٦	۹/٦٤ ±۵/۳۵	۱٤/۷۱±۷/۱۸	۷۸/۳۰ ±۷/٦۱	۵۷/۲۲ ± ٦/۳۱	٤۲/۷۷ ±٦/۳۱
آذر n = ٤	± ۰/٤۱ ۰/۷۳	۲۱/٦۹ ± ۷/٦۱	۱/۳۳±۰/۱٦	۹/٦٤ ±۵/۳۵	۱٤/۷۱±۷/۱۸	۷۸/۳۰ ±۷/٦۱	۵۷/۲۲ ± ٦/۳۱	٤۲/۷۷ ±٦/۳۱
زمستان n = ۳	±۰/۰۸ ۰/٤٦	۸/۷۸ ± ۰/۹۲	۰/۷۸±۰/۵۷	۲/۵۸± ۱/۲۱	۵/٦۷ ± ۳/۳۳	۹۱/۲۱ ±٤/۲۳	٦٦/۸٤ ± ۹/۸۱	۳۳/۱۵ ±٦/۸۱
دی n = ۳	±۰/۳۱ ۰/٤٦	۸/۷۸ ± ٤/۲۳	۰/۷۸±۰/۵۷	۲/۵۸± ۱/۲۱	۵/٦۷ ± ۳/۳۳	۹۱/۲۱ ±٤/۲۳	٦٦/۸٤ ± ۹/۸۱	۳۳/۱۵ ±۹/۸۱

مقایسه آماری غلظت اسپرم در فصول پاییز و زمستان به ترتیب ($p = 0.3361$) و ($p= 0.1937$) و از لحاظ آماری غیر معنی دار می باشند و مقایسه درصد اسپرم های متحرک واسپرم های غیر متحرک در همین فصول به ترتیب ($p = 0.0050$) و ($p = 0.0035$) از نظر آماری با هم معنی دار می باشند و مقایسه بقاء اسپرم در فصل پاییز ($p = 0.1061$) داری سطح معنی‌دار نمی‌باشد و در فصل زمستان ($p = 0.0970$) از نظر آماری با هم معنی دار می باشد.

جدول ۸ـ میزان اسپرم های مشاهده شده در مجرای وازدفران افعی زنجانی نر در فصول مختلف

پارامتر	بهار		تابستان		پاییز			زمستان	
	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن
میزان اسپرم									

( ) کمترین غلظت اسپرم ، ( ) بیشترین غلظت اسپرم

بحث

نتایج وزن بدن مارها در این تحقیق نشان داد که حداکثر میانگین وزن بدن در نمونه‌های منطقه بستان آباد در پاییز و به اندازه ٤٨ ± ٤٣/ ٢٣٢ گرم و اوج آن در نمونه‌های منطقه طارم در همان فصل ٦٥/٧٦± ١٩٥/٨٣گرم که بدلیل آماده شدن برای خواب زمستانی و ذخیره چربی شکمی بود. وجود این ذخیره چربی از نظر تولید مثلی دارای اهمیت و باعث بقا گونه می‌شود، این موضوع تحت عنوان انتخاب طبیعی معرفی می‌شود [٣٩].

کمترین مقدار وزن بدن نمونه‌های منطقه طارم در بهار بود که این کاهش وزن بعد از خواب زمستانی در افعی‌های بچه‌زا و Crotalidae نیز رخ می‌دهد [٣٨].

در تحقیقی که توسط مشیری و همکاران صورت پذیرفت میانگین وزن مار زنجانی نر ١٩٣/٢٥ گرم بود [٢٩]، که مشابه نمونه‌های منطقه کوهستانی طارم بود.

حداکثر میانگین طول بدن از پوزه تا کلوآک در نمونه‌های بستان آباد به اندازه ٥/١٠ ± ٧٧/١٦ و طول دم ٠/٢٨± ٦/١٦ سانتی‌متر و حداکثر میانگین آن در نمونه‌های طارم به اندازه ٧/٤٣± ٦٩/٥٨ و طول دم ٠/٤٤± ٦ سانتی‌متر در پاییز بود. این در حالیست که در دیگر تحقیقات داخل کشور طول از پوزه تا کلوآک بدن افعی زنجانی ٨٢ سانتی‌متر [١٠] و ٦٥ سانتی‌متر [٨] گزارش گردیده است.

میانگین طول دم در مقایسه با دیگر تحقیقات داخل کشور شامل ٥ سانتی متر [١٠] و ٠/٤٩± ٥ [٢٩] که تفاوت چندانی را نشان نمی‌دهد.

حداکثر طول SVL در تحقیقاتی در مار *Agkistrodon pisivorus leucostoma* ٧٣/١ سانتی متر [١٥] و ٢/٨٣ ± ٤٥/٠٧ سانتی متر [٢٨]، در مار *V. Bitis scheideri* ٢٨٠ میلی‌متر [٢٤]، در *V. latastei* نر ٣٧٠ میلی‌متر [٢٥] و *vipers aspis* نر ٣٠٠ میلی‌متر [٢٦]، و در دیگر تحقیقی مار نر *vipera aspis* ١٨٨/٣ میلی‌متر [١٣] گزارش شده است.

در تحقیق حاضر میانگین حداکثر SVL بدست آمده در نمونه‌های بستان آباد در فصل پاییز و ماه مهر ٧٧/١٦ سانتی‌متر و در نمونه طارم در فصل بهار و ماه خرداد ٧٧ سانتی‌متر بود. این مطالعات نشان داد مار زنجانی، افعی-هایی متوسط‌الجثه‌ای هستند که اندازه طول پوزه تا کلوآک آنها از یک متر تجاوز نمی کند و در بیشتر این تاکسون‌ها طول جانور بالغ از یک متر کمتر است [٤٥].

مطالعات نشان می دهد اندازه طول بدن و وضعیت ذخیره چربی بدن در فرایند تولیدمثل افعی‌ها اهمیت زیادی دارد. تحقیق حاضر نشان داد که در سراسر طول سیکل تولیدمثلی جانور میانگین طول مجرای تولیدمثلی سمت راست در مار افعی زنجانی نر نسبت به میانگین طول مجرای تولیدمثلی چپ بیشتر است.

حداکثر میانگین طول مجرا راست و چپ در نمونه‌های بستان آباد به ترتیب ٢/٠١ ±١٨/٥٠ و ١/٩١ ±١٦/٤٦ سانتی متر در پاییز بود و کمترین اندازه آن در بهار به ترتیب ٢/١٩ ± ١٦/٩٠ و ١/٢٦ ± ١٣/٦٠ بود.

حداکثر میانگین طول مجرا راست و چپ در نمونه‌های طارم به ترتیب ٢/٠٦± ١٧/٢٢ و ١/٩٦ ±١٥/٧٢ در بهار بود و پایین‌ترین اندازه آن در پاییز به ترتیب ٢/٣٥ ± ١٦/٩١ و ١/٧٥ ± ١٤/٣٣ سانتی‌متر بود.

این عدم تقارن دو طرفه در طول مجرا در مار *Seminatrix pygaea* نیز گزارش شده که مجرای راست حدود ٣٠ درصد بلندتر از مجرای چپ شروع می‌شود [٣٦].

با توجه به نتایج بدست آمده وضعیت تقریبا مشابهی مشاهده می‌شود که مجرای تولیدمثلی راست بلندتر از مجرای تولیدمثلی چپ می‌باشد.

خارج ساختن مجرای تولیدمثلی در خارج از کشور کمی متفاوت‌تر از آنچه است که در تحقیق حاضر صورت پذیرفت. در مارهای نر هنگامی که مجرای چین خورده داشتند، بالغ در نظر گرفته می‌شدند که این حالت در افعی *Bothrops insularis*، مشاهده شده است [٥].

در تحقیق حاضر علاوه بر بررسی پارامترهای کمی و کیفی اسپرم از نظر غلظت، تحرک، قابلیت زنده ماندن مطالعاتی در زمینه تعداد اسپرم صورت گرفت که در

خارج از کشور در این گونه موارد بر روی مارها و افعی‌ها مطالعات زیادی صورت نگرفته است.

همچنین از تحرک اسپرم به عنوان یک پارامتر برای تعیین آزمایش زمان بقا استفاده شد که در تحقیقات دیگر در این زمینه از شمارش غلظت اسپرماتوزوآ و حرکت اسپرم به عنوان همین پارامتر استفاده گردیده است [۵].

طی تحقیقی دیگر پارامترهای تحرک اسپرم بر روی مار بوآ که یک گونه در معرض تهدید بود بررسی شد در این نمونه اسپرم‌ها تماماً حرکت رو به جلو و مستقیمی را نشان دادند که تنها ۱ درصد آنها چرخش سریع و به صورت قائم داشت [٤٠].

همچنین در مطالعه ای دیگر در مار *Elaphe guttata*، بررسی پارامترهای اسپرم شامل: ظهور، غلظت، حرکت اسپرم، زنده/مرده بودن و طول عمر اسپرم در مجرای وازدفران در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد مشخص گردید [۷].

تحقیقات بر روی مارها در خارج از کشور مشخص کرده است که هرچه سرعت اسپرم‌ها افزایش یابد طول اسپرم‌ها با بزرگ شدن قسمت میانی افزایش می یابد.

حداکثر میانگین درصد اسپرم‌های متحرک منطقه بستان آباد ١٤/١٥ ± ٤٠/٢٤ در پاییز و غیرمتحرک ٨/٩٩ ± ٩٣/٩١ در بهار بود.

حداکثر میانگین درصد اسپرم‌های متحرک منطقه طارم ٢/٦١ ± ٢١/٩٦ در پاییز و غیرمتحرک ١٤/٣٥ ± ٩١/٣٩ در بهار بود که در مار *Elaphe guttata* ، حرکت اسپرم ٩٢/٥ ٪ گزارش گردیده است [۷].

تحرک اسپرماتوزوآ که تحقیقی در خارج از کشور به گروه‌های (A، B، C، D) تقسیم‌بندی شد [۹]، درست مشابه تقسیم بندی که در تحقیق حاضر صورت پذیرفت.

در این مطالعه میانگین غلظت اسپرم در مارهای منطقه بستان آباد در طی فصول بهار، پاییز و زمستان به ترتیب $۱۰^{٦}$ × ۰/۸۱ ،$۱۰^{٦}$ × ۰/٤٨ و$۱۰^{٦}$ × ۰/۱۲ میلی‌لیتر بود که حداکثر میانگین درصد غلظت اسپرم در بهار و به اندازه ۰/۱۲ ± ۰/۸۱ در میلی‌لیتر بوده است.

در نمونه‌های منطقه طارم در همین فصول به ترتیب $۱۰^{٦}$ × ۰/۳۰، $۱۰^{٦}$ × ۰/۷۳ و $۱۰^{٦}$ × ۰/٤٦ در میلی‌لیتر بوده که بیشترین اوج آن در نمونه‌های منطقه طارم در فصل پاییز و به میزان ۰/٤۱ ± ۰/۷۳ میلی‌بود.

در مطالعه ای در خارج از کشور حجم و غلظت منی در مار *Brazilian rattlesnakes* به ترتیب دامنه ای از ۷۰ - ۳ (µl) و $۱۰^{٦}$× ۲/۳۳- ۰/۹٤ اسپرماتوزوآ/ml گزارش شده است [٤٤]. این مطالعات به داشتن پارامترهای اساسی برای سنجش و ارزیابی پتانسیل تولیدمثلی کمک خواهد کرد [۳۲].

حداکثر میانگین درصد اسپرم‌های زنده منطقه بستان آباد ٥/٦ ± ٧٨/٥٥ در زمستان و مرده ٥/٥٥ ± ٤٢/٣٨ در پاییز بود. حداکثر درصد اسپرم‌های زنده منطقه طارم ١٦/٨٨ ± ٨٠/٩٤ در بهار و مرده ٦/٣١ ± ٤٢/٧٧ در پاییز بود.

در مطالعه حاضر مدت زمان بقای اسپرم در مارهایی که اسپرم مشاهده شد ٦ ± ٢ ساعت و در میانگین دمای آزمایشگاه ٢° C ± ٢٣ بود. طی مطالعاتی که Dada و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام دادند مشخص شد که قرار گرفتن در معرض دمای بالا تأثیر منفی در عملکرد بیضه داشته و باعث از بین رفتن شکل و آسیب به تحرک اسپرم می‌شود [٦].

در تحقیق دیگر گزارش شده در مار *V.Crotalus durissus terrificus* اسپرم ها بعد از ماندن در دمای c ١٠°- زنده و دارای حرکت بودند [۷].

در مارمولک‌های نر، ساختمان ذخیره اسپرم اولیه لوله‌های اپیدیدیم است [۹].

در افعی‌ها در طی دوران زمستانخوابی هیچ رشد و تغییری در وزن بدن و اندازه پوزه تا کلوآک ایجاد نمی‌شود [۲۲،۱۸].

با توجه به یافته‌ها مورفولوژی مجرای تولیدمثلی افعی زنجانی نر شبیه مار گونه *Crotalus durissus terrificus* از منطقه معتدل جنوب شرقی برزیل می‌باشد و میزان کم تولید اسپرم در تابستان و زمستان ممکن است بدلیل مرحله‌ی پس از جفت گیری (فصل بهار و فصل پاییز)

باشد. بنابراین ممکن است ایـن افعـی‌هـا در بهـار و پـاییز آماده جفت گیری باشند.

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر از لحـاظ مطالعـات هیسـتولوژیک بـر روی مجـرای دفـران در طـی سـیکل تولیـدمثلی نشـان داد کـه بیشترین میزان اسپرم در ماه هـای مهـر، آبـان و بهمـن و کمترین میزان ان در ماه‌های فروردین، خرداد و تیـر بـوده است. میزان اسپرم در قسمت‌های مختلف مجرا از قسمت ابتدایی به انتهایی مجرا یـک رونـد ثـابتی را نشـان داد. در تابستان مقادیر اسپرم کم و تولید آن در پـاییز و ذخیـره در طول مدت خواب زمستانی و در بهار مقادیر اسـپرم بـرای جفت‌گیری بالا می‌باشد. اسپرم در مجرای تمام نمونه‌هـای بالغ مشاهده شد و ساختمان ذخیره اسپرم اولیـه وازدفـران است. در افعی‌های زنجانی نر مورد بررسی حـداکثر طـول کل بدن و وزن بدن در بهار و پاییز بود.

منابع

1- Akbarsha M.A., Tamilarasan V., Kadalmani B., Daisy P. (2005), Ultrastructural evidence for secretion from the epithelium of ampulla ductus deferentis of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana* Cuvier. *Journal of Morphology*, 266(1): 94-111.

2- Akbarsha M.A., Tamilarasan V., Kadalmani B. (2006), Light and electron microscopic observations of fabrication, release, and fate of biphasic secretion granules produced by epididymal epithelial principal cells of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana* cuvier. *Journal of Morphology*, 267(6): 713-72.

3- Aldridge R.D. (1975), Environmental control spermatogenesis in rattlesnake Crotalus ridis. Copeia 493-496.

4- Aldridge R.D., Goldberg S.R., Wisniewski S.S. (2009), the reproductive cycle and estrus in the colubrid snakes of temperate North America. Number 4.

5- Almedia-Santos S.M., Kasperoviczus K.N., Marques O.A.V (2007), Reproductive biology in an insular Golden Lancehead, *Bothrops Insularis*. 2nd Biology of the Vipers Conference, 24-27.

6- Dada R. Gupta N.P., Kucheria K. (2001), Determination of sperm morphology in men exposed to high temperature. *Journal of Anatomical Society of India*, 50(2): 107-111.

7- Fahrig B.M., Mitchell M.A., Eilts B.E., Paccamonti D.L. (2007), Characterization and cooled storage of semen from Corn snakes (Elaphe guttata). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(1): 7-12.

8- Farzanpay R. (1990), Recognition of snake. 1nd ed. Center for Academic Publication, 284 pp.

9- Fox H. (1977), The urogenital system of reptiles,pp.1-157. In C. Gans and T.S.Parsons, (Eds.), Biology of the Reptilia, Vol.6. Academic Press, New York, U.S.A.

10- Latif M. (2000), Snakes of Iran. 3nd ed. Publications of Department of the Environment, 478 pp.

11- Gist D.H., Jones J.M., (1987), Storage of sperm in the reptilian oviduct. *Scanning Microscience*, 1: 1839-1849.

12- Gist D.H., Fischer E.N. (1993), Fine structure of the sperm storage tubules in the box turtle oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97(2): 463-468.

13- Gentilli A., Zuffi M.A.L., Pupin F., Sacchi R., Bonnet X., Fasola M. (2007), Body condition index and sexual dimorphism in newborn of *Vipera aspis* .2nd Biology of the Vipers Conference

14- Glaudas X., Goldberg S.R., Hamilton B.T. (2009), Timing of reproduction of a cold desert viperid snake from North America, the Great Basin rattlesnake (Crotalus lutosus). *Journal of Arid Environments*, 73:719-725.

15- Gribbins K., Rheubert J., Collier M., Siegel D., Sever D. (2008), Histological analysis of spermatogenesis and the germ cell development strategy within the testis of the male Western Cottonmouth Snake, *Agkistrodon piscivorous*. *Annual Anatomy*, 190: 461-476.

viper (v. aspis and v. latastei) in a sympatry area: growth, reproduction and diet. 2nd Biology of the Vipers Conference.

26- Mace G.M. (1986), Genetic management of small populations. International Zoo Year Book, 24-25(1): 167-174.

27- McDiarmind R.W., Campbell J.A., Toure T. (1999), Snake species of the world:A Taxonomic and Geographic Reference, vol. 1. Herpetologists League .511 pp.

28- Mozafari S.Z., Shiravi A.H., Todehdehghan F. (2012), Evaluation of reproductive parameters of vas deferens sperms in Caucasian snake *(Gloydius halys caucasicus)*. Urmia University, 3(2): 119- 123.

29- Moshiri M, Todehdehghan F, Shiravi Ah. (2014), Study of sperm reproductive parameters in mature Zanjani viper. *Cell Journal (Yakhteh)*, 16(2): 111–116.

30- Olsson M., Schwartz T., Uller T., Healey M. (2009), Effects of sperm storage and male colour on probability of paternity in a polychromatic lizard. *Animal Behaviour*, 77: 106-424.

31- Preston B., Stevenson I.R., Pemperton J.M. and Wilson K. (2001), Dominant rams lose out by sperm depletion. *Nature*, 409: 681-682.

32- Rashidi I. Movahedin M., Tiraihi T. (2004), The effect of pentoxifylline on mouse epididymal sperm parameterse, fertilization and cleavage rates after short time pereservation. *Journal of Reproductive Medicine*, 2(2): 51-57.

33- Rezazadeh Valojerdi M. (2002), Injection if intracytoplasmic soerm. Tehran. Borsha Lt, 27-34.

34- Saint Girons H. (1982), Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. *Herpetologica*, 38: 5-16.

35- Saint Girons H. (1985), Comparative data on Lepidosaurian reproduction and some timetables. In Biology of the Reptilia (ed. C. Gans). Vol. 15, p: 35-58. Wiley, New York.

16- Hashemi M. (1992), Artificial insemination (laboratory methods and practical applications in animal breeding), published a comprehensive dictionary, second edition.

17- Han Xiangkun Z.L., Li M., Bao H., Hei N., Chen Q. (2008), Seasonal changes of sperm storage and correlative structures in male and female soft-shelled turtles, *Trionyx sinensis*. *Animal Reproduction Science*, 108: 435-445.

18- Hill J.G., Beaupre S.J. (2008), Body Size Growth, and Reproductive in a Pupiolation of Western *Cottonmouths* (*Agkistrodon piscivorus leucostoma*) in the Ozark Mountains of Northwest Arrkansas. *Copeia*, 1:105-114.

19- Joly J., Saint Girons H. (1975), Influence de la temperature sur la vitess de matogenese, la duree de l'activite spermatogenetique et l'evolutrion des caracteres secondaires du lezard des murailles, Lacerta muralis L. (Reptilia, Lacertidae). *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 64: 317-336.

20- Jones S.M., Wapstra E., Swain R. (1997), Asynchronous male and female gonadal cycles and plasma steroid concentrations in a viviparous lizard, Niveoscincus ocellatus (Scincidae), from Tasmania. *General and Comparative Endocrinology*, 108: 271-281.

21- Kelly C.D., Jennions M.D. (2011), Sexual selection and sperm quantity: metaanalyses of strategic ejaculation. *Biological Reviews*, 286 (4): 863-884.

22- Lourdais O., Bonnet X., shine R., Denardo D., Naulleau G., Guillon M. (2002), Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment: a longitudinal study of a viviparous snake. *Journal of Animal Ecology*, 71: 470-479.

23- Maximiliano T. (2011), Sperm parameters Associated with Reproductive ecology in two snake spesies, Herpetologica. 67(1):58-70.

24- Martiz B, Alexander GJ. (2010), Spatial ecology and activity patterns of the world's smallest viperid. 3rd Biology of the Vipers Conference Calci, Pisa, Italy.

25- Martinez-Freiria F, Brito JC, Lizana M. (2007), Ecological traits of two Mediterrranean

36- Sever D.M., Hopkins W.A. (2004), Oviductal sperm storage in the ground skink Scincella laterale Holbrook (Reptilia: Scincidae). *Journal of Experimental Zoology*, 301: 599-611.

37- Selma M. (2004), Sperm strage in males of the snake crotalus durissus terrificus (Crotalinae: Viperidae) in southeastern brazil. *Comparative Biochemistry and Phishology*, 139: 169-174.

38- Takfalah M. (2012), study of the reproductive duct of the female before the hibernation in *Vipera albicornuta.* Presented for the MSc, Payame Nour University, Department of Biology.

39- Torki F. (2007), Ophisops elegans spermatogenesis and the introduction of a monster like the central Zagros. MSc Thesis, Razi University, Kermanshah, Iran.

40- Tourmente M. Cardozo G.A., Guidobaldi H.A., Giojalas L.C., Bertona M., Chiaraviglio M. (2007), Sperm motility parameters to evaluate the seminal quality of Boa constrictor occidentalis, a threatened snake species. *Research in Veterinary Science*, 82: 93-98.

41- Tourmente M., Gomendio M., Roldan E.R.S., Giojalas L.C., Chiaraviglio M. (2008), SPERM competition and reproductive mode influence sperm dimension and stacture among snakes. The Society for the Study of Evolution, 10-63: 2513-2524.

42- Vieira G.H.C., Colli G.R., Ba´o S.N., (2004), The ultrastructure of the spermatozoon of the lizard Iguana iguana (Reptilia, Squamata, Iguanidae) and the variability of sperm morphology among iguanian lizards. *Journal of Anatomy*, 204: 451-464.

43- World Health Organigation (1992), WHO Laboratory Manual for the Examinaton of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 3rd ed. Cambarige, United Kingdom: Cambrige University Press.1-128.

44- Zacariotti R.L., Grego K.F., Fernandes W., Sant' Anna S.S. (2007), Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian Rattlesnakes (Crotalus durissus terrificus). *Zoo Biology*, 26: 155-160.

45- Zuge G.R., Vitt L.J., Caldwell J.P. (2001), Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles. Academic Press.