



## A comparative histological study of the reproductive structure of dominant Bivalvia species in Karkheh River in a year

Maryam Shohani<sup>1</sup>, Solmaz Shirali<sup>1</sup>\*, Babak DoustShenas<sup>1</sup>

1. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

### Article Info

**Article type:** Research

Article history:

Received: 12 October 2023

Accepted: 10 February 2024

ePublished: 26 May 2024

\* Corresponding Author:

Solmazshirali\_awz@yahoo.com

**Keywords:**

Gametogenesis,

Bivalvia,

*Unio tigridis*,

*Pseudodopsis euphratica*.

### ABSTRACT

Despite the economic and environmental importance of freshwater mussels, there is limited information available regarding their biology. Considering the significance of bivalve gonads as vital reproductive organs, this study aimed to identify and investigate the histological structure of reproductive organs of dominant bivalve species throughout one year, from April 2021 to February 2022, in the Karkeh River. For this purpose, bivalves were seasonally collected, identified, and then dissected. Subsequently, the gonads underwent histomorphometric examination following tissue processing stages. The results indicated that *Unio tigridis* and *Pseudodopsis euphratica* were the predominant species in the Karkeh River, both belonging to the Unionidae family. The ovaries in both species exhibited asynchronous development. The reproductive cycle throughout the year comprised three stages: undeveloped, developing, and mature. Considering gonadal maturity in spring and spawning in summer, it appears that the primary gonadal activity of both species in the Karkeh River in the study area occurs in spring, while peak reproductive activity takes place in summer.



Publisher: University of Hormozgan.



## مطالعه بافت شناسی مقایسه‌ای ساختار تولید مثلی گونه‌های غالب دو کفه‌ای در رودخانه کرخه در طی یک سال

مریم شوهانی<sup>۱</sup>، سلماز شیرعلی<sup>۱\*</sup>، بابک دوست شناس<sup>۱</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

### اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

\* نویسنده مسئول:

Solmazshirali\_awz@yahoo.com

کلیدواژه‌ها:

گامتوزنز،

صدف دو کفه‌ای،

*Unio tigridis*

*Pseudodopsis euphratica*

### چکیده

با وجود تنوع، اهمیت اقتصادی و زیست‌محیطی صدف‌های آب شیرین، اطلاعات کمی در مورد زیست‌شناسی آنها وجود دارد. با توجه به اهمیت نرم‌تنان دوکفه‌ای و با در نظر گرفتن اهمیت گنادها به عنوان اعضای مهم در تولیدمثل و بقاء موجود این مطالعه با هدف شناسایی و بررسی بافت شناسی ساختار تولیدمثلی گونه‌های غالب دوکفه‌ای طی یک سال از اردیبهشت ۱۴۰۰ تا بهمن ۱۴۰۰ در رودخانه کرخه انجام گرفت. به این منظور دو کفه‌ای‌ها به صورت فصلی صید شده و ابتدا مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس تشریح شده و گنادها پس از طی مراحل پاساژ بافتی مورد بررسی هیستومورفومتریک قرار گرفتند. نتایج نشان داد صدف‌های دو کفه‌ای *Unio tigridis* و *Pseudodopsis euphratica* گونه‌های غالب رودخانه کرخه بودند که هر دو از خانواده یونیونیده می‌باشند. تخمدان در هر دو گونه از نوع ناهمزمان بود. چرخه تولیدمثلی در طی یک سال شامل سه مرحله توسعه نیافته، در حال توسعه و بالغ بود. با توجه به مشاهده بلوغ گنادی در بهار و تخم‌ریزی در تابستان، به نظر می‌رسد زمان اصلی رسیدگی گنادی هر دو گونه در رودخانه کرخه در منطقه مورد مطالعه در بهار و زمان اصلی تولیدمثل در تابستان باشد.



## مقدمه

نرم تنان دومین شاخه بزرگ جانوری از نظر تنوع گونه در جهان می باشند (Gray., 2014). یکی از رده های نرم تنان دوکفه ای ها می باشند که به آن ها تیغه آبششیان و یا تبر پایان نیز گفته می شود که از نظر تعداد گونه مقام دوم را بعد از شکم پایان دارند. بیشتر آن ها در آب های شور ساکن هستند و یک پنجم از تمام انواع آن ها در آب شیرین زندگی می کنند (Gosling, 2003; Waller, 2006). این آبزیان به دلیل پراکنش گسترده، فراوانی مناسب، تحرک بسیار کم، مقاومت نسبت به تغییرات و آلودگی های محیطی، تجمع زیستی بالا در مورد بسیاری از آلاینده ها، فعالیت پایین آنزیم های سوخت و ساز، طول عمر طولانی و اندازه مناسب، پایشگران زیستی بسیار مناسبی برای اکوسیستم های آبی محسوب می شوند (Zhou et al., 2008).

خانواده یونیونیده (Unionidae) تنها صدف های آب شیرین هستند که در معرض خطر انقراض در جهان قرار دارند. کاهش آنها نتیجه تغییرات فزاینده انسانی مانند انتقال و برداشت آب، کانال سازی رودخانه ها، لایروبی، آلودگی و غیره در زیستگاه های آب شیرین می باشد (Lopez-Lima et al., 2018). *Pseudodopsis euphratica* و *Unio tigridis* دو گونه از صدف های دوکفه ای آب شیرین از خانواده یونیونیده هستند (Lopez-Lima et al., 2021). مطالعات متعددی نشان داده است که وضعیت تولیدمثل در نرم تنان یک فرآیند چرخه ای است و ممکن است فرایندهای سالانه، شش ماهه یا مداوم باشد (Drummona et al., 2006; Sereflisan et al., 2013).

ویژگی ها و روش های تولیدمثل گونه های یونیونیده نیز متنوع و پیچیده هستند (Haag and Staton., 2003). Sereflisan و همکاران (2013) با مطالعه خود بر صدف دو کفه ای گونه *P. littoralis* (صدف دو کفه ای از خانواده یونیونیده) گزارش کردند که اووژنز در ۳ ماه زمستان شدید می باشد و در بهار (در ماه می) تخمدان ها به بیشترین رشد خود می رسند. Hliwa و همکاران (2015) در مطالعه خود بر تخمدان *S. woodiana* (صدف دو کفه ای از خانواده یونیونیده) گزارش کردند که تخمدان از نوع ناهمزمان می باشد و اووژنز طی پنج مرحله در فولیکول های تخمدانی انجام می شود. همچنین در مطالعه خود بر بیضه *S. woodiana* در ماه های دوم و سوم بهار، وجود تعداد فراوان اسپرم های بالغ (اسپرماتوزواها) را گزارش کردند. از سوی دیگر در مورد زمان اصلی تولیدمثل در دوکفه ای های مختلف و در مناطق مختلف نتایج متفاوتی گزارش شده است. Lima و همکاران (2012) زمان تخم ریزی در صدف دوکفه ای *Anodonta squalida* را در تالاب میرا در پرتغال در ماه های تابستان و Dagnino و همکاران (2017) در بررسی تولیدمثل صدف دوکفه ای *Megapitaria squalida* در خلیج جنوب شرق کالیفرنیا مهمترین دوره تخم ریزی را از ماه های اکتبر تا نوامبر گزارش کرده اند. در بیشتر مطالعات بر دوکفه ای های آب شیرین و دوکفه ای های دریایی، چرخه تولیدمثل به سه تا هفت مرحله تقسیم شده است (Labecka and Domagala., 2018).

زیست شناسی تولیدمثل و اکولوژی صدف های جوان و بالغ عوامل کلیدی هستند که توانایی بقای صدف های آب شیرین را تعیین می کنند. با وجود تنوع و ارزش اقتصادی و زیست محیطی صدف های آب شیرین، اطلاعات کمی در مورد زیست شناسی آنها به ویژه برای گونه های خارج از اروپا و آمریکای شمالی وجود دارد (Cao et al., 2018). از سوی دیگر، کاهش در منابع آبی در بسیاری از بخش های جهان بر اهمیت مدیریت منابع آبی تاکید می کند (Masaeli et al., 2021) به این جهت با توجه به اهمیت خوراکی، اقتصادی و زیست محیطی نرم تنان دوکفه ای و با در نظر گرفتن اهمیت گنادها به عنوان اعضای مهم در تولیدمثل و بقاء موجود این مطالعه با هدف شناسایی و بررسی بافت شناسی ساختار تولیدمثل گونه های غالب دوکفه ای در طی یک سال در رودخانه کرخه انجام گرفت.

## مواد و روش ها

حوضه آبریز رودخانه کرخه زیر مجموعه حوضه آبریز خلیج فارس و دریای عمان است. نمونه برداری در پژوهش حاضر از حوضه آبریز رودخانه کرخه در محدوده شهرستان حمیدیه انجام گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. نقشه منطقه مورد مطالعه

در مجموع ۶۹ نمونه صدف به صورت تصادفی توسط صیاد از بستر رودخانه جمع‌آوری شدند. نمونه برداری به صورت فصلی (بهار، تابستان، پاییز و زمستان) از اردیبهشت ۱۴۰۰ تا بهمن ۱۴۰۰ انجام شد و از هر نمونه حداقل ۸ صدف جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در ظروف حاوی آب رودخانه به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس بیومتری شده و بر اساس خصوصیات ظاهری و همچنین صفات زیست‌شناسی با استفاده از کتب و کلیدهای شناسایی معتبر مانند (Brusca and Brusca, 2003)، (Graf and Cummings, 2021) و (Lopes-lima et al., 2021) مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس صدف‌ها از وسط باز شده و به وسیله تیغه اسکالپل، قسمت گنادی از قسمت احشایی جدا گردیده و در ظروف حاوی فرمالین ۱۰٪ به مدت ۱۰ روز قرار داده شدند. سپس برش‌های کوچکی از بافت گنادها تهیه شده و پس از شستشو به مدت یک شب، جهت انجام پاساژ بافتی به دستگاه اتوماتیک هیستوکینت مدل RX-11B (ساخت ژاپن) منتقل شدند.

پس از اتمام مراحل پاساژ بافتی، از قالب‌های لوکهارت و پارافین جهت قالب‌گیری نمونه‌ها استفاده شد. پس از سرد شدن قالب‌ها و زدودن پارافین اضافه اطراف نمونه‌ها، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون توسط دستگاه میکروتوم LEICA مدل RM2245 (ساخت آلمان) از آنها تهیه و مورد رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین قرار گرفتند (Bancroft and Gamble, 2002). جهت بررسی ساختار هیستولوژیک و هیستومتریک نمونه‌ها از میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS مجهز به لنز Dino Lite و نرم افزار Dino Capture 2 استفاده شد. جهت بررسی درصد فولیکول‌های پیش زرده سازی و زرده سازی، تعداد این فولیکول‌ها در هر نمونه در ۵ اسلاید و در هر اسلاید در ۵ میدان دید میکروسکوپی شمارش شدند. نوع و قطر فولیکول‌ها در هر مرحله مشخص و اندازه‌گیری شد و مراحل مختلف تخمدان تعیین شد. مراحل مختلف بیضه نیز بر اساس نوع سلول‌های جنسی نر تعیین شد.

جهت بررسی آماری، ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت تا از نرمال بودن داده‌ها اطمینان حاصل شود. به منظور مقایسه پارامترهای اندازه‌گیری شده از آنالیز واریانس یک طرفه در سطح خطای ۰/۰۵ استفاده گردید. همچنین از آزمون تعقیبی LSD جهت بررسی معنی دار بودن تفاوت متغیرها استفاده گردید. نتایج به صورت خطای معیار  $\pm$  میانگین گزارش گردید. آنالیزها با نرم افزار SPSS 22 انجام شد.

مطالعات ریخت شناسی، وجود دو گونه صدف با نام‌های علمی *Unio tigridis* و *Pseudodopsis euphratica* را در منطقه مورد مطالعه نشان داد که هر دو از خانواده یونیونیده می باشند. همچنین نشان داده شد که گونه *Unio. tigridis* در طول چهار فصل گونه غالب منطقه بود (شکل ۲).



شکل ۲. A: صدف دو کفه ای گونه *Unio tigridis*، B: صدف دو کفه ای گونه *Pseudodopsis euphratica*

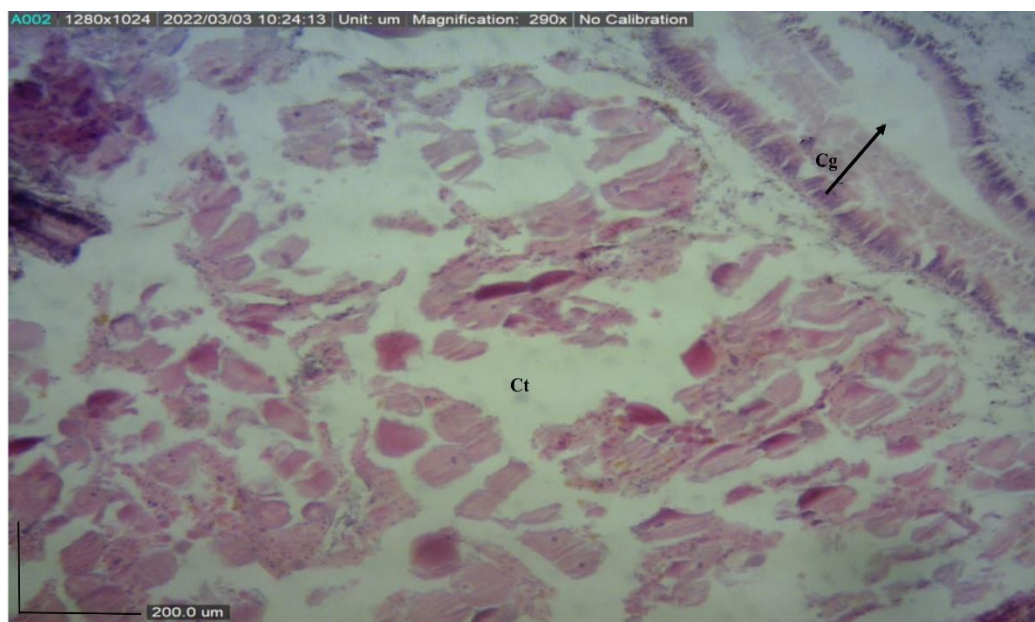
نتایج بررسی آماری میانگین وزن، طول و عرض صدف‌های دو کفه‌ای گونه *U. tigridis* نشان داد که وزن صدف‌ها در تابستان به طور معنی داری بالاتر بود، اما بین وزن صدف‌ها در تابستان نسبت به پاییز و زمستان اختلاف معنی داری وجود نداشت. بین طول و عرض صدف‌ها در چهار فصل اختلاف معنی داری وجود نداشت (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین  $\pm$  انحراف معیار وزن، طول و عرض صدف‌های دو کفه‌ای گونه *U. tigridis* در چهار فصل

فصل	وزن نمونه (گرم)	طول نمونه (میلی متر)	عرض نمونه (میلی متر)
بهار	$16/87 \pm 1/92a$	$49/25 \pm 1/70a$	$29/45 \pm 0/81a$
تابستان	$31/15 \pm 5/65b$	$61/00 \pm 4/16a$	$29/75 \pm 2/21a$
پاییز	$25/16 \pm 13/96b$	$55/58 \pm 16/49a$	$27/57 \pm 4/87a$
زمستان	$22/19 \pm 10/64b$	$54/00 \pm 10/16a$	$26/16 \pm 4/13a$

حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشند.

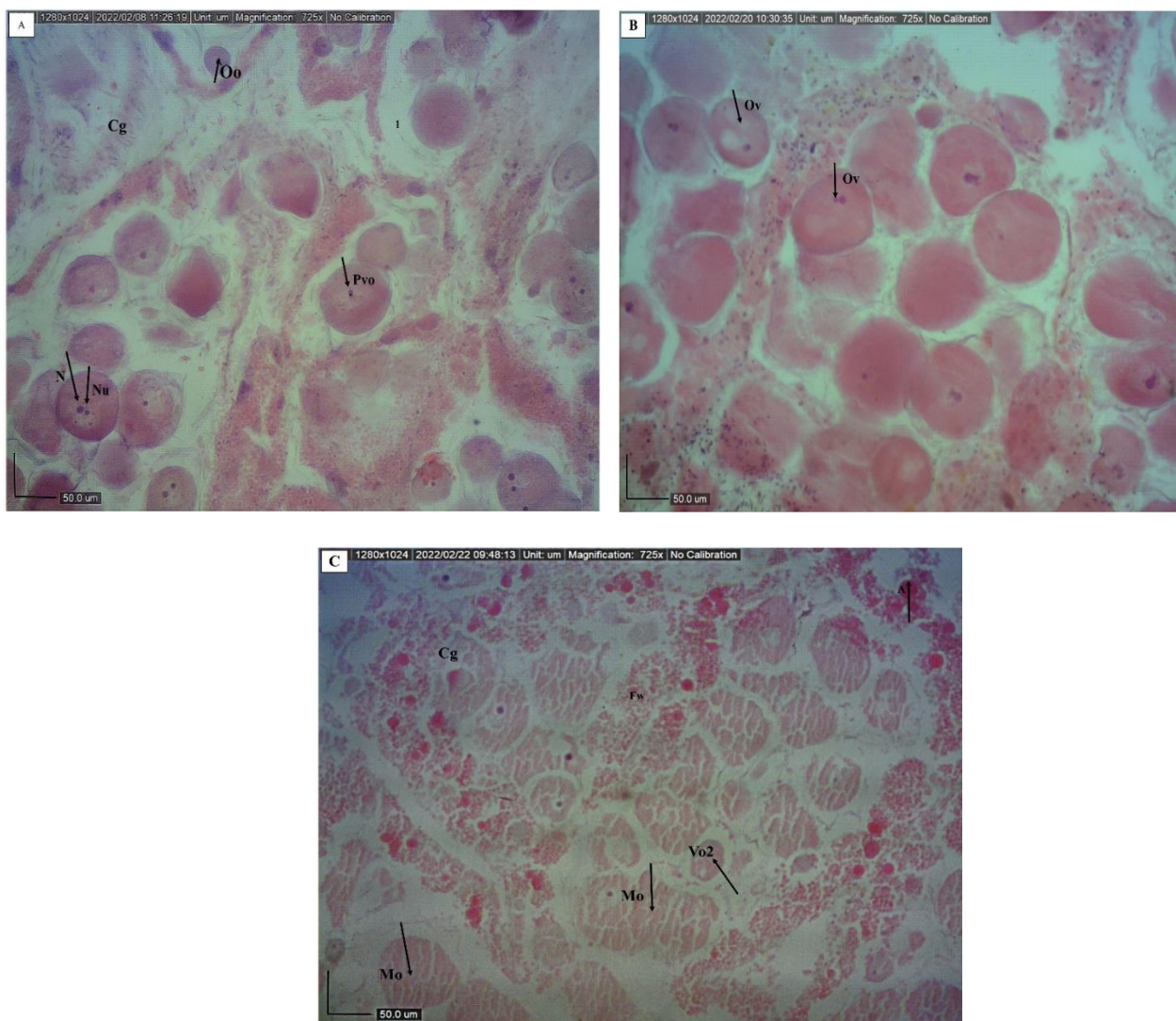
در مطالعه حاضر در مجموع ۶۹ صدف مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۳۵ عدد صدف گونه *U. tigridis* مورد بررسی قرار گرفت که همگی جدا جنس بودند (۱۵ عدد ماده و ۲۰ عدد نر). گامت‌های نر و ماده به طور جداگانه در فولیکول‌هایی (لوب‌ها) به طور جداگانه در تخمدان و بیضه سازمان دهی شده بودند. همچنین مجرای غدد جنسی مژه دار با بافت استوانه ای مژه دار نیز دیده شد که گامت‌ها از طریق این مجرا آزاد می‌شوند (شکل ۳).



شکل ۳. بافت تخمدان در گونه *U. tigridis*. Ct: بافت همبند بین تخمک‌ها، Cg: مجرای غدد جنسی مژه دار (H&E×290)

اووژنز در هر ۴ فصل روند پیوسته‌ای داشت و در ۴ مرحله اووگونی، تخمک‌های پیش زرده سازی، تخمک‌های زرده سازی و تخمک‌های بالغ قابل مشاهده بود. اووگونی‌ها با ظاهری کروی و کوچک در حاشیه داخلی دیواره فولیکول در طول چرخه تولیدمثلی مشاهده شدند اما در فصل تابستان سلول جنسی غالب بودند. سیتوپلاسم آن‌ها به شدت بازوفیلی بود و یک هسته بازوفیلی نیز در مرکز وجود داشت. میانگین قطر آن‌ها  $9/40 \pm 5/37$  میکرون اندازه‌گیری شد. تخمک‌های پیش زرده سازی از نظر اندازه بزرگ‌تر از اووگونی‌ها بودند، از میزان بازوفیلی بودن سیتوپلاسم کاسته شده بود و در حاشیه داخلی دیواره فولیکولی قرار داشتند. دارای یک هسته مشخص در مرکز تخمک و تعدادی هستک در اطراف هسته بودند. میانگین قطر آن‌ها  $34/44 \pm 6/55$  میکرون اندازه‌گیری شد. این نوع تخمک بیشتر در فصل تابستان مشاهده شد و تخمدان در این فصل در مرحله توسعه نیافته قرار داشت.

تخمک زرده سازی (واجد دانه‌های زرده) شامل دو گروه تخمک زرده ساز و تخمک بالغ بود. تخمک زرده ساز در مرکز لومینال فولیکول قرار داشت. هسته آن واجد هستک‌های زیادی بود و به دلیل داشتن مقدار زیاد زرده اندازه آن افزایش یافته بود. از میزان بازوفیلی سیتوپلاسم کاسته شده بود. این مرحله بیشتر در پاییز و زمستان قابل مشاهده بود و تخمدان در این فصول در مرحله در حال توسعه قرار داشت. در تخمک بالغ هسته‌ها نسبت به مرحله قبل کوچک‌تر بودند یا غشای هسته متلاشی شده بود. هستک‌ها قابل تشخیص نبودند. این تخمک‌ها در مرکز فولیکول‌های تخمدانی مشاهده می‌شدند و بافت همبند نازکی بین آنها وجود داشت. این مرحله بیشتر در فصل بهار قابل مشاهده بود و تخمدان در این فصل در مرحله توسعه یافته قرار داشت. در مجموع میانگین قطر فولیکول‌های زرده سازی  $165/35 \pm 82/67$  میکرون اندازه‌گیری شد (شکل ۴).



شکل ۴. A: تخمدان صدف دوکفه‌ای گونه *U. tigridis* در تابستان (توسعه نیافته)، B: تخمدان در پاییز و زمستان (در حال توسعه)، C: تخمدان در بهار (توسعه یافته). Oo: اووگونی، Pvo: فولیکول پیش زرده سازی، Vo: فولیکول زرده سازی، Mo: فولیکول بالغ، Fw: دیواره فولیکولی، Cg: مجرای غدد جنسی مژه دار (H&E×725)

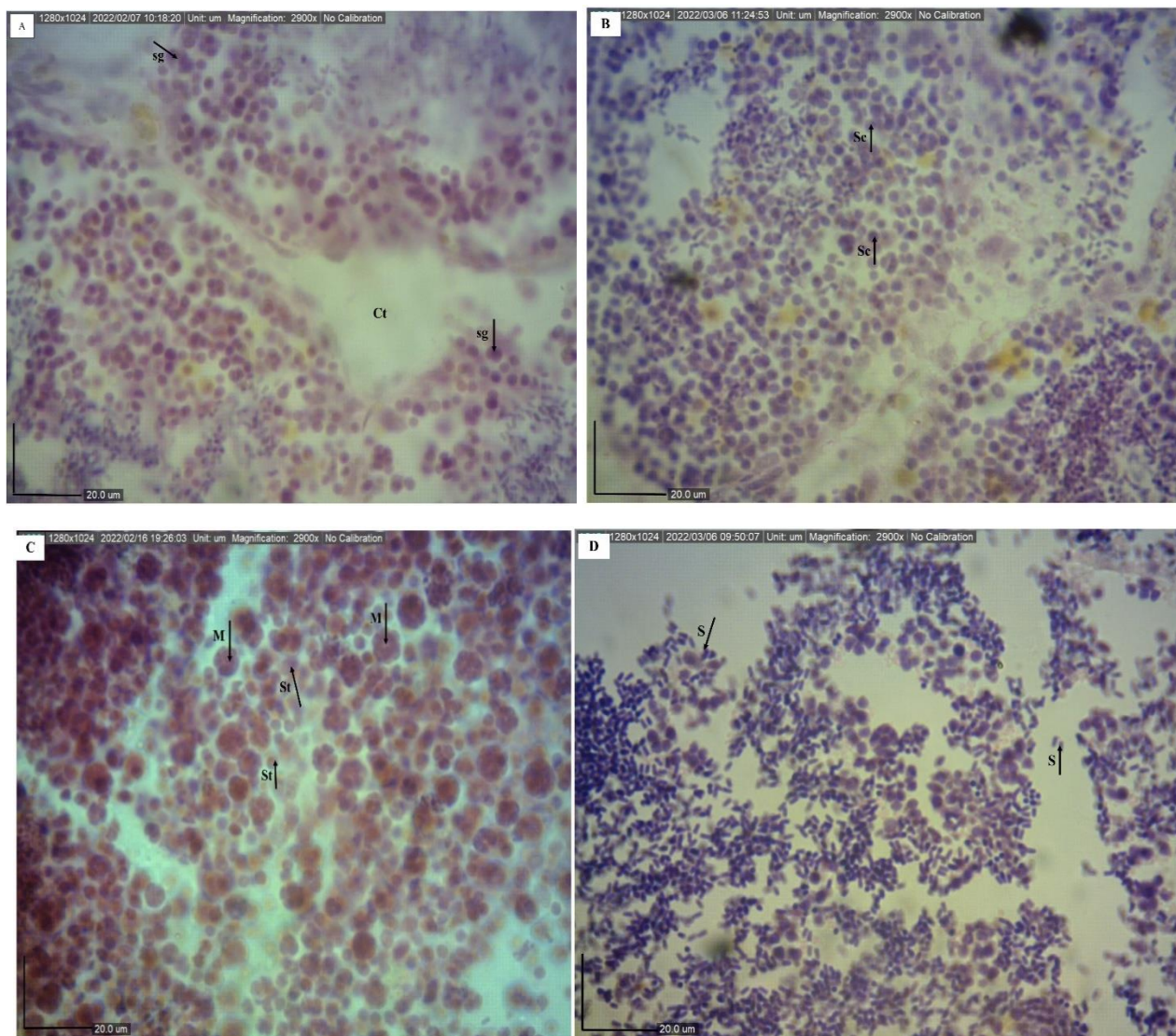
نتایج مطالعات بافت شناسی بیضه در صدف دوکفه‌ای *U. tigridis* نشان داد که اسپرماتوژنز نیز مانند اووژنز روند پیوسته‌ای داشت:

اسپرماتوگونی‌ها: در طول چرخه تولید مثل در فولیکول‌های نر وجود داشتند و از دیواره فولیکولی رشد می‌کردند. بیضی شکل بودند و بزرگ‌ترین سلول‌ها در دیواره فولیکولی بودند. سیتوپلاسم نسبتاً کم و بازوفیلی داشتند. این سلول‌ها به تعداد فراوان در فصل تابستان مشاهده شدند.

اسپرماتوسیت‌ها: سلول‌های کروی با سیتوپلاسم بازوفیلی بودند. غشای هسته‌ای قابل مشاهده‌ای نداشتند و هسته به وضوح تشخیص داده نمی‌شد و بر اساس محل قرارگیری در فولیکول‌ها به دو نوع اسپرماتوسیت اولیه (خارجی تر) و اسپرماتوسیت ثانویه (داخلی تر و به سمت مرکز) تقسیم شدند. این مرحله نیز در فصل تابستان مشاهده می‌شد.

اسپرماتیدها: با رنگ بازوفیلی در مرکز لومینال فولیکول بیضه توزیع شده بودند، در این ناحیه مورولاها که نتیجه قرار گرفتن چند اسپرماتید در کنار یکدیگر بودند مشاهده می‌شدند. این مرحله در فصل پاییز دیده می‌شد.

اسپرمتوزوآها: کوچکترین سلول‌های جنسی نر و با رنگ بازوفیلی بودند که در فضای مرکزی لومن فولیکول‌های بیضه مشاهده می‌شدند. این مرحله بیشتر در زمستان و بهار مشاهده شد و اسپرمتوزنز در این فصل شدیدتر بود (شکل ۵).



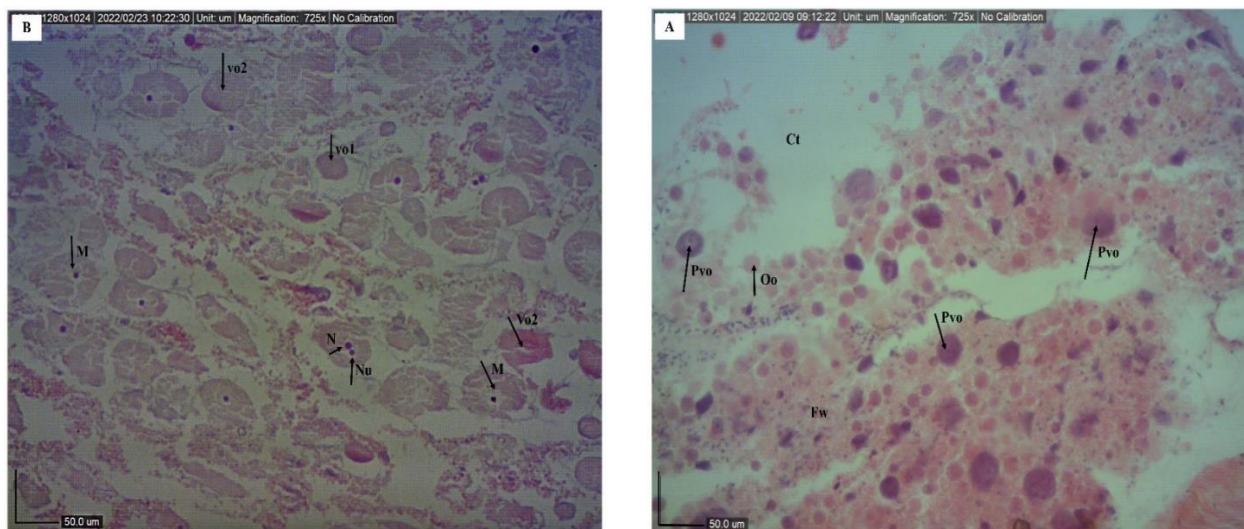
شکل ۵. A و B: گناد نر صدف دوکفه‌ای گونه *U. tigridis* در تابستان، C: گناد نر در فصل پاییز واجد تعداد زیادی مورولای اسپرم، D: گناد نر در بهار واجد تعداد فراوان اسپرمتوزوآ. Sg: اسپرمتوگونی، Sc: اسپرمتاید، M: مورولای اسپرم، S: اسپرمتوزوآ، Ct: بافت همبند (H&E×2900)

نتایج بررسی میانگین شاخص بیومتری صدف‌های دوکفه‌ای گونه *P. euphratica* برحسب گرم و میانگین طول و عرض آن‌ها بر حسب میلی‌متر نشان داد که که بیشترین وزن صدف در تابستان مشاهده شد که به طور معنی داری نسبت به بهار و زمستان بالاتر بود، اما بین وزن صدف‌ها در تابستان نسبت به پاییز اختلاف معنی داری وجود ندارد. طول و عرض صدف‌ها در بهار به طور معنی داری نسبت به تابستان، پاییز و زمستان کمتر بود (جدول ۲).

جدول ۲. میانگین  $\pm$  انحراف معیار وزن، طول و عرض صدف‌های دوکفه‌ای گونه *P. euphratica* در چهار فصل (حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشند)

فصل	وزن نمونه (گرم)	طول نمونه (میلی متر)	عرض نمونه (میلی متر)
بهار	۴۰/۳۳ $\pm$ ۲۵/۸۶a	۸۶/۵۰ $\pm$ ۱۷/۵۴	۴۴/۳۸ $\pm$ ۱۲/۳۳a
تابستان	۸۷/۶۳ $\pm$ ۱۸/۰۴b	۸۷/۰۰ $\pm$ ۷/۹۲b	۵۸/۶۶ $\pm$ ۳/۲۱b
پاییز	۸۵/۱۶ $\pm$ ۱۵/۶۱b	۸۷/۲۲ $\pm$ ۷/۰۱b	۵۸/۶۶ $\pm$ ۳/۵۷b
زمستان	۶۹/۰۵ $\pm$ ۳۱/۱۷c	۸۰/۰۰ $\pm$ ۱۷/۲۲b	۵۲/۰۰ $\pm$ ۱۵/۳۶b

در این مطالعه در مجموع تعداد ۳۴ صدف گونه *P. euphratica* در چهار فصل جمع آوری شد که همگی جدا جنس بودند (۱۲ ماده و ۲۲ نر) و گامت‌های نر و ماده در هر جنس به طور جداگانه در فولیکول‌ها سازمان‌دهی شده بودند. اووژنز روند پیوسته‌ای داشت و در ۴ مرحله اووگونی، تخمک‌های پیش زرده سازی، تخمک‌های زرده سازی و تخمک‌های بالغ قابل مشاهده بود. اووگونی‌ها در تخمدان در طول چرخه تولیدمثلی وجود داشتند. کروی، کوچک و بازوفیلی بودند و در حاشیه داخلی و بر روی دیواره فولیکولی تخمدانی قرار داشتند، میانگین قطر آن‌ها  $۱۱/۴۲ \pm ۴/۳۲$  اندازه گیری شد. این سلول‌ها بیشتر در فصل تابستان و پاییز مشاهده شدند و تخمدان در این فصل در مرحله توسعه نیافته قرار داشت. تخمک‌های پیش زرده سازی از نظر اندازه بزرگ‌تر از اووگونی‌ها بودند، از میزان بازوفیلی بودن آن‌ها کاسته شده بود. هسته آن‌ها بازوفیلی بود و واجد تعدادی هستک بود. این سلول‌ها نیز بر روی دیواره فولیکولی قرار داشتند. میانگین قطر آن‌ها  $۳۷/۲۵ \pm ۹/۷۱$  اندازه گیری شد. این مرحله نیز بیشتر در فصل تابستان و پاییز مشاهده شد و تخمدان در این فصل در حال توسعه قرار داشت. تخمک زرده سازی (واجد دانه های زرده) شامل دو گروه تخمک زرده ساز و تخمک بالغ بود. تخمک زرده ساز از نظر اندازه از تخمک پیش زرده سازی بزرگ‌تر و در مرکز لومن فولیکول قرار داشت. هسته از هستک‌های زیادی تشکیل شده و اندازه سیتوپلاسم به خاطر داشتن مقدار زیاد زرده افزایش یافته بود. هسته بازوفیلی و سیتوپلاسم اسیدوفیلی بود. این مرحله در فصل زمستان و بهار مشاهده شد و تخمدان در این فصول در مرحله در حال توسعه قرار داشت. در تخمک بالغ سیتوپلاسم اسیدوفیلی و غشای هسته‌ای متلاشی شده بود. هستک‌ها قابل تشخیص نبودند. اندازه هسته کوچک‌تر از مرحله قبل ولی اندازه و قطر تخمک‌های بالغ از دو مرحله قبل بیشتر بود. این تخمک‌ها در مرکز لومن قرار داشتند. میانگین قطر آن‌ها  $۷۲/۸۴ \pm ۴/۰۴$  اندازه گیری شد و بیشتر در فصل زمستان و بهار مشاهده شدند. تخمدان در این فصل در مرحله توسعه یافته قرار داشت (شکل ۶).



شکل ۶. A: تخمدان صدف دوکفه‌ای گونه *P. euphratica* در تابستان و پاییز (توسعه نیافته)، B: تخمدان در بهار و زمستان (توسعه یافته). Oo: اووگونی، Pvo: فولیکول پیش زرده سازی، Vo: فولیکول زرده سازی، Mo: فولیکول بالغ، Fw: دیواره فولیکولی، Ct: بافت همبند، N: هسته، Nu: هستک (H&E×725)

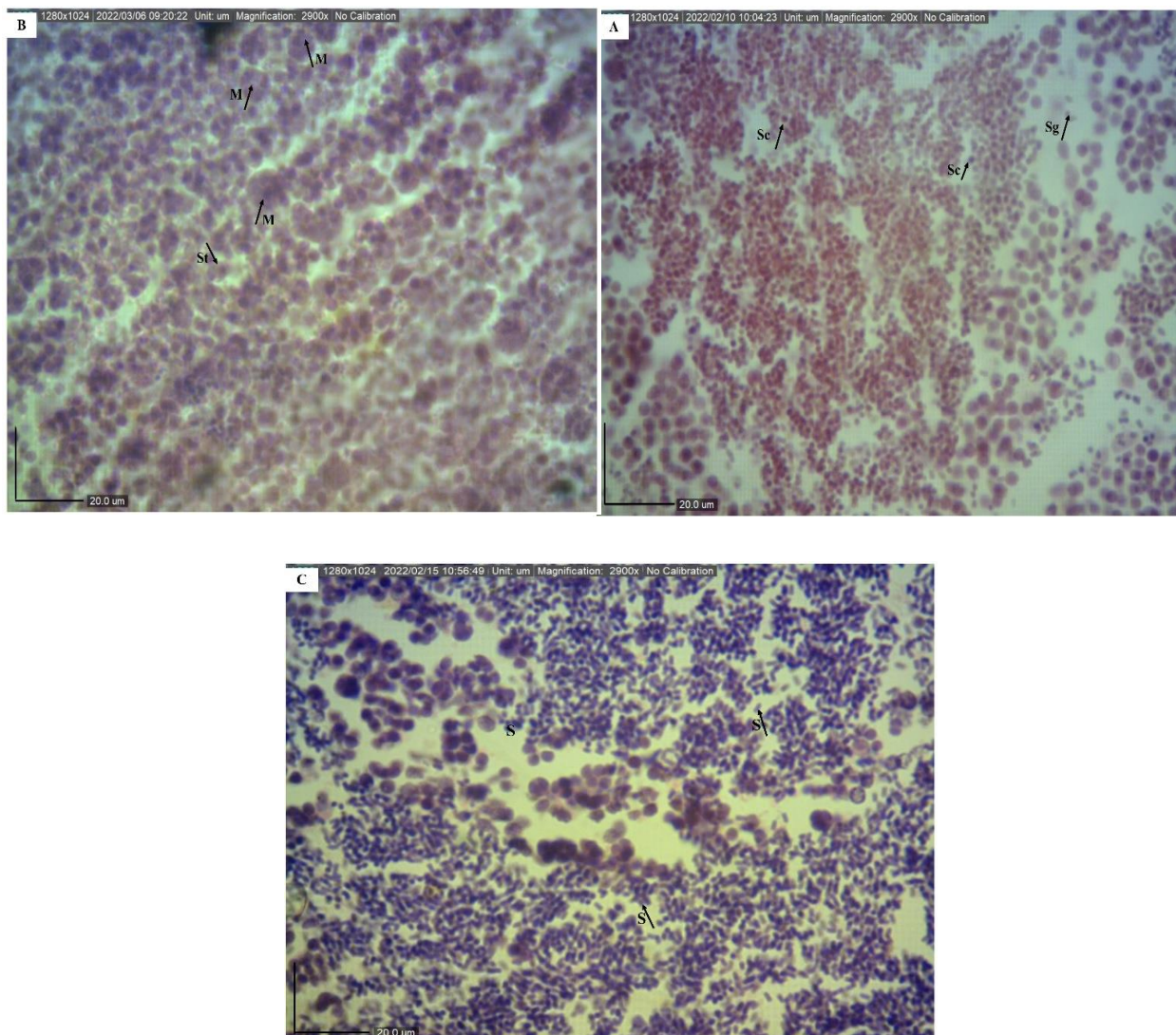
نتایج مطالعات بافت‌شناسی بیضه در صدف دوکفه‌ای *P. euphratica* نشان داد که اسپرماتوژنز نیز مانند اووژنز روند پیوسته‌ای داشت:

اسپرماتوگونی: در طول چرخه تولیدمثل در فولیکول‌های نر وجود داشتند. از دیواره فولیکولی بیضه رشد می‌کردند. بیضی شکل بودند. بزرگ‌ترین سلول‌ها در فولیکول‌های بیضه بودند. سیتوپلاسم نسبتاً کم و بازوفیلی داشتند و بیشتر در فصل تابستان و پاییز مشاهده شدند.

اسپرماتوسیت‌ها: کروی و کوچکتر از اسپرماتوگونی‌ها بودند، سیتوپلاسم بازوفیلی و هسته به وضوح قابل تشخیص نبود. این مرحله نیز بیشتر در تابستان و پاییز مشاهده شد.

اسپرماتیدها: واجد سیتوپلاسم بازوفیلی بوده و در مرکز لومن فولیکولی قرار داشتند و بیشتر در فصل زمستان مشاهده می‌شدند. همچنین در این فصل مورولای اسپرم که در نتیجه قرار گرفتن چندین اسپرماتید در کنار هم شکل می‌گیرند به تعداد زیاد مشاهده می‌شد.

اسپرماتوزوآها: کوچکترین سلول‌های جنسی نر بودند. سیتوپلاسم به شدت بازوفیلی داشتند و در فصل بهار به تعداد بسیار در مرکز فولیکول‌های بیضه قرار می‌گرفتند (شکل ۷).



شکل ۷. A: گناد نر صدف دوکفه‌ای گونه *P. euphratica* در تابستان. B: گناد نر در فصل پاییز واجد تعداد زیادی مورولای اسپرم، C: گناد نر در بهار واجد تعداد فراوان اسپرماتوزوآ. Sg: اسپرماتوگونی، Sc: اسپرمانتید، M: مورولای اسپرم، S: اسپرماتوزوآ (H&E×2900)

## بحث

مطالعه حاضر با هدف شناسایی و بررسی مراحل سیکل تولیدمثلی دوکفه‌ای‌های رودخانه کرخه انجام گرفت و در نهایت دو گونه *U. tigridis* و *P. euphratica* در تمام فصول در میان رسوبات گلی رودخانه کرخه (در محدوده شهرستان حمیدیه) به عنوان گونه‌های غالب شناسایی شدند. *P. euphratica* و *U. tigridis* دو گونه از صدف‌های دوکفه‌ای آب شیرین از خانواده یونیونیده می‌باشند (Lopez-Lima *et al.*, 2021; Graf and Cummings., 2021). مطالعه‌ی ساختار بافت شناسی غدد جنسی هر دو صدف دوکفه‌ای مشخص کرد که این دو گونه جدا جنس هستند که با مطالعات محققین مختلف در خصوص جدا جنس بودن بیشتر صدف‌های آب شیرین مطابقت دارد (Serefelisan *et al.*, 2011; Cek and Sereflishan, 2011; Alridge, 1999; Hinzman *et al.*, 2013; Hinzman *et al.*, 2013). با این وجود Hinzman و همکاران (2013) افزایش همافروسیسم را در آب‌های راکد گزارش کرده‌اند. Ahmadvand و همکاران (2023) نیز در بررسی صدف‌های رودخانه کارون، گونه *U. tigridis* را به عنوان گونه غالب منطقه شناسایی و گزارش کردند که اغلب افراد این گونه جداجنس می‌باشند.

در مطالعه حاضر بر اساس فراوانی انواع سلول‌های جنسی ماده، سه مرحله تخمدانی در سیکل تولیدمثلی شامل مرحله توسعه نیافته، مرحله در حال توسعه و مرحله توسعه یافته یا بالغ در نظر گرفته شد. در بیشتر مطالعات بر دوکفه‌ای‌های آب‌شیرین و دوکفه‌ای‌های دریایی، چرخه تولیدمثلی به سه تا هفت مرحله تقسیم شده است (Labecka and Domagala, 2018). از سوی دیگر قطر تخمک یک توصیف بسیار خوب برای چرخه تولیدمثلی است که با مرحله گامتوژنیک همخوانی دارد (Honkoop and van, 1998; Toro et al., 2002; Maloy et al., 2003) در این مطالعه نتایج اندازه‌گیری و مقایسه قطر تخمک این دو گونه نشان داد که قطر تخم‌های گونه *U. tigridis* بیش‌تر از گونه *P. euphratica* بود، با این حال بیشترین قطر تخمک در هر دو گونه در فصل زمستان و بهار اندازه‌گیری شد و غدد جنسی نیز در این دو فصل افزایش اندازه قابل توجهی داشتند. مطالعات بافت‌شناسی همچنین نشان داد که تخمدان در هر دو گونه *U. tigridis* و *P. euphratica* از نوع ناهمزمان بود. زیرا در هر زمان انواع سلول‌های جنسی ماده (اووگونی، تخمک‌های پیش‌زده‌سازی، تخمک‌های زرده‌سازی اولیه، و تخمک بالغ) در تخمدان قابل مشاهده بود که با یافته‌های Sereflisan و همکاران (2009) بر روی گونه *Anodonta Gabillotta Pseudodopsis* مطابقت دارد و بیان می‌کند که رشد گامت‌ها در این گونه که نمونه‌ای از صدف‌های دوکفه‌ای از خانواده یونیونیده می‌باشد ناهمزمان است، یعنی همه گامت‌ها همزمان به بلوغ نمی‌رسند و این نشان می‌دهد که آزاد شدن گامت ممکن است چندین بار در طول فصل تخم‌ریزی رخ دهد که به طور کلی ماه‌های تابستان را در بر می‌گیرد. همچنین گزارش مراحل مختلف رشد تخمک‌ها با یافته‌های Sereflisan و همکاران (2013) و Soliman و همکاران (2016) مطابقت داشت که روند مشابهی را در تحقیقات خود برای سایرگونه‌های *Unionidae* گزارش کردند.

در مطالعه حاضر همچنین بیشترین میزان رسیدگی گنادها در فصل بهار مشاهده شد و در فصل تابستان هر دو گونه تخمدان تخم‌ریزی کرده یا نابالغ را نشان می‌دادند. فاصله زمانی مشاهده تخمدان بالغ و مشاهده تخمدان‌های تخم‌ریزی کرده در تابستان می‌تواند نشان‌دهنده تولید گامت و دوره تخم‌ریزی به نسبت طولانی مدت در هر دو گونه باشد. از آنجا که محدوده تغییرات دمایی در منطقه مورد مطالعه چشمگیر نیست و تولید مثل آبریان تا حد زیادی به فوتوپریود وابسته است این مورد می‌تواند قابل توجیه باشد. Lima و همکاران (2012) نیز در بررسی اووژنز در صدف دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* در تالاب میرا در کشور پرتغال زمان تخم‌ریزی را در ماه‌های تابستان گزارش کردند. این در حالی است که نتایج متفاوتی نیز در این مورد گزارش شده است. Dagnino و همکاران (2017) در مطالعه‌ای بر تولیدمثل صدف دوکفه‌ای *Megapitaria squalida* در خلیج جنوب شرق کالیفرنیا، مهمترین دوره تخم‌ریزی (بیشترین میزان گامت آزاد شده) را از ماه‌های اکتبر تا نوامبر گزارش کرده‌اند و پیشنهاد داده‌اند که صید این گونه در این بازه زمانی متوقف شود. از سوی دیگر در مطالعه حاضر در بررسی گناد نر هر دو گونه *U. tigridis* و *P. euphratica* اسپرماتوژنز مانند اووژنز روند پیوسته‌ای داشت و در ۵ مرحله (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتیدها و اسپرماتوزواها) قابل مشاهده بود. همچنین مراحل مختلف رشد سلول‌های جنسی نر در تمام فصول مشاهده می‌شدند ولی اسپرماتوزواها در فصل زمستان و بهار فراوانی بیشتری داشتند. نتایج همچنین وجود مورولای اسپرم را در هر دو گونه نشان داد که بیشترین تعداد آن در گونه *U. tigridis* در فصل پاییز و در گونه *P. euphratica* در فصل زمستان مشاهده شد. Sereflisan و همکاران (2013) با مطالعات خود بر روی گونه *Potomida littoralis* گزارش کردند که اسپرماتیدهای اولیه در صورت قرارگیری در کنار هم خوشه‌های را به نام مورولای اسپرم تشکیل می‌دهند که در فصول مختلف به خصوص در پاییز و زمستان مشاهده می‌شوند. به نظر می‌رسد که مورولاهای اسپرم خوشه‌هایی از اسپرماتیدها هستند و زمانی که شرایط محیطی مناسب باشد به اسپرم بالغ تبدیل می‌شوند. Hliwa و همکاران (2015) در مطالعه خود بر روی *Sinanodonta woodiana* گزارش کردند که به دلیل نبود سلول‌های سرتولی، مورولاهای اسپرم در حین اسپرم‌زایی در اطراف مواد غذایی تجمع پیدا می‌کنند. از سویی دیگر به گفته برخی از محققین، وجود مورولای اسپرم شواهدی برای مسیر اسپرم‌زایی غیر طبیعی تحت شرایط خاص است (Hliwa et al., 2015). Ahmadnand و همکاران (2023) نیز در بررسی سیکل تولیدمثلی صدف دوکفه‌ای *U. tigridis* در رودخانه کارون، بیشترین میزان توسعه و بلوغ هر دو گناد نر و ماده را در فصل بهار گزارش کردند. با بررسی روند گامتوژنز در دو گونه *U. tigridis* و *P. euphratica* این نتیجه به دست آمد که دوکفه‌ای‌ها از هر دو جنس در فصل بهار بالغ

بودند. مشاهده گندهای بالغ در فصل بهار و از سویی دیگر مشاهده مرحله تخم ریزی در فصل تابستان می تواند نشان دهنده زمان اصلی رسیدگی گنادی هر دو گونه در رودخانه کرخه در منطقه مورد مطالعه در فصل بهار و زمان اصلی تولیدمثل در فصل تابستان باشد.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعات ما نشان داد که هر دو گونه *P. euphratica* و *U. tigridis* گونه‌های غالب دو کفه‌ای‌ها در رودخانه کرخه در تمام فصول سال بودند. هر دو جدا جنس بودند و از نظر چرخه تولیدمثل دارای سه مرحله توسعه نیافته، در حال توسعه و توسعه یافته بودند. تخمدان در هر دو گونه از نوع ناهمزمان بود. مراحل اووژنز و اسپرماتوژنز در هر دو گونه روند مشابهی داشت و به نظر می رسد زمان اصلی رسیدگی گنادی هر دو گونه در رودخانه کرخه در فصل بهار و زمان اصلی تولیدمثل در فصل تابستان باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به پاس حمایت مالی و از اداره محیط زیست حمیدیه به جهت همکاری در جمع آوری نمونه ها در این پژوهش سپاسگزاری می کنند.

### References:

- Ahmadvand, S., Shirali, S., Sakhaei, N. and Doustshenas, B., 2023. Investigation the process of gametogenesis and a case report of hermaphroditism of *Unio tigridis* (bivalve: Unionidae) in Karun River', *Journal of Marine Science and Technology*, in press. DOI: 10.22113/jmst.2023.410193.2544. (In Persian)
- Aldridge, D.C., 1999. The morphology, growth and reproduction of *Unionidae* (*Bivalvia*) in a fenland waterway. *Journal of Molluscan Studies*. 65(1), pp.47-60. DOI: 10.1093/mollus/65.1.47.
- Bancroft, J.D. and Gamble, M. eds., 2008. *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2003. *Invertebrates* (2<sup>nd</sup> edition). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-097-5.
- Cao, Y.L., Liu, X.J., Wu, R.W., Xue, T.T., Li, L., Zhou, C.H., Ouyang, S. and Wu, X.P., 2018. Conservation of the endangered freshwater mussel *Solenia carinata* (*Bivalvia*, *Unionidae*) in China. *Nature Conservation*, 26, pp.33-53. Doi: 10.3897/natureconservation.26.25334.
- Çek, Ş. and ŞerefliŞan, H., 2011. The gametogenic cycle of *Leguminaia whaetleyi* (Lea, 1862) in lake Gölbaşı, Turkey (*Bivalvia*: *Unionidae*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315(1), pp.30-40. DOI: 10.1002/jez.648.
- Álvarez-Dagnino, E., Santamaría-Miranda, A., García-Ulloa, M. and Góngora-Gómez, A.M., 2017. Reproduction of *Megapitaria squalida* (*Bivalvia*: *Veneridae*) in the Southeast Gulf of California, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 65(3), pp.881-889. DOI: 10.15517/rbt.v65i3.26371.
- Drummond, L., Mulcahy, M. and Culloty, S., 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture*, 254(1-4), pp.326-340. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.10.052.
- Gosling, E., 2003. *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. Fishing News Books, Blackwell Publishing.
- Graf, D.L. and Cummings, K.S., 2021. A 'big data' approach to global freshwater mussel diversity (*Bivalvia*: *Unionoida*), with an updated checklist of genera and species. *Journal of Molluscan Studies*, 87(1), p.eyaa034.. DOI: 10.1093/mollus/eyaa034.
- Gray, R., 2014. A new critical estimate of named species – level diversity of the recent Mollusca. *American Malacological Bulletin*, 32 (2), pp. 308-322. DOI: 10.4003/006.032.0204.
- Haag, W.R. and Leann Staton, J., 2003. Variation in fecundity and other reproductive traits in freshwater mussels. *Freshwater Biology*, 48(12), pp.2118-2130.
- Hinzmann, M., LOPES-LIMA, M.A.N.U.E.L., Teixeira, A., Varandas, S., Sousa, R., Lopes, A., Froufe, E. and Machado, J., 2013. Reproductive cycle and strategy of *Anodonta anatina* (L., 1758): Notes on

- hermaphroditism. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 319(7), pp.378-390. DOI: 10.1002/jez. 1801.
- Hliwa, P., Zdanowski, B., Dietrich, G.J., Andronowska, A., Król, J. and Ciereszko, A., 2015. Temporal changes in gametogenesis of the invasive Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae) from the Konin lakes system (Central Poland). *Folia Biologica (Kraków)*, 63(3), pp.175-185. DOI: 10.3409/fb63\_3.175.
- Honkoop, P.J.C. and Van der Meer, J., 1998. Experimentally induced effects of water temperature and immersion time on reproductive output of bivalves in the Wadden Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 220(2), pp.227-246. DOI:10.1016/S0022-0981(97)00107-X.
- Labecka, A.M. and Domagala, J., 2018. Continuous reproduction of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1824) females: an invasive mussel species in a female-biased population. *Hydrobiologia*, 810, pp.57-76. DOI:10.1007/s10750-016-2835-2
- Lima, P., Monteiro, S.M., Sousa, M. and MacHado, J., 2012. A histological study of oogenesis in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758) in Mira Lagoon, Portugal. *Malacologia*, 55(2), pp.251-261. DOI:10.4002/040.055.0206.
- Lopes-Lima, M., Burlakova, L.E., Karatayev, A.Y., Mehler, K., Seddon, M. and Sousa, R., 2018. Conservation of freshwater bivalves at the global scale: diversity, threats and research needs. *Hydrobiologia*, 810, pp.1-14. DOI:10.1007/s10750-017-3486-7
- Lopes-Lima, M., Gürlek, M.E., Kebapçı, Ü., Şereflişan, H., Yanık, T., Mirzajani, A., Neubert, E., Prié, V., Teixeira, A., Gomes-dos-Santos, A. and Barros-García, D., 2021. Diversity, biogeography, evolutionary relationships, and conservation of Eastern Mediterranean freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 163, p.107261. DOI:10.1016/j.ympev.2021.107261.
- Maloy, A.P., Barber, B.J. and Rawson, P.D., 2003. Gametogenesis in a sympatric population of blue mussels, *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*, from Cobscook Bay (USA).
- Masaeli, S., Mostafavi, P.G., Sahafi, H.H., Jahromi, S.T., Nabinejad, A. and Noaman, V., 2021. Molecular phylogeny of bivalve families (Arcidae, Chamidae, Margaritidae, Ostreidae, Veneridae) in the Persian Gulf. DOI: 10.22092/ijfs.2021.123480.
- Şereflişan, H., Çek, Ş. and Şereflişan, M., 2009. Histological studies on gametogenesis, hermaphroditism and the gametogenic cycle of *Anodonta gabillotia pseudodopsis* (Locard, 1883) in the Lake Gölbaşı, Turkey (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Shellfish Research*, 28(2), pp.337-344. DOI: 10.2983 /035.028.0216.
- Şereflişan, H., Çek, Ş. and Şereflişan, M., 2013. The reproductive cycle of *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798)(Bivalvia: Unionidae) in Lake Gölbaşı, Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(5), pp.1311-1319.
- Soliman, F.E., Moustafa, A.Y., Ismail, T.G. and Mohamed, O.T., 2016. Reproductive Cycle, Gametogenesis and Embryonic Development of *Nitidulana teretiuscula* (Bivalvia: Unionidae), from the River Nile at Sohag Governorate, Egypt. *Egyptian Journal of Zoology*, 66, pp. 115-138. DOI: 10.12816/0034713.
- Toro, J.E., Thompson, R.J. and Innes, D.J., 2002. Reproductive isolation and reproductive output in two sympatric mussel species (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*) and their hybrids from Newfoundland. *Marine Biology*, 141, pp.897-909. DOI:10.1007/s00227-002-0897-3.
- Waller, T.R., 2006. New phylogenies of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia): reconciling morphological and molecular approaches. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 35, pp. 1-44). Elsevier. DOI:10.1016/S0167-9309(06)80028-1.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J. and Jiang, G., 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica chimica acta*, 606(2), pp.135-150. DOI: 10.1016/j.aca.2007.11.018.