

## بررسی بیان ژن فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-I) و تغییرات بافت‌شناسی بیضه‌ها در دوره بلوغ خروس‌های بومی

زهرا حشمتی پور<sup>۱</sup>، مهرداد معمار<sup>۲\*</sup>، مصطفی محقق دولت آبادی<sup>۳</sup> و سیدمحمد رضا هاشمی<sup>۴</sup>

۱، ۲، ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم دامی دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۴. محقق بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش ترویج

کشاورزی، شیراز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۱۴)

### چکیده

به منظور مطالعه تغییرات رشد بیضه‌ها و بیان ژن IGF-I در دوره بلوغ خروس‌های بومی فارس، ۲۴ قطعه خروس پنج، شش، هفت و هشت ماهه به طور تصادفی انتخاب شدند. در هر نوبت نمونه برداری شش خروس کشتار و نمونه‌های بافت بیضه برای اندازه‌گیری میزان فراوانی رونوشت ژن IGF-I و صفات بیومتریک بیضه‌ها جمع‌آوری شدند. نتایج نشان داد که بیان ژن IGF-I در بیضه خروس‌های شش، هفت و هشت ماهه نسبت به خروس‌های پنج ماهه افزایش یافت، در حالی که فراوانی رونوشت این ژن در هفت ماهگی تفاوتی با شش ماهگی نداشت. همچنین، نتایج نشان دادند که وزن بیضه‌های چپ و راست در هفت و هشت ماهگی نسبت به پنج و شش ماهگی افزایش یافت و بیشینه نسبت طول به عرض بیضه چپ در شش ماهگی و کمینه آن در هفت و هشت ماهگی مشاهده شد ولی این نسبت در بیضه راست در سنین مختلف تفاوتی نداشت. بررسی تغییرات بافت‌شناسی بیضه‌ها نیز نشان داد که بیشینه‌ی تعداد سلول‌های سرتولی و لایدیگ در هر دو بیضه چپ و راست مربوط به سن هشت ماهگی بود. به طور کلی، نتایج نشان داد که فراوانی رونوشت ژن IGF-I در دوره بلوغ خروس‌های بومی فارس (پنج تا هشت ماهگی) روندی افزایشی داشت و وزن بیضه‌های چپ و راست در هفت و هشت ماهگی به بیشترین مقدار خود رسید.

واژه‌های کلیدی: بلوغ، بومی، بیضه، خروس، IGF-I.

## Investigating IGF-I gene expression and histological changes of testes during the sexual maturity of native roosters

Zahra Heshmatypour<sup>1</sup>, Mehrdad Meamar<sup>2\*</sup>, Mostafa Mohaghegh Dolat Abadi<sup>3</sup>  
and Seyed Mohammad Reza Hashemi<sup>4</sup>

1, 2, 3. M.Sc. Student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Animal Sciences, Yasouj University, Yasouj, Iran  
4. Researcher of Animal Science Research Department, Fars Agricultural and Native Resources Research and Education Center,

Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

(Received: Oct. 2, 2019 - Accepted: May 3, 2020)

### ABSTRACT

In order to investigate the changes of IGF-I gene transcription during the sexual maturity period of Fars native roosters, 24 roosters in the age of 5, 6, 7, and 8 months were selected randomly. In each date of sampling 6 roosters were slaughtered and testes were collected for evaluation the level of IGF-I gene transcription. The results indicated that IGF-I gene transcription in the testes of 6, 7 and 8-month roosters were increased compared to 5-month roosters while the expression of this gene did not change in 7<sup>th</sup> months compared to 6<sup>th</sup> months. The results also indicated that the level of IGF-I gene transcription did not differ significantly in left and right testes in all ages (5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> months) but the left and right testes weight increased in 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> months compared to 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> months. The maximum and the minimum rates of left testis length to its width were observed in 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> months respectively but this rate did not change in right testis among different ages. Histological investigation also indicated that the maximum number of Sertoli and Leydig cells in both left and right testes was observed on 8<sup>th</sup> months. In conclusion the results indicated that the gene transcription of IGF-I had an increasing procedure during the sexual maturity period of roosters (5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> months) and weight of the left and right testes reached to their maximum rate in 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> months.

**Keywords:** IGF-I, native, rooster, sexual maturity, testis.

\* Corresponding author E-mail: meamar@yu.ac.ir

### مقدمه

نژادهای بومی ذخایر ژنتیکی ارزشمند هر کشوری محسوب می‌شوند و با توجه به داشتن شرایط تطابق با روش‌های پرورش سنتی معمول در روستاها، یک منبع تأمین پروتئین مفید برای خانواده‌های روستایی می‌باشد. در کشور ما نزدیک به دو دهه است که پژوهش‌های هدفمندی روی بررسی ویژگی‌های تولیدمثلی طیور بومی آغاز شده است (Meamar & Zamiri, 2005). سازه‌های گوناگونی مانند نژاد، سن، فصل، نور، دما، تغذیه و سیستم نگهداری بر تولیدمثلی و باروری خروس تأثیر می‌گذارند (Zamiri, 2012). بیضه‌ها یکی از مهم‌ترین اندام‌های دستگاه تولیدمثلی مهره‌داران می‌باشند و در بسیاری از پرندگان، اندازه بیضه‌ها سالانه دستخوش تغییرات چشم‌گیری می‌شوند. در پرندگان اهلی نیز تغییرات اندازه بیضه‌ها از زمان خروج از تخم تا بلوغ جنسی و پس از آن، همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است (Zamiri, 2001). بیضه‌های برخی از گونه‌ها نظیر پرستوی درختی (*Tachycineta bicolor*) دارای اندازه‌های یکسان هستند (Kempnaera et al., 2002). اما در بسیاری از گونه‌ها اندازه بیضه‌ها نامتقارن است که یکی از بیضه‌ها به‌طور معمول بزرگتر از بیضه دیگر است (Gunn et al., 2008). در دیگر مهره‌داران نیز، عدم تقارن در بیضه‌ها در یک گونه به‌طور کلی امری طبیعی است (Merila & Sheldon, 1999). یک مورد قابل توجه از عدم تقارن شدید بیضه پرندگان در کوکال‌ها (Coucals) پیدا شده که در آن تنها یک بیضه توسعه می‌یابد (Ligon, 1997). فاکتورهای رشد شبه‌انسولین (IGF-I و IGF-II) پروتئین‌های کوچکی هستند که باعث رشد و تمایز انواع بافت‌های مهره‌داران می‌شوند (Wenner & LeRoith, 1996). فاکتورهای رشد شبه‌انسولین-۱ (IGF-I) در رشد اولیه پس از تولد اهمیت دارد در حالی که IGF-II عمدتاً یک عامل رشد جنین محسوب می‌شود. فاکتورهای رشد شبه‌انسولین-۱ به‌طور عمده توسط کبد تحت کنترل هورمون رشد و شرایط تغذیه‌ای مناسب تولید می‌شود (Cemmmmons & Underwood, 1991). مطالعات گوناگون روی پستانداران نشان داد که سامانه IGF

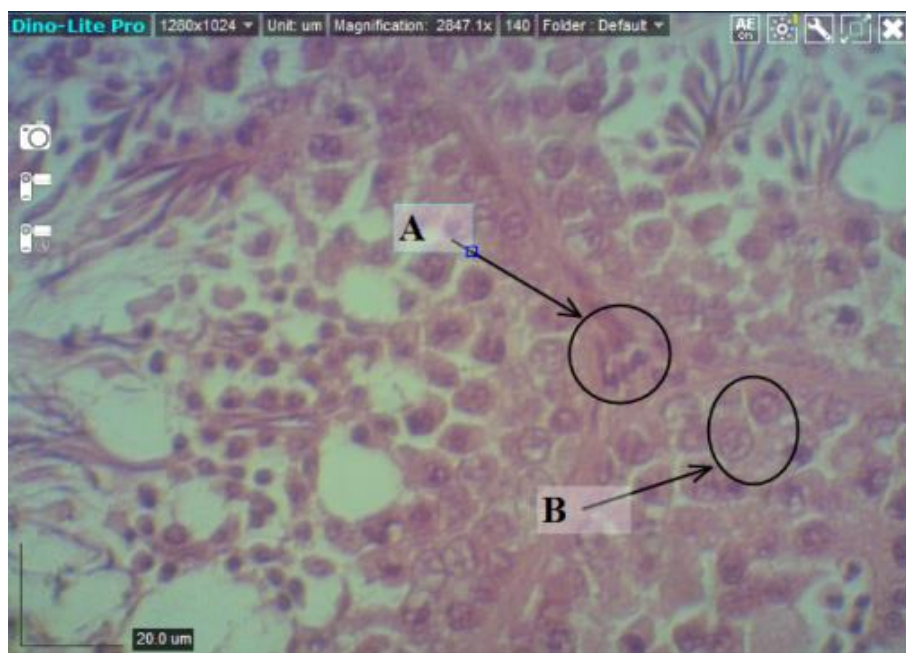
نقش مهمی در عملکرد اندام‌های تولیدمثلی دارد و ژن‌های IGF و گیرنده آن (IGF-IR) در بیضه بیان می‌شود. همچنین این سامانه همراه با گونادوتروپین‌ها و آندروژن‌ها در هماهنگی رشد، اسپرماتوژنز و استروئیدوژنز نقش دارد (Weinzimer & Cohan, 1999). فاکتورهای رشد شبه‌انسولین-۱ در جنس ماده منجر به تکثیر و تمایز سلول‌های گرانولوزا می‌شود و به‌همراه FSH سبب ساخت پروژسترون در این سلول‌ها می‌شود (Schams et al., 1988). در جنس نر IGF-I همسو با LH می‌تواند با تأثیر بر سلول‌های لایدیگ سبب افزایش تولید آندروژن‌ها شود (Hernandez et al., 1988) و با روش‌های ارتباطی بین سلولی اتوکراین و پاراکراین نقش خود را در بیضه‌ها اعمال می‌نماید (Fu et al., 2001). وزن بیضه پرندگان با آغاز بلوغ، افزایش یافته و سن بلوغ جنسی بالاترین وزن بیضه و بالاترین غلظت هورمون‌های تستوسترون و LH همبستگی مثبت دارد (Kouatcho et al., 2015). افزایش وزن بیضه در دوره بلوغ جنسی ناشی از افزایش تعداد و حجم سلول‌های لایدیگ و سرتولی است و افزایش تستوسترون تولید شده در این دوره نیز همراه با FSH باعث تحریک و تنظیم فرآیندهای اسپرم‌سازی می‌شود (Abdulgabbbar Ali et al., 2017). لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه‌ها دارای سلول‌هایی سرتولی با اشکال نامنظم و لایه اپیتلیوم زاینده‌ای است که شامل چند لایه سلول‌های اسپرماتوگونی است که در مراحل مختلف اسپرماتوژنز می‌باشند (Kouatcho et al., 2015). با افزایش سن، باروری کاهش می‌یابد که با کاهش وزن بیضه‌ها، پس‌روی ملایم تا شدید لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش شمار سلول‌های اسپرماتوگونی و لایدیگ همراه است (Wilson et al., 2018). مطالعه روی خروس‌های گوشتی سویه کاب ۵۰۰ از سن ۱۹ تا ۵۵ هفتگی نشان داد که وزن بیضه و نسبت تعداد اسپرم تولید شده به ازای هر گرم وزن بیضه از سن ۱۹ تا ۳۲ هفتگی افزایش و پس از آن تا سن ۵۵ هفتگی به تدریج کاهش یافت (Sarabia Frago et al., 2013). مقایسه ویژگی‌های بیومتری بیضه خروس‌های سویه کاب ام ایکس ۲۵ و ۴۵ هفته نشان داد که

نمونه برداری، پرنده‌ها پس از وزن‌کشی کشتار شدند و بیضه‌های چپ و راست با دقت از بدن خارج و وزن هر یک به صورت جداگانه ثبت شد و همچنین طول و عرض بیضه‌ها نیز به وسیله کولیس اندازه‌گیری شدند. سپس بیضه‌ها با سرم فیزیولوژیک شست‌وشو شدند و بافت اپیدیدیمیس و دیگر بافت‌های همراه جدا و بخشی از بیضه‌ها جهت مطالعات بافت‌شناسی درون محلول فرمالین قرار داده شده و باقی‌مانده بافت بیضه نیز برای ارزیابی فراوانی نسبی رنوشت ژن‌های IGF1، به درون ازت مایع منتقل شدند. برای بررسی جمعیت یاخته‌های سرتولی و لایدیگ نمونه‌های بافتی با استفاده از روش‌های استاندارد (Abdulgabar *et al.*, 2017) روی لام آزمایشگاهی تهیه شد. سپس به کمک عدسی شیئی شماره ۴۰ میکروسکوپ نوری (Olympus, USA) مجهز به دوربین و نرم افزار دینولایت (Dinolite, Taiwan)، شمار هر کدام از یاخته‌های لایدیگ و سرتولی از مجموع ۱۵ عکس گرفته شده به مساحت کل ۰/۲۸ میلی‌متر مربع برای هر نمونه (تکرار) ثبت و میانگین سلول‌های شمارش‌شده در نمونه‌های مختلف هر تیمار محاسبه و گزارش شد (شکل ۱).

خروس‌های مسن‌تر وزن بیضه کمتری داشتند (Leao *et al.*, 2017). از آنجا که با تغییر سن ویژگی‌های بیومتری بیضه‌ها تغییر می‌کند. لذا بررسی تغییرات رنوشت ژن IGF-I، تغییرات ویژگی‌های بیومتری بیضه و همچنین تغییرات جمعیت سلول‌های سرتولی و لایدیگ در دوره بلوغ جنسی (پیوبرتی تا بلوغ) همگام با تغییر سن خروس‌های بومی می‌تواند در روشن‌تر ساختن ویژگی‌های بنیادین تولید مثلی این پرنده مؤثر باشد بنابراین پژوهش حاضر در راستای رسیدن به این اهداف طراحی و اجرا شد.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۲۴ خروس بومی فارس در چهار تیمار (پنج، شش، هفت و هشت ماهگی) و شش تکرار (خروس) انجام شد. خروس‌ها در مدت انجام آزمایش با جیره مخصوص پرورش خروس‌های بومی مولد دارای ۲۹۸۰ کیلوکالری بر کیلوگرم و ۱۲/۲۸ درصد پروتئین تغذیه شدند و در تمام مدت آزمایش تحت تأثیر برنامه‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار داشتند. در هر نوبت



شکل ۱. مقطع عرضی بافت بیضه خروس‌های بومی فارس پنج تا هشت ماهه. A) سلول‌های لایدیگ، B) سلول‌های سرتولی.

بزرگنمایی:  $40 \times$ ، نوار مقیاس: ۲۰ میکرومتر.

Figure 1. Cross section of testes of 5<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup>- month Fars native roosters. A) Leydig cells, B) Sertoli cells. Magnification:  $40 \times$ . Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری ۵ درصد مقایسه شدند.

### نتایج و بحث

مقایسه فراوانی نسبی رونوشت ژن IGF-I در بیضه‌های خروس‌های بومی فارس در نمودار ۱ آورده شده است. این نمودار نشان می‌دهد که به‌طور کلی میزان فراوانی نسبی رونوشت ژن IGF-I در بیضه‌های خروس‌های شش تا هشت ماهه نسبت به پنج ماهه روندی افزایشی داشت به‌طوری‌که فراوانی رونوشت این ژن در خروس‌های شش ماهه ۷۴/۱۴ برابر ( $P=0/0001$ ) در خروس‌های هفت ماهه ۵۷/۱۱ برابر ( $P=0/002$ ) و در خروس‌های هشت ماهه ۳۰۲/۳۰ برابر ( $P=0/0001$ ) نسبت به خروس‌های پنج ماهه افزایش یافت (نمودار A-۱). همچنین، نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن IGF-I در بیضه خروس‌های هشت ماهه به‌طور معنی‌داری ( $P=0/05$ ) به میزان ۴/۰۷ برابر نسبت به خروس‌های شش ماهه افزایش یافت، درحالی‌که میزان بیان این ژن در خروس‌های هفت ماهه نسبت به هشت ماهه تغییری نداشت (نمودار B-۱). مقایسه میزان بیان ژن IGF-I در خروس‌های هشت ماهه نسبت به هفت ماهه نیز نشان داد که بیان این ژن در خروس‌های هشت ماهه ۵/۲۹ برابر ( $P=0/01$ ) افزایش یافت (نمودار C-۱).

فاکتور رشد شبه‌انسولین (IGF-1) یک تنظیم‌کننده مهم برای عملکرد سلول‌های لایدیگ و استروئیدوژنیک در بیضه‌ها است و تولید آن در سلول‌های سرتولی، پری‌تیوبولار و لایدیگ بیضه به اثبات رسیده است (Lin *et al.*, 1990). برای مثال موش‌هایی که برای حذف IGF-I دست‌کاری ژنی شدند، به دلیل رشد کم بیضه‌ها، داشتن سلول‌های لایدیگ نابالغ و تولید تستوسترون پایین، نابارور بودند (Baker *et al.*, 1996).

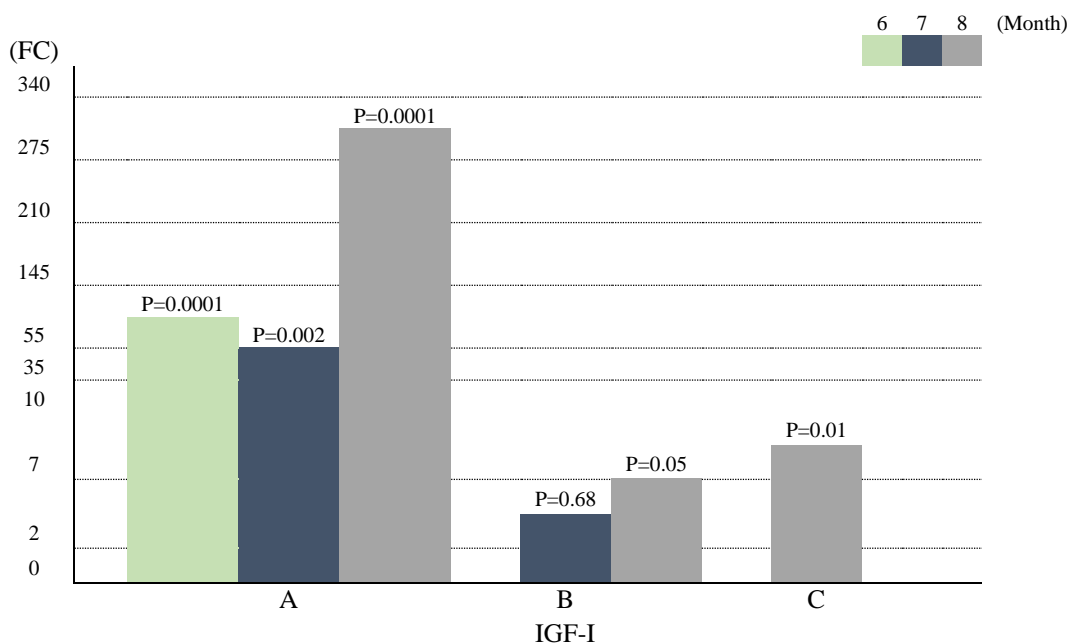
برای مطالعه تغییرات در فراوانی نسبی رونوشت mRNA ژن گیرنده آندروژن توالی ژن هدف (به‌عنوان کنترل داخلی) از پایگاه داده NCBI به‌دست آمد (جدول ۱) سپس آغازگرها توسط نرم‌افزار آنالیز Primer3 Plus طراحی شد. جداسازی RNA کل سلول‌های بیضه با کمک کیت RNX-Plus تولیدی شرکت سیناکلون (شماره کاتالوگ: EX6101) انجام شد. غلظت و خلوص RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتریک تعیین شد و یکپارچگی RNA با استفاده از الکتروفورز تأیید شد. ساخت cDNA از mRNA بالغ توسط آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (Travskriptase Reverse) همراه با آغازگر تصادفی هگزامر انجام شد. برای ساخت cDNA از کیت WizScript<sup>TM</sup> RT Master تولیدی شرکت سیناکلون (شماره کاتالوگ: W2203) استفاده شد و آغازگر ژن موردنظر، بر اساس توالی نوکلئوتیدی در جدول ۱ و با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شده است. این واکنش با کمک آغازگر ویژه ژن‌های موردنظر ساخت شرکت سیناکلون و کیت QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green PCR ساخت شرکت کیاژن (شماره کاتالوگ: ۲۰۴۰۵۴) انجام شد و برای تعیین بازده تکثیر از روش منحنی استاندارد استفاده شد. برنامه حرارتی بهینه برای ژن‌های مورد استفاده در واکنش q-PCR در این پژوهش به‌صورت زیر بود.

### واکاوی آماری

تجزیه و تحلیل نتایج پژوهش حاضر در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. بدین منظور محاسبات مربوط به آنالیز فراوانی رونوشت ژن‌های هدف با استفاده از نرم‌افزار REST, 2009, V2.0.13 انجام شد و داده‌های مربوط به اندازه و وزن بیضه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و با رویه PROC GLM آنالیز شدند. سپس

جدول ۱. اطلاعات مربوط به آغازگر مورد استفاده در Real-time PCR  
Table 1. Details of primer sequences used for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequences	Access number	Annealing temperature °C
IGF-I	5'-CCCAGAAACACTGTGTGGTG-3'	NM_001004384.2	60
	5'-CACGTACAGAGCGTGCAGAT-3'		
β-Actin	5'-ATGAAGCCCGAGCAAAAAGA-3'	NM-205518.1	60
	5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'		



نمودار ۱. مقایسه فراوانی نسبی رونوشت ژن IGF-I در بیضه‌های خروس‌های بومی فارس. FC: چند برابر تغییر.

(A) مقایسه بیان نسبی ژن IGF-I در بیضه خروس‌های شش، هفت و هشت ماهه نسبت به پنج ماهه.

(B) مقایسه بیان نسبی ژن IGF-I در بیضه خروس‌های هفت و هشت ماهه نسبت به شش ماهه.

(C) مقایسه بیان نسبی ژن IGF-I در بیضه خروس‌های هشت ماهه نسبت به هفت ماهه.

Figure 1. The transcript abundance of IGF-I gene in the testes of Fars native roosters. FC: Fold change.

A) The transcript abundance of IGF-I gene in the testes of 6<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup>- month Fars native roosters compared to 5<sup>th</sup>- month roosters.

B) The transcript abundance of IGF-I gene in the testes of 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup>- month Fars native roosters compared to 6<sup>th</sup>- month roosters.

C) The transcript abundance of IGF-I in the testes of 8<sup>th</sup>- month Fars native roosters compared to 7<sup>th</sup>- month roosters.

(2001)، تیروکسین (Fumel *et al.*, 2012) و اکتیوین (Boitani *et al.*, 1995) بر رشد و تکامل سلول‌های سرتولی تأثیر دارند ولی IGF-I به‌عنوان یکی از عوامل مهم افزایش تعداد سلول‌های سرتولی و اندازه بیضه‌ها شناخته شده است (Pitetti *et al.*, 2013). از طرف دیگر سلول‌های اسپرماتوگونی نیز یکی از منابع تولید IGF-I در بیضه‌ها می‌باشند که با روش پاراکرین نقش خود را در تنظیم فعالیت سلول‌های سرتولی، لایدیگ و مایوئید اعمال می‌نماید (Griffeth *et al.*, 2014). بنابراین با توجه به این‌که فعالیت سلول‌های اسپرماتوگونی در بیضه‌های پرنده نر در دوره بلوغ افزایش می‌یابد (Zamiri, 2012)، به نظر می‌رسد یکی از دلایل افزایش تدریجی بیان ژن IGF-I بیضه‌ها در دوره بلوغ خروس‌های بومی پژوهش حاضر، افزایش تدریجی فعالیت سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه‌ها در این دوره باشد.

مطالعه روی بلدرچین ژاپنی نشان داد که فراوانی رونوشت mRNA، ژن IGF-I در بیضه‌های این پرنده در گروه‌های سنی مختلف متفاوت بود و غلظت سرمی ایزومرهای IGF نیز هم‌زمان با رشد بیضه و کامل شدن سن بلوغ جنسی افزایش یافت که نشان‌دهنده تأثیر سامانه IGF-I در تکامل بیضه پرنده‌گان هم‌گام با تغییرات سن در آنهاست (Fu *et al.*, 2001). در پژوهش حاضر بیان ژن IGF-I در بیضه‌ها از سن پنج تا هشت ماهگی روندی افزایشی داشت (نمودار ۱) و هم‌زمان تعداد سلول‌های سرتولی و اندازه بیضه‌ها نیز به تدریج افزایش یافت (جدول ۲). نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که اندازه بیضه‌ها و تولید اسپرم با تعداد سلول‌های سرتولی بیضه همبستگی مثبت دارد (Sarabia Fragoso *et al.*, 2013) و علی‌رغم این‌که هورمون‌هایی نظیر FSH (Baker & O'Shughessy, )

جدول ۲. میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) ویژگی‌های بیضه‌های خروس‌های بومی فارس پنج ماهه تا هشت ماهه

Table 2. Mean ( $\pm$  Standard deviation) testes properties of 5<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup>-month Fars native roosters

Property	Age (month)			
	5	6	7	8
Testes weight (gr)	18.27 <sup>b</sup> $\pm$ 4.19	24.34 <sup>b</sup> $\pm$ 3.21	32.63 <sup>a</sup> $\pm$ 5.37	37.24 <sup>a</sup> $\pm$ 6.63
Left testis weight (gr)	10.57 <sup>b</sup> $\pm$ 3.10	13.23 <sup>b</sup> $\pm$ 1.88	19.78 <sup>a</sup> $\pm$ 2.56	18.01 <sup>a</sup> $\pm$ 3.13
Right testis weight (gr)	7.70 <sup>b</sup> $\pm$ 2.10	10.38 <sup>b</sup> $\pm$ 1.46	16.76 <sup>a</sup> $\pm$ 2.77	16.50 <sup>a</sup> $\pm$ 2.62
$\frac{\text{Length}}{\text{Width}}$ left testis	2.05 <sup>b</sup> $\pm$ 0.04	2.31 <sup>a</sup> $\pm$ 0.27	1.92 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.11	1.78 <sup>c</sup> $\pm$ 0.19
$\frac{\text{Length}}{\text{Width}}$ right testis	1.90 <sup>a</sup> $\pm$ 0.10	1.91 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19	1.81 <sup>a</sup> $\pm$ 0.16	1.81 <sup>a</sup> $\pm$ 0.17
Left testis Sertoli cells* (number)	10.66 <sup>b</sup> $\pm$ 4.13	10.33 <sup>b</sup> $\pm$ 2.16	15.50 <sup>b</sup> $\pm$ 5.57	28.66 <sup>a</sup> $\pm$ 4.13
Right testis Sertoli cells* (number)	8.50 <sup>c</sup> $\pm$ 1.37	13.00 <sup>bc</sup> $\pm$ 3.40	17.33 <sup>b</sup> $\pm$ 5.35	25.33 <sup>a</sup> $\pm$ 5.08
Left testis Leydig cells* (number)	36.00 <sup>b</sup> $\pm$ 4.93 <sup>b</sup>	31.66 <sup>b</sup> $\pm$ 7.63 <sup>b</sup>	34.50 <sup>b</sup> $\pm$ 7.17 <sup>b</sup>	49.66 <sup>a</sup> $\pm$ 8.16 <sup>a</sup>
Right testis Leydig cells* (number)	29.66 <sup>c</sup> $\pm$ 4.03	33.16 <sup>bc</sup> $\pm$ 7.22	38.00 <sup>b</sup> $\pm$ 3.89	50.66 <sup>a</sup> $\pm$ 6.59

a, b, c در هر ردیف، میانگین‌های با حروف غیر همسان اختلاف معنی‌داری دارند ( $P \leq 0.05$ ).

\* بر پایه میانگین ۱۵ تصویر (۰/۲۸ میلی‌متر مربع) محاسبه شده است.

a, b, c, means with different letters within a row are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

\* Calculated based on 15 micrographs (0.28 mm<sup>2</sup>) and averaged.

سنین هفت و هشت ماهگی به‌طور معنی‌داری بیشتر از سنین پنج و شش ماهگی بود. گزارش شده است که رشد اندام‌های جنسی مانند بیضه‌ها به‌وسیله‌ی آندروژن‌ها به‌ویژه تستوسترون تحریک می‌شود (Gryzińska *et al.*, 2011). در مطالعه‌ی دیگر که روی خروس‌های پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تغییرات هورمون‌های جنسی در دوران بلوغ انجام شد (داده‌های منتشر نشده) غلظت هورمون تستوسترون در سنین هفت و هشت ماهگی بیشتر از سنین پنج و شش ماهگی بود که این عامل می‌تواند هم‌زمان با افزایش بیان ژن IGF-I یک از دلایل افزایش رشد و وزن بیضه‌ها در هفت و هشت ماهگی باشد. از طرف دیگر یافته‌های پژوهش‌های متعدد در مورد ویژگی‌های مورفومتری بیضه در نژادهای مختلف همچنین نشان داده است که تغییرات اندازه بیضه و عملکرد اسپرماتوژنیک آن به عواملی مانند سن (Shil & Kashmiri, 2012)، فصل تولیدمثلی (Shil *et al.*, 2015) و دیگر سازه‌ها نیز وابسته است. بیضه بالغ دارای لوله‌های اسپرمی بزرگ با اشکال نامنظم و با لایه زاینده چند لایه است که شامل سلول‌هایی است که همه مراحل اسپرماتوژنز را تشکیل می‌دهند و این یکی از دلایلی است که باعث بزرگتر شدن اندازه بیضه در زمان بلوغ جنسی می‌شود (Shil *et al.*, 2015). در پژوهشی دیگر، افزایش وزن بیضه را ناشی از افزایش تعداد و حجم سلول‌های لایدیگی طی بلوغ جنسی دانسته‌اند (Gonzalez-maran & Soria-castro, 2010). که از این لحاظ با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد به طوری که

نتایج جدول ۲ نشان داد که وزن بیضه خروس‌ها در هفت و هشت ماهگی به‌طور معنی‌داری بیشتر از خروس‌های پنج و شش ماهه بود اما بین خروس‌های هفت و هشت ماهه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج همچنین نشان داد که وزن هر دو بیضه چپ و راست در هفت و هشت ماهگی به‌طور معنی‌داری بیشتر از وزن هر دو بیضه چپ و راست در پنج و شش ماهگی بود و نسبت طول به عرض در بیضه چپ در شش ماهگی بیشترین و در هشت ماهگی کمترین میزان را داشت. اما نسبت طول به عرض بیضه راست در همه‌ی گروه‌های سنی هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بررسی بافت‌شناسی بیضه‌های چپ و راست از لحاظ جمعیت سلول‌های سرتولی و لایدیگ نشان داد که بیشینه‌ی تعداد سلول‌های سرتولی و لایدیگ در سن هشت ماهگی مشاهده شد. تفاوتی جزئی نیز در روند افزایش تعداد سلول‌های سرتولی و لایدیگ در بیضه‌های چپ و راست مشاهده شد، به‌طوری‌که در بیضه چپ تعداد سلول‌های سرتولی و لایدیگ بین سنین پنج، شش و هفت ماهگی تفاوت معنی‌دار آماری نداشت در حالی که در بیضه راست تعداد این سلول‌ها بین سنین پنج و هفت ماهگی تفاوت معنی‌داری داشت.

به‌طور کلی، وقوع بلوغ جنسی با بالاترین وزن بیضه و همچنین افزایش غلظت هورمون تستوسترون در خون همبستگی مثبت دارد (Zamiri, 2012). در پژوهش حاضر نیز با تکامل بلوغ جنسی، وزن کل بیضه‌ها و همچنین میانگین وزن بیضه‌های چپ و راست نیز در

به این معنی که افزایش وزن بیضه با رشد یکسان طول و عرض بیضه‌ها در این مدت همراه بود. فرضیه‌های مختلفی برای تفسیر دلایل رشد نامتقارن بیضه‌ها در پرندگان ارائه شده است که از بین آنها می‌توان به فرضیه نامتقارن بودن فضای درون شکمی برای رشد یکسان بیضه‌ها و یا فرضیه رشد بیشتر یکی از بیضه‌ها برای جبران و تکمیل فعالیت‌های وابسته به تولیدمثل بیضه دیگر، اشاره نمود. این رشد جبرانی می‌تواند در سنین مختلف و بدون توجه به راست یا چپ بودن بیضه انجام شود که در نهایت سبب بهبود توانایی کلی بیضه‌ها در زمینه تولید اسپرم و هورمون‌های جنسی خواهد شد (Calhim & Birkhead, 2009).

#### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که از آغاز دوره بلوغ جنسی خروس‌های بومی فارس در پنج ماهگی تا سن هشت ماهگی یک روند افزایشی در فراوانی رونوشت ژن IGF-I در بیضه‌های این خروس‌ها مشاهده شد هم‌زمان وزن بیضه‌ها نیز در هفت و هشت ماهگی به بیشترین میزان خود رسید، در حالی که بیشینه تعداد سلول‌های سرتولی ولایدیگ در هر دو بیضه چپ و راست در هشت ماهگی مشاهده شد.

افزایش معنی دار تعداد سلول‌های سرتولی و لایدیگ در سن هشت ماهگی نسبت به سنین پنج، شش و هفت ماهگی همسو با افزایش معنی دار وزن بیضه در ماه‌های پایانی دوره بلوغ (هفت و هشت ماهگی) می‌باشد از نتایج جالب توجه در پژوهش حاضر با توجه به نتایج نسبت طول به عرض بیضه‌ها، روند متفاوت تغییرات اندازه بیضه‌های چپ و راست از سن پنج تا هشت ماهگی بود. به‌طور مثال با وجود عدم تغییر معنی‌دار وزن بیضه چپ بین سنین پنج و شش ماهگی نسبت طول به عرض بیضه چپ در سن شش ماهگی بیشتر از پنج ماهگی بود که نشان می‌دهد در سن شش ماهگی شکل بیضه نسبت به پنج ماهگی کشیده‌تر شده است و با افزایش وزن بیضه چپ در هفت ماهگی نسبت به شش ماهگی رشد بیضه در بخش عرضی نسبت به طولی بیشتر بود به‌طوری که نسبت طول به عرض بیضه در هفت ماهگی نسبت به شش ماهگی کاهش معنی‌داری داشت. روند تغییرات شکل و اندازه بیضه راست از سن پنج تا هشت ماهگی مشابه این تغییرات در بیضه چپ نبود بدین معنی که علی‌رغم افزایش معنی‌دار وزن بیضه راست در هفت و هشت ماهگی نسبت به پنج و شش ماهگی تغییری در نسبت طول به عرض بیضه راست در سنین هفت و هشت ماهگی نسبت به پنج و شش ماهگی مشاهده نشد،

#### REFERENCES

1. Abdulgabbar Ali, E., Zhandi, M., Towhidi, A., Zaghari, M. & Ansari, M. (2017). The effect of dietary Letrozole on plasma gonadotropin concentrations and some testicular histology parameters in 40 weeks old broiler breeder rooster. *Iranian Journal of Animal Science*, 48 (2), 175-183. (in Farsi)
2. Baker, J., Hardy, M. P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellvé, A. R. & Efstratiadis, A. (1996). Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. *Molecular Endocrinology*, 10 (7), 903-918.
3. Baker, P. J. & O'Shaughnessy, P. J. (2001). Role of gonadotrophins in regulating numbers of leydig and sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 122, 227-234.
4. Boitani, C., Stefani, M., Fragale, A. & Morena, A. R. (1995). Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. *Endocrinology*, 136, 5438-5444.
5. Calhim, S. & Birkhead, T. R. (2009). Intraspecific variation in testis asymmetry in birds: evidence for naturally occurring compensation. *Proceeding of the Royal Society B.*, 276, 2279-2284
6. Clemmons, D. R. & Underwood, L. E. (1991). Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annual Review of Nutrition*, 11 (1), 393-412.
7. Fu, Z., Kubo, T., Noguchi, T. & Kato, H. (2001). Developmental changes in the mRNA levels of IGF-I and its related genes in the reproductive organs of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Growth Hormone & IGF Research*, 11 (1), 24-33.
8. Fumel, B., Guerguin, M. J. L.G., Staub, C., Magistrini, M., Gauthier, C., Flamant, F., Guillou, F., & fouchecourt S. (2012). Thyroid hormone limits postnatal Sertoli cell proliferation in a defined peroliferation *in vivo* by activation of its alpha 1 isoform receptor (TR $\alpha$  1) present in these cells and by regulation Cdk4/ JunD/cmyc mRNA levels in mice. *Biology of Reproduction*, 87(16), 1-9.
9. González-Morán, M. G. & Soria-Castro, E. (2010). Histological and stereological studies on Leydig cells in the testes of *Gallus domesticus* from pre-hatching to sexual maturity. *Animal Reproduction Science*, 120 (1-4), 129-135.

10. Griffeth, R. J., Bianda, V. & Nef, S. (2014). The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic and Clinical Andrology*, 24(12), 1-10.
11. Gryzińska, M., Strachecka, A. & Krauze, M. (2011). Concentration of testosterone in blood serum in roosters of the Polbar breed depending on age. *Annales UMCS, Zootechnica*, 29 (4), 46-50.
12. Gunn, M. R., Champion, Z., Casey, M. E., Teal, P. & Casey, P. J. (2008). Testicular and spermatozoan parameters in the pukeko (*Porphyrio porphyrio melanotus*). *Animal Reproduction Science*, 109 (1-4), 330-342.
13. Hernandez, E. R., Resnick, C. E., Svoboda, M. E., Van Wyk, J. J., Payne, D. W. & Adashi, E. Y. (1988). Somatomedin-C, insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology*, 122 (4), 1603-1612.
14. Kempnaers, B., Peer, K., Vermeirssen, E. L. & Robertson, R. J. (2002). Testis size and asymmetry in the tree swallow: A test of the compensation hypothesis. *Avian Science*, 2, 115-122.
15. Kouatcho, F. D., Kenfack, A., Ngoula, F. & Tegui, A. (2015). Sexual maturity prediction based on hormonal profiles, testes and semen characteristics in male Coturnix quail (*Garsault, 1764*) in the Western Highlands of Cameroon. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 7 (4), 143-54.
16. Leao, R. A. C., Castro, F. L. S., Xavier, P. R., Vas, D. P., Grazia, J. G. V., Baiao, N. C. & Avelar, G. F. (2017). Comb, cloaca and feet scores and testis morphometry in male broiler breeders at two different ages. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootenica*, 69 (6), 1529-1538.
17. Ligon, J. D. (1997). A single functional testis as a unique proximate mechanism promoting sex-role reversal in coucals. *The Auk*, 114 (4), 800-801.
18. Lin, T., Wang, D., Calkins, J. H., Guo, H., Chi, R. & Housley, P. R. (1990). Regulation of insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 73 (2-3), 147-152.
19. Meamar, M. & Zamiri, M. J. (2005). Seasonal variation of semen characteristics of Fars native chickens. *Journal of Iran Agricultural Science*, 36(3), 581-590. (in Farsi)
20. Merilä, J. & Sheldon, B. C. (1999). Testis size variation in the greenfinch *Carduelis chloris*: relevance for some recent models of sexual selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 45 (2), 115-123.
21. Pitetti, J. L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou M. D., Aubry, F., Cederroth C. R., Urner, F., fumel, B., Crausaz, M., Docquier, M., Herrera, P. L., Pralong, F., Germond, M., Guillo, F., Jegou, B. & Nef, S. (2013). An essential role for insulin and IGF 1 receptors in regulating Sertoli cell proliferation, testis size and FSH action in mice. *Molecular Endocrinology*, 27, 814-827.
22. Sarabia Fragoso, J., Pizarro Diaz, M., Abad Moreno, J. C., Casanovas Infesta, P., Rodriguez-Bertos, A. & Barger, K. (2013). Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (Body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). *Reproduction in Domestic Animals*, 48 (2), 345-352.
23. Schams, D., Koll, R. & Li, C. H. (1988). Insulin-like growth factor-I stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture. *Journal of Endocrinology*, 116 (1), 97-100.
24. Shil, S. K., Quasem, A. & Rahman, M. L. (2015). Histological and morphometric analyses of testes of adult quail (*Coturnix coturnix japonica*) of Bangladesh. *International Journal of Morphology*, 33 (1), 100-104.
25. Vatsalya, V. & Kashmiri, L. A. (2012). Allometric growth of testes in relation to age, body weight and selected blood parameters in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *International Journal of Poultry Science*, 11(4), 251-258.
26. Weinzimer, S. A. & Cohen, P. (1999). *The IGF axis in the male reproductive system. In: The IGF system* (pp. 407-408.) Humana Totowa.
27. Werner, H. & LeRoith, D. (1996). The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Advances in Cancer Research*, 68, 183-223.
28. Wilson, F. D., Johnson, D. I., Magee, D. L. & Hoerr, F. J. (2018). Testicular histomorphometrics including Sertoli cell quantitation for evaluating hatchability and fertility issues in commercial breeder-broiler roosters. *Poultry Science*, 97, 1738-1747.
29. Zamiri, M. J. (2001). *Reproduction in poultry* (1<sup>st</sup> ed.). Shiraz University. (in Farsi)
30. Zamiri, M. J. (2012). *Reproductive physiology* (3<sup>th</sup> ed.). Hagh Shenash. (in Farsi)