دانشکده علوم

جلسه دفاع از پایان نامه دکتری

عنوان:

استفاده از فناوری های کمک باروری برای تولید مثل و حفاظت از گونه های آبزی با تاکید خاص بر نیوت خال‌زرد کوهستانی

***Neurergus derjugini* (Nesterov, 1916)**

ارائه‌دهنده: زینب طاهری خاص

زمان: ۱۴۰۴/۰۷/۳۰ ساعت ۱۰:۰۰

اینجانب زینب طاهری خاص، موفق به اخذ مدرک کارشناسی زیست شناسی عمومی در سال ۱۳۹۱ از دانشگاه رازی کرمانشاه و نیز مقطع کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی، گرایش بیوسیستماتیک جانوری در سال ۱۳۹۵ از دانشگاه رازی کرمانشاه شدم. و در حال حاضر دانشجوی مقطع دکتری بیوسیستماتیک جانوری از دانشگاه رازی کرمانشاه می باشم. اینجانب در زمینه تکوین، تولید مثل، بافت شناسی و لقاح مصنوعی در دوزیستان دارای مهارت می باشم. اینجانب در این سالها از محضر اساتید برجسته ای همچون دکتر مظفر شریفی، دکتر احمد قارزی و خانم دکتر سمیه ویسی بهره‌ها بردم.

ردیف	نام و نام خانوادگی	سمت
۱	دکتر احمد قارزی	استاد راهنمای اول
۲	دکتر سمیه ویسی	استاد راهنمای دوم
۳	دکتر پوریا دولتشاهی	استاد مشاور
٤	دکتر زهرا کلهری	استاد مشاور
٥	دکتر نصرالله رستگار پویانی	داور
٦	دکتر وحید اکملی	داور
۷	دکتر سیروس جلیلی (از دانشگاه علوم پزشکی)	داور خارجی
۸	دکتر محمدرضا غلامی (از دانشگاه علوم پزشکی)	داور خارجی
۹	دکتر نیز اسماعیل زاده	نماینده تحصیلات تکمیلی

چکیده :

حفاظت از دوزیستان در معرض انقراض از طریق تکثیر و تولیدمثل در شرایط اسارت، بعنوان یکی از رویکردهای مهم مورد توجه پژوهشگران امروزی است. نیوت خال‌زرد کوهستانی (*Neurergus derjugini*) از دوزیستان دم‌دار در معرض خطر است که جمعیت آن در طبیعت کاهش یافته و موفقیت تولیدمثلی آن در اسارت محدود است. فناوری‌های کمک‌باروری (ARTs) شامل هورمون‌درمانی، ذخیره‌سازی اسپرم و لقاح آزمایشگاهی، ابزارهایی بالقوه برای بهبود مدیریت حفاظت از این گونه به شمار می‌آیند. این پژوهش نخستین ارزیابی جامع از پروتکل‌های هورمونی با استفاده از hCG و LHRH همراه با ذخیره‌سازی اسپرم و لقاح آزمایشگاهی برای بهبود تولیدمثل در اسارت دوزیستان است. به منظور حفاظت از این گونه‌ی ارزشمند، ابتدا اهداف مطرح شده برروی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) و قورباغه مردابی (*Pelophylax ridibundus*) به عنوان گونه‌های مدل انجام شد. نتایج نشان داد تزریق هورمون همراه با دمای متوسط (22 °C) بهترین کیفیت تخمک‌گذاری، تحرک اسپرم و بقای لارو در گلدفیش را ایجاد کرد. در قورباغه مردابی، هورمون hCG اثری سریع‌تر و LHRH اثر ماندگارتری بر اسپرماسیون داشت. این یافته‌ها اهمیت کاربرد هورمون‌درمانی را در موفقیت تولیدمثلی گونه‌های در اسارت تأیید می‌کنند. در بخش اصلی مطالعه، نیوت‌ها از زیستگاه طبیعی جمع‌آوری، اسپرم آنها از نظر موفولوژی بررسی شد، همچنین ذخیره سازی کوتاه مدت اسپرم (در ۷ رقیق کننده و سه دما مختلف) و بلند مدت آن (۱۶ محلول محافظ انجماد) انجام گرفت. سپس در چهار فصل تولید مثلی (۲۰۲۲–۲۰۲۵) در آزمایشگاه تحت پروتکل‌های مختلف هورمونی قرار گرفتند. مطالعات مورفولوژی نشان داد سر اسپرم نسبتا بلند شامل ساختارهای متمایزی مانند خار آکروزومی، هسته و برآمدگی هسته‌ای است. دم بسیار بلند آن توسط غشای موج‌دار احاطه شده و حاوی یک آکسونم است که توسط غشای مواج همرا با رشته حاشیه‌ای به فیبر محوری متصل شده است. اسپرماتوفور نیز شامل کلاهک مخروطی پر از اسپرماتوزوئید روی یک ساقه کوتاه است. در بررسی محلول‌های ذخیره‌سازی، رقیق‌کننده Holtfreter ۱۰٪ برای نگهداری کوتاه‌مدت در هر سه دمای آزمایش‌شده بهینه بود و توانست تحرک اسپرم را تا ۱۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حفظ کند. برای نگهداری طولانی مدت اسپرم، محلول Holtfreters ۱۰٪ DMSO +٪ ۱۰به بهترین شکل، تحرک و مورفولوژی اسپرم را حفظ کرده و قطعه قطعه شدن DNA اسپرم را پس از ذوب به حداقل می‌رساند. در بخش هورمون درمانی تمامی ماده‌ها در ۱۵ تیمار مختلف تخم‌ریزی کردند، اما بیشترین تعداد تخم در پروتکل‌های چند مرحله‌ای و ترکیبی هورمون‌ها مشاهده شد. با این حال، در ۱۵ پروتکل اعمال شده برای نرها با وجود تورم کلوآک، اسپرماتوفور آزاد نکردند. بنابراین برای لقاح از اسپرم تازه نرهای صیدشده استفاده شد. در لقاح آزمایشگاهی اسپرم تازه بالاترین موفقیت در تفریخ (۸۷٪/۳۰) را به دست آورد و پس از آن نگهداری کوتاه مدت اسپرم در یخچال (۳ روز: ۸۳/۸۰٪ ؛ ۶ روز: ۶۳/۸۰٪) باعث تفریخ موفق شد. همچنین لقاح با اسپرم ذوب شده پس از ۷

روز میزان تفریخ (۹۸٪/۶۵٪) و در ۳۰ روز (۱۳٪/۳۸٪) را نشان داد، و در مجموع بیش از ۲۳۸۵ لارو زنده تولید و در طبیعت رها شدند. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد ارتقای فناوری‌های کمک باروری می‌تواند بر چالش‌های تولیدمثلی دوزیستان در اسارت غلبه کند. پیشرفت در ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت و انجماد اسپرم، به‌ویژه با استفاده از رقیق‌کننده‌ها و شرایط دمایی مناسب، ابزارهای کلیدی برای مدیریت ژنتیکی و حفاظت از گونه‌های در خطر فراهم می‌آورد. همچنین مطالعات مورفولوژی اسپرم تنوع ساختاری و عملکردی آن را که تحت تأثیر راهبردهای تولیدمثلی و شرایط محیطی است، برجسته می‌کند و می‌تواند به روشن‌تر شدن روابط فیلوژنتیکی سایر گونه‌ها کمک کند. دستاوردهای این مطالعه نه تنها پایه‌ای برای برنامه‌های پایدار تکثیر در اسارت، ایجاد بانک‌های ژنتیکی و بهبود راهبردهای رهاسازی مجدد *N.derjugini* به شمار می‌روند، بلکه به عنوان الگویی عملی برای استفاده از فناوری‌های نوین تولیدمثلی در سایر دوزیستان آسیب‌پذیر عمل کرده و می‌توانند گامی مهم در بهبود برنامه‌های جهانی حفاظت و معرفی مجدد باشند.

Abstract:

Conservation of endangered amphibians through captive breeding and reproduction is one of the important approaches currently emphasized by researchers. The yellow-spotted mountain newt (*Neurergus derjugini*), a threatened caudate amphibian, has undergone population decline in the wild and exhibits limited reproductive success in captivity. Assisted reproductive technologies (ARTs), including hormone therapy, sperm storage, and in vitro fertilization, represent potential tools for improving the conservation management of this species. This study provides the first comprehensive evaluation of hormonal protocols using hCG and LHRH, in combination with sperm storage and in vitro fertilization, to enhance captive reproduction in amphibians. To achieve conservation goals for this valuable species, preliminary experiments were conducted on goldfish (*Carassius auratus*) and the marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) as model species. The results showed that a moderate temperature (22 °C) combined with hormone administration yielded the best ovulation quality, sperm motility, and larval survival in goldfish. In the marsh frog, hCG induced a more rapid effect, while LHRH produced a longer-lasting impact on spermiation. These findings highlight the importance of hormone therapy in achieving reproductive success in captive species. In the main part of the study, newts were collected from their natural habitat, their sperm morphology was examined, and both short-term sperm storage (in seven diluents at three different temperatures) and long-term cryopreservation (in 16 cryoprotectant solutions) were evaluated. Subsequently, from 2022 to 2025, the animals were subjected to various hormonal protocols during four consecutive breeding seasons in the laboratory. Morphological investigations revealed that the sperm head is relatively elongated and includes distinct structures such as an acrosomal spine, nucleus, and nuclear protrusion. The very long tail is surrounded by an undulating membrane and contains an axoneme, which is attached to the axial fiber via the undulating membrane and a marginal fiber. The spermatophore consists of a conical cap filled with spermatozoa positioned on a short stalk. In the evaluation of storage solutions, 10% Holtfreter’s solution proved optimal for short-term storage at all three tested temperatures, maintaining sperm motility for up to 15 days at 4 °C. For long-term storage, Holtfreter’s solution with 10% DMSO provided the best preservation of sperm motility and morphology while minimizing DNA fragmentation after thawing. In the hormone therapy section, all females oviposited under 15 different treatments, with the highest egg numbers observed in multi-step and combined hormonal protocols. However, among the 15 hormonal protocols applied to males, although cloacal swelling was induced, spermatophore release did not occur. Therefore, fresh sperm from captured wild males was used for fertilization. In in vitro fertilization trials, fresh sperm achieved the highest hatching success (87.30%), followed

by refrigerated short-term storage (3 days: 83.80%; 6 days: 63.80%), which also produced successful hatching. Fertilization using thawed sperm yielded hatching rates of 65.98% after 7 days of storage and 38.13% after 30 days. Overall, more than 2,385 viable larvae were produced and subsequently released into the wild. The findings of this research demonstrate that advancements in ARTs can overcome reproductive challenges faced by amphibians in captivity. Progress in short-term storage and cryopreservation of sperm, particularly through the use of optimized diluents and temperature conditions, provides key tools for genetic management and conservation of threatened species. Moreover, sperm morphological studies highlighted structural and functional diversity influenced by reproductive strategies and environmental conditions, which may also contribute to clarifying phylogenetic relationships among other species. The outcomes of this study not only establish a foundation for sustainable captive breeding programs, genetic banking, and improved reintroduction strategies for *N. derjugini*, but also serve as a practical model for applying advanced reproductive technologies to other vulnerable amphibians. Ultimately, they represent a significant step toward enhancing global efforts in conservation and captive-based reintroduction programs.