مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال هشتم، شماره چهارم، پیاپی سی و دوم، بهار ۱۳۹۹ (۳۱-۲۱)

بررسی اثرات علف‌کش رانداپ بر شاخص گنادی و تغییرات هیستوپاتولوژی آبشش و بیضه ماهی کپور معمولی نر (*Cyprinus carpio*)

الهام مدنی[۱]، اعظم مشفق[۲]، محبوبه سترکی[۳]، اکرم تهرانی فرد[٤*]
۱. کارشناس ارشد، گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران
٤. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۱٦)

چکیده
علف‌کش‌ها بر پایه گلایفوسیت برای انسان بی‌ضرر است ولی استفاده گسترده آن‌ها در زمین‌های کشاورزی و آلودگی سیستم‌های آبی سبب ایجاد نگرانی‌هایی درباره سمیت آن شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات رانداپ بر وزن، شاخص گنادوسوماتیک (GSI)، تغییرات هیستوپاتولوژی آبشش و بیضه ماهی کپور معمولی بود. ۳۲ عدد ماهی کپور معمولی مولد (۱۰۳/۷۲ ±۱۷۲۳/۷۵ گرم) به‌صورت تصادفی در ٤ گروه هر کدام با ۸ عدد ماهی قرار گرفتند. یک گروه (کنترل) بدون مواجهه با علف‌کش بود و ۳ گروه (تیمار) در معرض آفت‌کش رانداپ در ٤ غلظت (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌مدت ۱۰ روز قرار گرفتند. پس از دوره تیمار، طول و وزن و شاخص GSI تعیین شد و نمونه بافت آبشش و بیضه جهت بررسی‌های بافت‌شناسی تهیه شد. بر اساس نتایج مواجهه توسط دوز ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر رانداپ سبب کاهش معنی‌دار وزن در روز دهم و شاخص GSI در روزهای پنجم و دهم شد (P<۰/۰۵). در ماهی‌های مواجه‌شده با رانداپ (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) نکروز و بهم ریختن ساختار تیغه‌های آبششی، چسبیدن تیغه‌های آبششی به یکدیگر، جدا شدن غشای پایه و پاره‌شدن اپیتلیوم آبششی و بیرون ریختن سلول‌های خونی مشاهده شد. در بیضه ماهی‌های مواجه‌شده با دوز بالای گلایفوسیت افزایش تعداد اسپرماتوگونی به‌دلیل کاهش اسپرماتوژنز، تخریب اسپرماتوسیت‌ها، کاهش اسپرماتوزوا، کاهش قطر لوله‌های اسپرمی، از بین رفتن مجاری بینابینی و تخریب سلول‌های سرتولی در مشاهده شد. غلظت‌های تحت کشنده رانداپ اثرات سمی بر ساختار آبشش و عملکرد تولید مثلی ماهی کپور معمولی نر مولد دارد.

واژه‌های کلیدی: آبشش کپور معمولی، بیضه، سمیت، گلایفوسیت.

Effects of roundup pesticides on gonadosomatic index and histopathological changes in gill and testis of common carp (*Cyprinus carpio*)

Elham Madani[1], Azam Moshfegh[2], Mahbubeh Setorki[3], Akram Tehranifard[2]*
1. M. A., Department of Marin Biology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
(Received: Oct. 27, 2018 - Accepted: May 5, 2020)

Abstract
Glyphosate based pesticides are safe for humans, but their widespread use in agricultural areas and water contamination raised serious concerns about its toxicity. The aim of this study was to investigate the effects of different doses of roundup on body weight, gonadosomatic index (GSI) and histological alterations of gill and testis in common carp. 32 common carp broodstock (1723.75 ± 72.72gr) were randomly divided into 4 groups of 8 fish. . One group (control) had no exposure to herbicide and 3 groups (treatment) were exposed to roundup pesticide at 4 concentrations (5, 10 and 15 mg/L) for 10 days. After treatment period, body length, body weight and GSI index were determined and gill and testis samples were prepared for histological studies. Based on the results, exposure to roundup at a dose of 20 mg/L caused a significant decrease in body weight on the10th day and GSI index on the 5th and 10th day ($p<0.05$). In fishes exposed to roundup (20mg/L) necrosis and disintegration of gill lamellae structure, adhesions of gill lamellae, separation of basement membrane and damage of gill epithelium and exudation of blood cells were observed. In the testis of fish exposed to the highest dose of roundup, an increase in the number of spermatogonium due to reduced spermatogenesis, degradation of spermatocyte, reduction of spermatozoa, reduction of sperm storage tubules diameter and destruction of interstitial duct and sertoli cells were observed. The results indicated destructive effects of sublethal doses of roundup on gill structure and reproductive performance of common carp.

Keywords: Common carp, Gill, Glyphosate, Testis, toxicity.

* نویسندهٔ مسئول: اکرم تهرانی‌فرد
Email: akram.tehranifard@gmail.com

مقدمه

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) جزو ماهیان آب شیرین است که از نظر اقتصادی ارزش بالایی داشته و به‌طور گسترده در ایران پرورش داده می‌شود (Mashoufi & Khayati, 2007). این ماهی در ابتدای زندگی به‌طور عمده از زی‌شناوران جانوری (زئوپلانکتون‌ها) تغذیه می‌کند و سپس به تغذیه اصلی یعنی تغذیه از کفزیان می‌پردازد. در استخرهای پرورشی، به‌دلیل تراکم زیاد ماهی در استخر، غذای طبیعی جواب‌گوی نیازهای این ماهی نمی‌باشند و غذاهای دستی نیز جهت تغذیه آن استفاده می‌شود. این ماهی به ماه‌های سرد زمستان سازگاری بالایی دارد و طی ماه‌های گرم سال به سرعت رشد می‌کند. در پرورش کپور معمولی از دو روش تک کشتی و روش کشت توأم همراه با سایر گونه‌های کپور ماهیان استفاده می‌شود (Narayanan & Vinodhini, 2008).

در استان‌های شمالی ایران، استخرهای پرورش ماهی کپور در داخل یا نزدیک مناطق کشاورزی واقع شده‌اند و اغلب توسط آبی تغذیه می‌شوند که ممکن است از مزارع کشاورزی عبور کرده باشد، بنابراین، محیطی که در آن ماهی کپور معمولی پرورش می‌شود، می‌تواند به‌طور مداوم با مواد شیمیای خارجی ناشی فعالیت‌های کشاورزی آلوده شود (Rahmanikhah *et al*., 2010). آلودگی آب بوسیله آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها ممکن مانع از بهره‌وری مناسب گردد، در واقع، کاهش کیفیت آب در ارتباط با مدیریت ضعیف و شرایط تنش‌زا علت اصلی مرگ و میر و کاهش بهره‌وری در بسیاری از مزارع پرورش ماهی کپور است (Narayanan & Vinodhini, 2008). آزمون‌های آزمایشگاهی کلاسیک جهت ارزیابی سمیت اکوسیستم بر اساس قدرت بقا، رشد و تکثیر اجزای آن است. ترکیبات شیمیایی از قبیل علف‌کش‌ها ممکن است موجب آسیب به انواع موجودات اکوسیستم از جمله ماهی‌ها شوند (Cassault-Meyer *et al*., 2014). انواع مختلفی از علف‌کش‌ها در کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند و گلایفوسیت (Glyphosate) که با نام تجاری رانداپ شناخته می‌شود، یکی از آن‌ها می‌باشد. رانداپ یک علف‌کش سیستمیک و غیرانتخابی (عمومی) است که پس از سبز شدن علف هرز (Post-emergence) استفاده می‌شود. این ویژگی‌ها سبب استفاده گسترده رانداپ برای کنترل گیاهان هرز (نازک برگ و پهن‌برگ) یکساله و چندساله در باغات و زمین‌های زراعی و غیر زراعی شده است (de Liz Oliveira Cavalli *et al*., 2013). استفاده بی‌توجه و زیاد از این علف‌کش سبب حمل نادرست، ریختن تصادفی به منابع آب و دفع پساب‌های آلوده به آبراه‌های طبیعی شده است که ممکن است اثرات زیان‌باری بر زندگی آبزیان داشته باشد و سبب آثار بیولوژیکی درازمدت گردد (Cassault-Meyer *et al*., 2014). در یک بررسی اخیر، غلظت رانداپ در آب‌های طبیعی بین ۰/۰۱ تا ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر برآورد شد که در شرایط حاد به‌دنبال ورود مستقیم آن به آب به ۱/۷ میلی‌گرم در لیتر نیز می‌رسد (Guilherme *et al*., 2010).

هرچند تصور کلی بر این است که علف‌کش‌ها با پایه گلایفوسیت برای انسان ایمن هستند ولی آلودگی سیستم‌های آبی به‌دلیل استفاده گسترده و بی‌قید و شرط از این مواد شیمیایی سبب ایجاد نگرانی‌هایی در این رابطه شده است (de Liz Oliveira Cavalli *et al*., 2013). مطالعات توکسیکولوژی برخی از آثار زیان‌بار این علف‌کش را بر رشد، بقا، پارامترهای هماتولوژیک، عملکرد تولیدمثلی و هیستولوژی ارگان‌های مختلف جانوران آبزی نشان داده‌اند (Yusof *et al*., 2014; Lugowska, 2018; Harayashiki *et al*., 2013; Nešković *et al*., 1996). در مطالعه صورت گرفته بر روی ماهی مولی کاهش کیفیت، تحرک و بقای اسپرم به دنبال مواجهه توسط رانداپ مشاهده شد (Harayashiki *et al*.,

2013). مطالعه بر روی ماهی کپور معمولی جنس ماده نشان داد که مواجهه توسط غلظت‌های تحت‌کشنده رانداپ می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی تورم تخمک، بقای جنین و کیفیت لارو ماهی را کاهش دهد (Lugowska, 2018). با توجه به این‌که تاکنون سمیت رانداپ در ماهی کپور نر ارزیابی نشده است، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تأثیر غلظت‌های تحت کشنده علف‌کش رانداپ بر ساختار بافتی آبشش و بیضه ماهی کپور معمولی نر طراحی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی، گروه‌بندی و تیمار ماهی‌ها

۳۲ عدد ماهی کپور معمولی (۱۰۳/۷۲±۱۷۲۳/۷۵ گرم) از یک مزرعه خصوصی واقع در استان گیلان خریداری شدند و توسط ماشین حمل ماهی با شرایط مناسب به ایستگاه تحقیقاتی دکتر کیوان انتقال داده شدند. جهت جلوگیری از نشر هر گونه بیماری قارچی به مرکز، ماهی‌ها درون وان مجزا به همراه نمک در فواصل زمانی کوتاه ضدعفونی شدند. پس از انتقال ۸ ماهی به‌طور تصادفی در ۴ مخزن پلاستیکی (۵۰۰ لیتری) مجهز به هواده با تعویض روزانه ۴۰ درصدی آب توزیع گردیدند. پیش از شیروع آزمایش ماهی‌ها به‌مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی (دمای آب ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی: ۱۰ ساعت تاریکی، اکسیژن ۱±۷ میلی‌گرم در لیتر، ۰/۲±۸/۶۰ =pH) سازگار شدند. در طی دوره سازگاری ماهی‌ها با جیره کپور به‌صورت دو بار در روز معادل ۳ درصد وزن بدن تغذیه شدند.

پس از آداپتاسیون گروه‌های تیمار در معرض آفت‌کش گلایفوسیت (Roundup®WG) در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر (غلظت تجاری) قرار گرفتند. محلول رانداپ در آب مقطر تهیه شد و روزانه به مخازن پرورش ماهی اضافه شد. غلظت‌های استفاده‌شده از سم رانداپ به‌ترتیب ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از LC50 گزارش شده توسط سم رانداپ برای ماهی کپور (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود (Helfrich *et al*., 2009). برای جلوگیری از اثرات زیانبار رانداپ در آب‌های طبیعی، آب استفاده‌شده در هر مخزن حداقل به‌مدت ۳۰ روز در یک استخر مجزا و غیر قابل نفوذ برای تبخیر و تجزیه رانداپ باقی ماند و پس از آن وارد خاک شد (Cassault-Meyer *et al*., 2014). در روزهای پنجم و دهم، ماهی‌ها به‌صورت مجزا در محلول گل میخک تحت بی‌هوشی قرار گرفتند و وزن و طول آن‌ها اندازه‌گیری شد. پس از تعیین طول کل و وزن، نمونه گناد و آبشش ماهی‌ها برای بررسی‌های بافت‌شناسی خارج شد. وزن گناد ماهی توسط ترازوی دیجیتال جهت تعیین شاخص گنادوسوماتیک تعیین گردید.

تعیین شاخص گنادوسوماتیک (GSI)

در این تحقیق درصد شاخص گنادوسوماتیک (GSI) براساس رابطه (۱) برای هر ماهی محاسبه گردید. که در آن WG وزن گناد (گرم) و BW وزن کل بدن ماهی (گرم) است (Cassault-Meyer *et al*., 2014).

$$GSI = WG/BW \times 100$$ رابطه (۱)

بررسی‌های بافت شناسی کلاسیک

بافت بیضه و آبشش ماهی‌ها در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و در پارافین قالب‌گیری شد. برش‌های ۳–۵ میکرومتری روی لام‌های شیشه‌ای مستقر و سپس پارافین‌زدایی و آب‌دهی مجدد شدند. لام‌های توسط هماتوکسیلین و ائوزین (E&H) به منظور بررسی میکروسکوپی رنگ‌آمیزی شدند. سپس لام‌های تهیه‌شده از نظر هیستوپاتولوژی، در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. نحوه نمره‌دهی به آسیب‌های بافتی بر این اساس بود. –) بافت سالم و طبیعی بوده و تغییری مشاهده نمی‌شود، +) تغییرات بافتی اندک و قابل ترمیم می‌باشد به‌طوریکه بافت با بهتر شدن شرایط ترمیم می‌شود، ++) تغییرات بافتی بیشتر از مرحله قبل بوده و برگشت‌پذیر است ولی اگر وسعت زیادی از بافت آسیب

دیده باشد و یا شرایط محیطی آلوده بهبود نیابد، تغییرات پایداری ایجاد می‌شود. +++) شامل آسیب‌هایی که بهبود آن‌ها حتی درصورتی‌که شرایط محیطی بهتر شود امکان‌پذیر نیست.

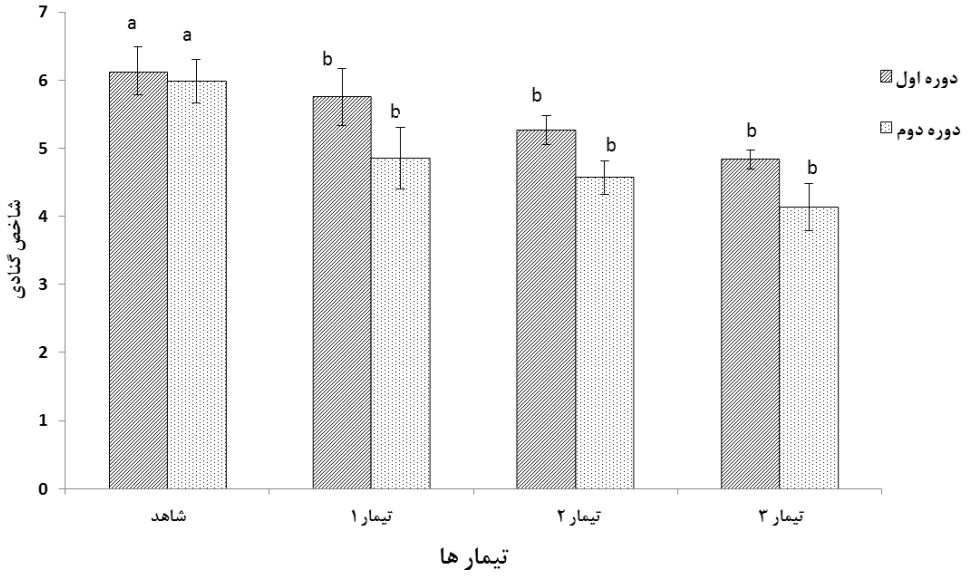
روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. به این منظور، ابتدا از نرمال بودن یا نبودن داده‌ها به‌وسیله آزمون کولموگروف–اسمیرنف اطمینان حاصل شد. درصورت نرمال بودن داده‌ها از آزمون‌های پارامتریک one way ANOVA به دنبال آن آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

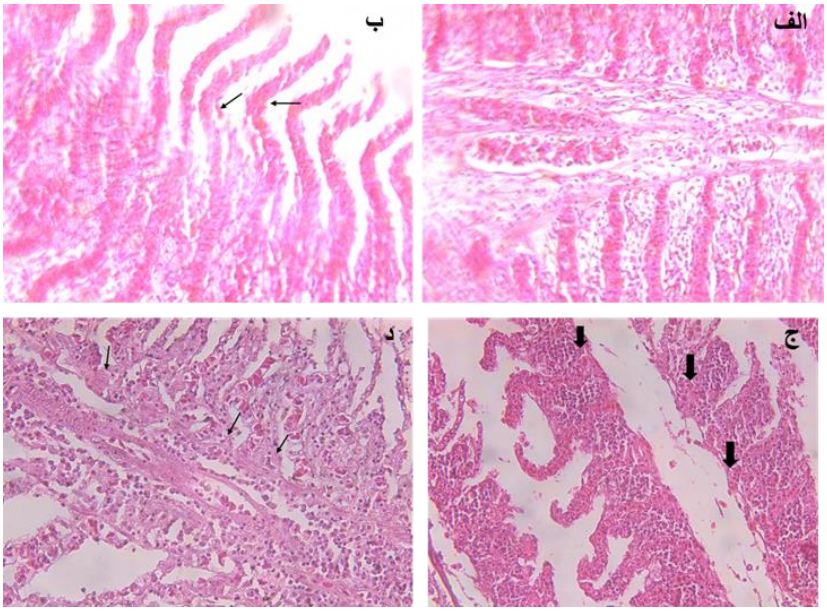
نتایج

میانگین وزن ماهی‌ها در روز پنجم تیمار در گروه‌های تحت مطالعه تفاوت معنی‌داری با یک‌دیگر نداشت. در روز دهم میانگین وزن گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه مواجه‌شده با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آفتکش بود (P<۰/۰۵) ولی با گروه‌های مواجه‌شده با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آفتکش تفاوت معنی‌داری نداشت. طول کل ماهی‌ها در گروه‌های مختلف در روزهای پنجم و دهم تیمار تفاوت معنی‌داری با یک‌دیگر نداشت. میانگین شاخص گنادوسوماتیک در روز پنجم و دهم در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های مواجه‌شده با دوز ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آفتکش بود (P<۰/۰۵، شکل ۱).

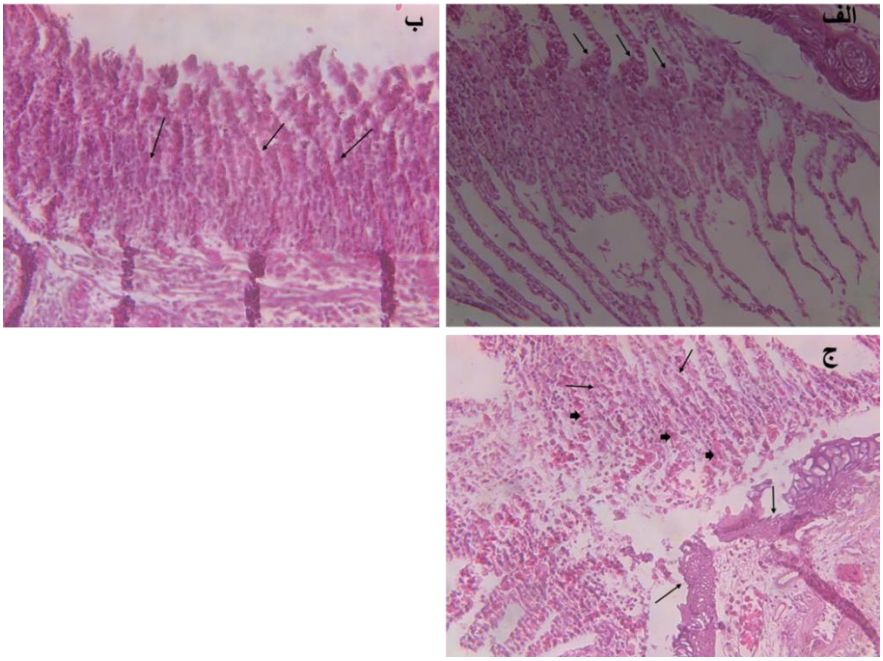
در شکل‌های ۲ و ۳ مقاطع بافتی آبشش مربوط به گروه‌های مختلف مورد مطالعه در روز دهم نشان داده شده است. بافت آبشش گروه شاهد کاملا طبیعی بود و هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد (شکل ۲– الف). در گروه تیمار اول آسیب جزئی اپیتلیوم لاملاهای ثانویه (شکل ۲– ب) و در گروه تیمار دوم تکثیر سلول‌های کلراید (شکل ۲– ج) و هیپرپلازی اپیتلیوم (شکل ۲– د) مشاهده شد. در گروه تیمار سوم پاره‌شدن مویرگ‌های خونی در لاملای ثانویه (شکل ۳– الف)، نکروز شدید و بهم ریختن ساختار تیغه‌های آبششی (شکل ۳– ب) و چسبیدن تیغه‌های آبششی به یکدیگر و جدا شدن غشای پایه و پاره‌شدن اپیتلیوم آبششی (شکل ۴– ج، فلش نازک) و بیرون ریختن سلول‌های خونی (شکل ۴– ج، فلش کوتاه و پهن) مشاهده شد. در جدول ۱ میزان آسیب بافت آبشش در گروه‌های مختلف نشان داده شده است.



شکل ۱. نتایج میانگین و انحراف معیار شاخص گنادوسوماتیک در زمان‌های ۵ و ۱۰ روز در گروه‌های مختلف. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵.



شکل ۲. بافت آبشش ماهی کپور معمولی در گروه شاهد (الف)، گروه تیمار اول (ب) وگروه تیمار دوم (ج، د). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (E&H)، بزرگ‌نمایی ×۴۰۰



شکل ۳. بافت آبشش ماهی کپور معمولی در گروه تیمار سوم (الف، ب، ج). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (E&H)، بزرگ‌نمایی ×۴۰۰

جدول ۱. مقایسه نمره آسیب‌های بافتی آبشش درگروه‌های مورد مطالعه

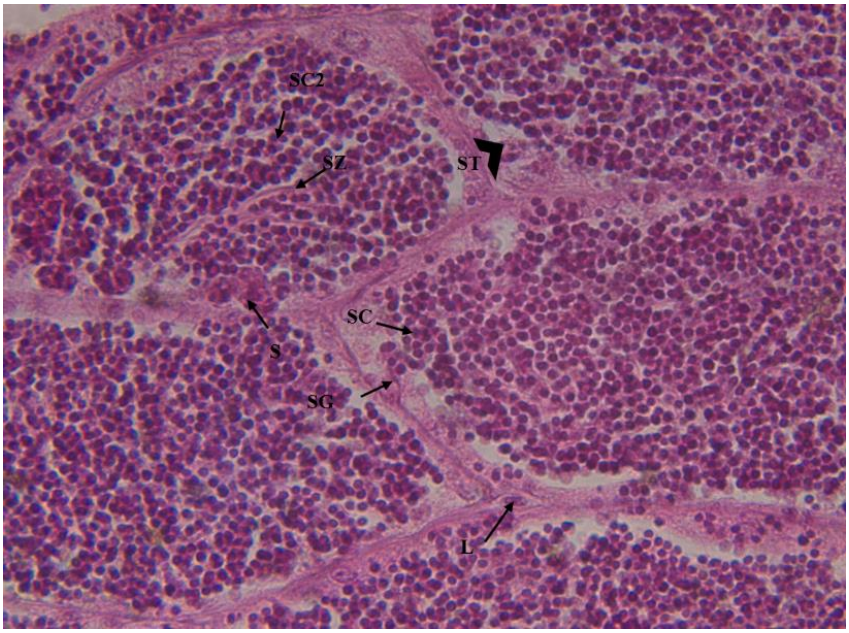
گروه‌های مورد مطالعه	نمره
گروه شاهد	۰
تیمار اول	+
تیمار دوم	++
تیمار سوم	+++

نتایج مربوط به بررسی‌های بافت‌شناسی بیضه ماهی‌ها در گروه‌های مختلف در روز پنجم و دهم در شکل‌های ۴ تا ۷ نشان داد شده است. در گروه شاهد در روزهای پنجم و دهم بافت بیضه کاملاً طبیعی بوده و هیچ‌گونه ضایعه‌ای مشاهده نشد. در گروه تیمار اول تخریب و اضمحلال سلولی در اسپرماتوگونی‌ها، از هم

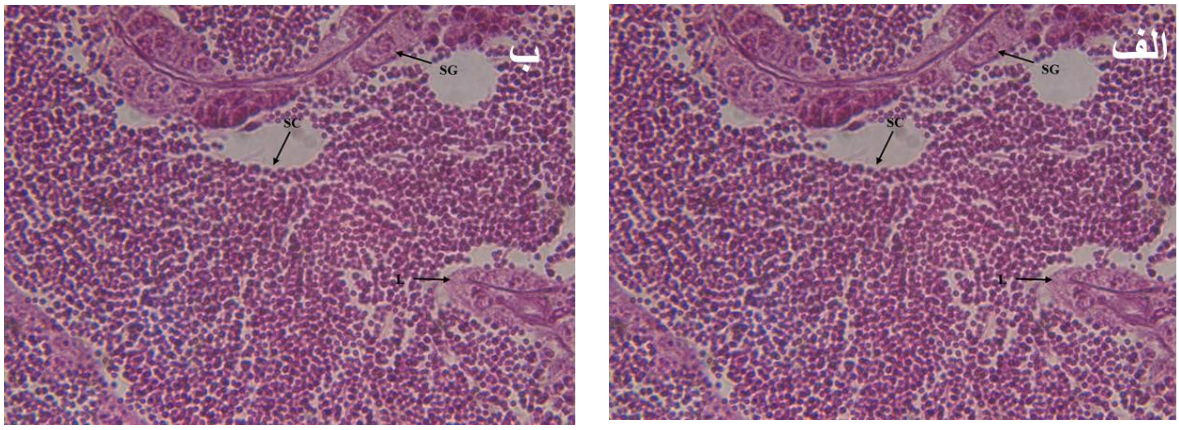
گسیختگی ساختار لوبولی، نکروز و کاهش تعداد اسپرماتوسیت‌ها در روز پنجم (الف)، کاهش قطر دیواره لوبولی و تخریب سلول‌های لیدیگ در بافت بینابینی در روز دهم (ب) مشاهده شد. در گروه تیمار دوم افزایش تعداد اسپرماتوگونیای اولیه به‌دلیل کاهش اسپرماتوژنز، کاهش تعداد اسپرماتوسیت اولیه و کاهش تعداد اسپرماتوزوا در روز پنجم (الف)، افزایش تعداد اسپرماتوگونیای اولیه به‌دلیل کاهش اسپرماتوژنز، کاهش تعداد اسپرماتوسیت اولیه و ناحیه نکروز شده محتوی سلول‌های زایای سن ستیال در روز دهم (دوره دوم) مشاهده شد. در گروه تیمار سوم افزایش تعداد اسپرماتوگونی نسبت به شاهد به‌دلیل کاهش اسپرماتوژنز و کاهش قطر لوله‌های اسپرمی و از بین رفتن مجاری بینابینی در روز پنجم (الف) و تخریب سلول‌های جنسی خصوصا در اسپرماتوسیت‌های اولیه و کاهش شدید اسپرماتوزوآ و تخریب سلول‌های سرتولی در روز دهم (ب) مشاهده شد. مقایسه نمره آسیب‌های بافتی بیضه در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. مقایسه نمره آسیب‌های بافتی بیضه در گروه‌های مورد مطالعه

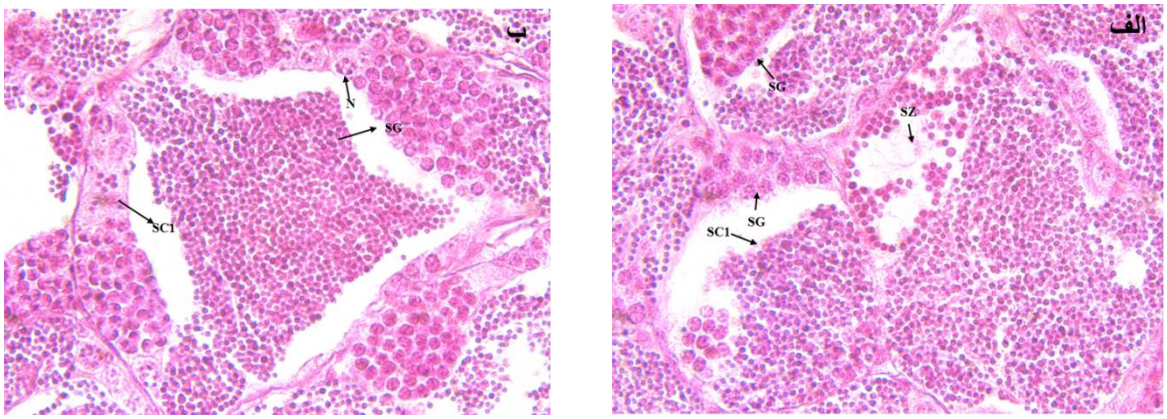
تغییرات بافتی	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم
کاهش ضخامت دیواره بیضه	–	+	++	+++
افزایش ناحیه بین لبول‌ها	–	+	++	+++
تخریب اسپرماتوگونیاها	–	+	++	+++
تخریب سلول‌های لیدیگ	–	–	+	++
کاهش اسپراتوزواها	–	+	++	+++
تخریب بافت بینابینی	–	–	+	+++
تخریب اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه	–	–	+	++
افزایش خوشه‌ای شدن اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه	–	–	+	+++



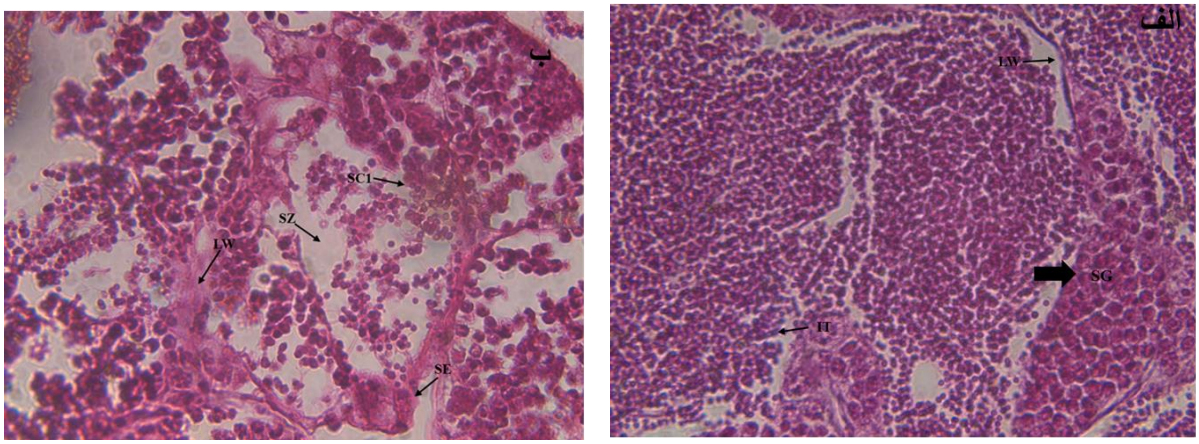
شکل ٤. بافت بیضه ماهی کپور معمولی در گروه شاهد، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (E&H)، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰، ST (توبول سمینی فروس)، SG (اسپرماتوگونیا)، SC (اسپرماتوسیت اولیه)، SC2 (اسپرماتوسیت ثانویه)، SZ (اسپرماتوزوا)، L (سلول‌های لیدیگ)، s (سلول‌های سرتولی)، N (سلول‌های زایای سن ستیال)، WL (لوله‌های اسپرمی) و LT مجاری بینابینی).



شکل ۵. بافت بیضه ماهی کپور معمولی در گروه تیمار اول، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (E&H)، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰، ST (توبول سمینی فروس)، SG (اسپرماتوگونیا)، SC (اسپرماتوسیت اولیه)، SC2 (اسپرماتوسیت ثانویه)، SZ (اسپرماتوزوا)، L (سلول‌های لیدیگ)، S (سلول‌های سرتولی)، N (سلول‌های زایای سن ستیال)، WL (لوله‌های اسپرمی) و LT مجاری بینابینی).



شکل ٦. بافت بیضه ماهی کپور معمولی در گروه تیمار دوم، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (E&H)، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰، ST (توبول سمینی فروس)، SG (اسپرماتوگونیا)، SC (اسپرماتوسیت اولیه)، SC2 (اسپرماتوسیت ثانویه)، SZ (اسپرماتوزوا)، L (سلول‌های لیدیگ)، S (سلول‌های سرتولی)، N (سلول‌های زایای سن ستیال)، WL (لوله‌های اسپرمی) و LT مجاری بینابینی).



شکل ۷. بافت بیضه ماهی کپور معمولی در گروه تیمار سوم، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (E&H)، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰، ST (توبول سمینی فروس)، SG (اسپرماتوگونیا)، SC (اسپرماتوسیت اولیه)، SC2 (اسپرماتوسیت ثانویه)، SZ (اسپرماتوزوا)، L (سلول‌های لیدیگ)، S (سلول‌های سرتولی)، N (سلول‌های زایای سن ستیال)، WL (لوله‌های اسپرمی) و LT مجاری بینابینی).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تیمار ماهی کپور معمولی با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر علف‌کش رانداپ با کاهش معنی‌دار وزن و شاخص گنادوسوماتیک همراه بود ولی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تغییر معنی‌داری در وزن و شاخص گنادوسوماتیک مشاهده نشد. در ماهی‌های مواجه‌شده با علف‌کش افزایش تعداد اسپرماتوگونیای اولیه به‌دلیل کاهش اسپرماتوژنز، نکروز و کاهش تعداد اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتوزوا، نکروز سلول‌های زایای سن‌ستیال، سلول‌های لیدیگ و سلول‌های سرتولی، از هم گسیختگی ساختار لوبولی و ازبین‌رفتن مجاری بینابینی مشاهده شد که این تغییرات در غلظت‌های بالا مشهودتر بودند. همراستا با نتایج حاضر در مطالعه Mohaghegh *et al.* (2013) مواجهه ماهی قزل‌آلای نر توسط غلظت ۷۵ درصد رانداپ سبب کاهش اسپرماتوژنز و تولید اسپرماتوزوآ شد. در ماهی‌های مواجه‌شده با غلظت‌های ۵۰ و ۲۵ درصد ترتیب قرار گرفتن لوبول‌ها نامنظم شده و در محتویات لوله‌ها اسپرماتوگونی‌ها کمتر و پراکنده‌تر بود. اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه، نیز به‌صورت خوشه‌ای دیده شدند. در ماهی‌های قزل‌آلای مواجه شده با رانداپ کاهش شاخص گنادوسوماتیک مشاهده شد که همسو با یافته‌های حاضر است. Lasheidani *et al.* (2008) در ماهی سفید دریای خزر کاهش شاخص گنادوسوماتیک، کاهش غلظت هورمون تستوسترون، اختلال در فرایند اسپرماتوژنز و تغییرات بافتی بیضه را به دنبال مواجه با رانداپ گزارش کردند. در ماهی گوپی مواجه‌شده با رانداپ کاهش کیفیت اسپرم به‌صورت کاهش یکپارچگی غشای پلاسمایی، اختلال عملکرد میتوکندری، کاهش یکپارچگی DNA، کاهش تحرک و دوره تحرک اسپرم و همچنین کاهش تراکم اسپرم مشاهده شده است (Harayashiki *et al*., 2013).

مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که رانداپ در دوز غیرسمی (۱ میلی‌گرم بر لیتر) سبب اختلال اندوکراین به‌صورت کاهش ۳۵ درصدی سطوح هورمون تستوسترون و در دوز بالا سبب آسیب و مرگ سلول‌های لیدیگ و سرتولی موش صحرایی در ساعات اولیه پس از مواجهه می‌شود (Clair *et al*., 2012). در موش‌های مواجه‌شده توسط رانداپ اختلال عملکرد تولید مثلی شامل به‌هم‌خوردن تعادل آندروژن/ استروژن و اختلال در هیستولوژی بیضه مشاهده شده است (Romano_{a} *et al*., 2010; Romano_{b} *et al*., 2012). در خرگوش‌های نیوزیلندی نیز مشاهده شده است که تیمار توسط غلظت‌های تحت کشنده رانداپ سبب کاهش وزن بدن و تغییرات پارامترهای کیفیت و کمیت اسپرم می‌شود (Yousef *et al*., 1995). علاوه بر این، گزارش شده است که بیان پروتئین حقیقی حاد استروئیدوژنز (StAR) در سلول‌های لیدیگ به‌دنبال مواجهه توسط رانداپ افزایش می‌یابد که در نهایت منجر به کاهش استروئیدوژنز می‌شود (Richard *et al*., 2005). رانداپ به‌عنوان یک عامل خارجی در فرایند تولید، ترشح، انتقال، متابولیسم، اتصال، عمل و حذف هورمون‌های طبیعی مسئول تنظیم فرایندهای تولید مثل اختلال ایجاد می‌کند. کاهش فعالیت آروماتاز در سلول‌های جفت و جنین مواجه‌شده با غلظت‌های مختلف رانداپ مشاهده شده است که سبب اختلال در فرایند تبدیل استروئیدها به استرادیول شده است (Walsh *et al*., 2000). در سلول‌های لیدیگ نیز مواجهه با رانداپ سبب افزایش فعالیت آروماتاز و در نهایت کاهش استروئیدوژنز می‌شود (Walsh *et al*., 2000). Cavalli *et al.* (2013) مشاهده کردند که باروری در موش‌های صحرایی به‌دنبال مواجهه توسط رانداپ کاهش می‌یابد که به‌علت مرگ سلول‌های سرتولی است که جهت حفظ فرآیند اسپرماتوژنز ضروری هستند. پژوهش‌گران گزارش کردند که رانداپ از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو، افزایش غلظت‌های داخل سلولی یون کلسیم و اختلال در مسیرهای سیگنالینگ سلولی منجر به مرگ سلول‌های سرتولی در بیضه‌های موش صحرایی می‌شود (Cavalli *et al*., 2013). این آفت‌کش‌ها از طریق بازکردن کانال کلسیمی وابسته به

ولتاژ نوع L و همچنین گیرنده‌های اینوزیتول تری‌فسفات (IP3) و رایانودینی (Ryanodine) شبکه آندوپلاسمی منجر به افزایش غلظت Ca^{2+} درون سلولی و در نهایت منجر به پیشرفت استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی می‌شود. فعال‌سازی پروتئین کیناز C، فسفاتیدیلینواستیل ۳-کیناز (PI3K) و پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن (MAPK) همانند ERK1/2 و p38MAPK نقش مهمی در ورود یون Ca^{2+} و مرگ سلولی دارند. در بیضه موش‌های در معرض رانداپ افزایش مالون‌دی‌آلدهید و پروتئین کربونیل به‌عنوان شاخص اکسیداسیون پروتئین‌ها و چربی‌ها و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مشاهده می‌شود که حاکی از وقوع استرس اکسیداتیو می‌باشد (Cavalli *et al*., 2013). استرس اکسیداتیو بازتاب‌دهنده عدم تعادل میان تظاهرات سیستماتیک گونه‌های فعال واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) و توانایی یک سیستم زیستی در خنثی‌سازی و مهار میانجی‌های سمی آن یا ترمیم آسیب‌های وارده است. در این وضعیت است که اثرات مخرب اکسیدان‌ها از جمله ایجاد مرگ سلولی در سلول‌های سالم، افزایش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی، تخریب اکسیداتیو DNA، فعال شدن برخی ژن‌ها، غیرفعال شدن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، اکسیدکردن قندها و چربی‌ها به‌خصوص اسیدهای چرب غیراشباع و لیپوپروتئین‌های غشای سلولی مشاهده می‌شود (Badade *et al*., 2011). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که بین شرایط استرس اکسیداتیو در مایع منی و نقص عملکرد اسپرماتوزوآ و مورفولوژی غیرنرمال رابطه مستقیمی وجود دارد (Shiva *et al*., 2011). افزایش تولید ROS باعث القای پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرماتوزوآ می‌شود که دو اثر مهم شامل کاهش توانایی ترکیب اسپرم و تخمک و افزایش توانایی آن برای اتصال به ناحیه شفاف (zona pellucida) را به‌دنبال دارد و به‌دنبال استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی این اختلالات برطرف می‌گردد (Badade *et al*., 2011).

در مطالعه حاضر در ماهی‌های مواجه‌شده با دوز پایین رانداپ (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) آسیب جزئی اپیتلیوم لاملاهای ثانویه، سلول‌های کلراید و هیپر پلازی اپیتلیوم مشاهده شد و در گروه تحت‌تیمار با دوز بالای رانداپ پاره شدن مویرگ‌های خونی در لاملای ثانویه، نکروز شدید و به‌هم‌ریختن ساختار تیغه‌های آبششی و چسبیدن تیغه‌های آبششی به یکدیگر، جدا شدن غشای پایه و پاره‌شدن اپیتلیوم آبششی و بیرون‌ریختن سلول‌های خونی مشاهده شد. این یافته‌های با نتایج Jiraungkoorskul *et al*. (2002) در رابطه با اثرات مخرب رانداپ بر ساختار بافت آبشش ماهی تیلاپیا که تغییرات بافتی شدید به‌صورت افزایش نکروز و هیپرپلازی را گزارش کردند همسو است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه ماهی کپور معمولی توسط علف‌کش رانداپ در دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش شاخص گنادوسوماتیک، تأخیر در رسیدگی جنسی، تخریب اسپرماتوگونیاها و سلول‌های لیدیگ، کاهش اسپراتوزواها، تخریب بافت بینابینی و تخریب اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه می‌گردد و این آسیب‌ها در ماهی‌های مواجه‌شده با دوز بالاتر شدید است. علاوه بر این آسیب بافتی به‌صورت نکروز و هیپرپلازی در آبشش ماهی‌های مواجه‌شده با رانداپ نیز مشاهده که آسیب در ماهی‌های مواجه‌شده با دوزهای پایین خفیف و ماهی‌های مواجه‌شده با دوز بالا شدید بود. لذا توضیه می‌شود راه‌کارهایی جهت کاهش استفاده از این علف‌کش در مزارع کشاورزی به‌عمل آید و میزان مصرف آن کنترل و حساب شده باشد.

REFERENCES

Badade, Z.; Samant, P. (2011). Role of oxidative stress in male infertility. J Bio Sci Res; 3(2): 385-91.

Cassault-Meyer, E.; Gress, S.; Séralini, G.É.; Galeraud-Denis, I. (2014). An acute exposure to glyphosate-based

herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. Environment Toxicol Pharmacol; 38(1):131-40.

Cavalli, VLdLO.; Cattani, D.; Rieg, CEH.; Pierozan, P.; Zanatta, L.; Parisotto, E.B.; *et al*. (2013).Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. Free Radical Biol Med; 65: 335-46.

Clair, É.; Mesnage, R.; Travert, C.; Séralini, G.É. (2012).A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. Toxicol in vitro; 26(2): 269-79.

De Liz Oliveira Cavalli, V.L.; Cattani, D.; Rieg, C.E.; Pierozan, P.; Zanatta, L.; Benedetti Parisotto, E.; *et al*. (2013).Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. Free Radical Biol Med; 65: 335-46.

Guilherme, S.; Gaivão, I.; Santos, M.; Pacheco, M. (2010).European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®-a glyphosate-based herbicide. Mutagenesis; 25(5): 523-30.

Harayashiki, CAY.; Junior, ASV.; Machado, AAdS.; Cabrera, LdC.; Primel, E.G.; Bianchini, A.; *et al*. (2013). Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy Poecilia vivipara acclimated to fresh water. Aquat Toxicol; 142-143: 176-84.

Helfrich, L.A.; Weigmann, D.L.; Hipkins, P.A.; Stinson, E.R. (2009). Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. Virginia, College of Agriculture and Life Sciences.

Jiraungkoorskul, W.; Upatham, E.S.; Kruatrachue, M.; Sahaphong, S.; Vichasri-Grams, S.; Pokethitiyook, P. (2002). Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science Asia; 28(3): 121-7.

Khayati, M.; Mashoufi, M. (2007). Measurement and analysis of total factor productivity in aquaculture farms a case study of warm and cold water farms in gilan province. J Dev Agric Econ; 19(59): 53-74.

Lasheidani, M.; Balouchi, S.; Keyvan, A.; Jamili, S.; Falakru, K. (2008). Effect of butachlor on density, volume and number of abnormal sperms in caspian kutum (*Rutilus frisii* Kutum). Res J Environ Sci; 2(3): 474-82.

Lugowska, K. (2018). The effects of Roundup on gametes and early development of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish Physiol Biochem; 1-9.

Mohaghegh, E.; Farokhrouz, M.; Zamini, A.;, Yousefi, E.;, Tehranifard, A. (2013).Effects of roundup on histopathological changes of gonad and gonad index in male rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) breeder in two time periods in the southern caspian sea. J Fisheries; 4(6): 22-7.

Nešković, N.; Poleksić, V.; Elezović, I.; Karan, V.; Budimir, M. (1996). Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, Cyprinus carpio L. Bull Environ Contam Toxicol; 56(2): 295-302.

Rahmanikhah, Z.; Esmaeili, A.; Bahramifar, N.; Shokri, Z. (2010). Organophosphorous pesticide residues in the surface and ground water in the Southern Coast Watershed of Caspian Sea, Iran. World Appl Sci J; 9(2): 160-2.

Richard, S.; Moslemi, S.; Sipahutar, H.; Benachour, N.; Seralini, G.E. (2008). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. Environ. Health Perspect. (6): 113-1162

Romano, M.A.; Romano, R.M.; Santos, L.D.; Wisniewski, P.; Campos, D.A.; de Souza, P.B.; *et al*. (2012). Glyphosate

impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. Arch Toxicol; 86(4): 663-73.

Romano, R.M.; Romano, M.A.; Bernardi, M.M.; Furtado, P.; Oliveira; CAd. (2010).Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. Arch Toxicol; 84(4): 309-17.

Shiva, M.; Gautam, A.K.; Verma, Y.; Shivgotra, V.; Doshi, H.; Kumar, S. (2011). Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. Clin Biochem; 44(4): 319-24.

Vinodhini, R.; Narayanan, M. (2005). Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish Cyprinus carpio (Common carp). Int J Environ Sci Technol; 5(2): 179-82.

Walsh, L.P.; McCormick, C.; Martin, C.; Stocco, D.M. (2000). Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Environ. Health Perspect; 108(8): 769.

Yousef, M.; Salem, M.; Ibrahim, H.; Helmi, S.; Seehy, M.; Bertheussen, K. (1995). Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. J Environ Sci Health B; 30(4): 513-34.

Yusof, S.; Ismail, A.; Alias, MS. (2014). Effect of glyphosate-based herbicide on early life stages of Java medaka (Oryzias javanicus): A potential tropical test fish. Marine Poll Bull; 85(2): 494-8.