تاثیر غلظت‌های تحت‌کشنده دیازینون بر بافت تخمدان در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

- **معصومه درویشی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
- **رقیه صفری***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
- **علی شعبانی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
- **سیدحسین حسینی‌فر**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

چکیده

سم دیازینون، یکی از سمومی است که به‌عنوان آفت‌کش در باغات و زمین‌های کشاورزی کشور به‌ویژه در منطقه استان گلستان استفاده می‌گردد. با این‌که بوم‌سازگان‌های آبی محل و هدف استفاده این سموم نیستند، اما مطالعات پایشی شواهدی از حضور آن‌ها و متابولیت‌های آن‌ها را در محیط‌های آبی به‌ویژه آب‌های سطحی را نشان می‌دهد. اثرات دوزهای تحت‌کشنده سم دیازینون تجاری بر آسیب بافت تخمدان ماهی گورخری نابالغ در مواجهه ۳۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۲٤۰ ماهی ماده با میانگین وزنی ۰/۰۵±۰/۲ در ۳ تیمار تحت‌کشنده ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از LC۵۰ سم دیازینون به‌ترتیب ۰/۸، ۱/٦، و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار شاهد قرار گرفتند. در پایان دوره، نمونه‌برداری از بافت گناد ماهیان انجام و مقاطع بافتی تهیه شد. نتایج نشان داد که در گروه شاهد، بافت تخمدان طبیعی و عمده اووسیت‌ها در ابتدا و انتهای مرحله چهارم رسیدگی جنسی بودند. در تیمار۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر اووسیت‌ها درمرحله سوم و انتهای مرحله سوم رسیدگی جنسی بوده و تعدادی اووسیت در مرحله دوم مشاهده شد. در تیمار۱/٦ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر، رشد ناچیز تخمدان مشاهده و اووسیت‌ها عمدتاً در مرحله دوم رسیدگی جنسی قرار داشتند. در این تیمارها هایپرپلازیا در لایه گرانولوزا و فولیکول‌های آترتیک مشاهده شد. این روند رسیدگی نشان‌دهنده کاهش رشد اووسیت با افزایش دوز سم می‌باشد. اندازه تخمدان در تیمارهای مختلف به‌ویژه با دوز بالا (۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر) کاهش چشمگیری نسبت به گروه شاهد نشان داد.

کلمات کلیدی: دیازینون، رسیدگی جنسی، ماهی گورخری

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: roghi_safari@yahoo.com

مقدمه

توسعه کشاورزی در سرتاسر جهان منجر به استفاده روز افزون از آفت‌کش‌ها و به‌دنبال آن آلودگی بیش از پیش اکوسیستم‌های آبی گردیده است. آلودگی آب توسط آفت‌کش‌ها، معمولاً پس از چند هفته مصرف همراه با رواناب‌های سطحی و زهکشی زیر سطحی رخ داده (Nouri و همکاران، ۲۰۰۰)، و موجب مرگ‌ومیر ماهی‌ها در اثر آفت کش‌ها در سال‌های اخیر شده است (Wendelaar- Bonga، ۱۹۹۷؛ Bagheri، ۲۰۰۷). گروه مهمی از حشره‌کش‌ها ارگانوفسفره‌ها هستند که برای مبارزه با آفات مورد استفاده قرار می‌گیرند و می‌توانند سمیت بالایی را برای انسان و جانوران ایجاد کنند (Shah Muhammad و همکاران، ۲۰۱۰؛ Anbarkeh و همکاران، ۲۰۱۴).

یکی از مهم‌ترین آن‌ها دیازینون با نام (نام آیوپاک: phosphorothioate, INN – DimpylateO,O-Diethyl O-[4-ethyl6-[propan-2-yl)pyrimidin-2-yl]می‌باشد که به‌طور وسیعی در کشاورزی و منازل به‌منظور کنترل حشرات در خاک، گیاهان، میوه و محصولات زراعی دیگر استفاده می‌شود. ظاهر این حشره‌کش ارگانوفسفره غیر سیستمیک بسته به خلوص آن متفاوت و در دما و فشار استاندارد محیط نسبتاً پایدار می‌باشد، اما در اثر حرارت بالا حساس به تشکیل گاز سدیم فسفین است (Fattahi و همکاران، ۲۰۰۹). همان‌طورکه گفته‌شد دیازینون به‌عنوان یک‌سم ارگانوفسفره که‌در سطح گسترده‌ای در کشاورزی و حتی امور خانگی برای کنترل حشرات استفاده می‌شود، با این‌که بوم‌سازگان‌های آبی محل و هدف استفاده سم دیازینون نیستند، اما مطالعات پایشی شواهدی از حضور این سم و متابولیت‌های آن در محیط‌های آبی به‌ویژه آب‌های سطحی را نشان می‌دهند (Van Der Geest و همکاران، ۱۹۹۷). دیازینون مورد استفاده در زمین‌های کشاورزی به‌راحتی می‌تواند شسته شود و وارد آب‌های زیرزمینی، سطحی و در نهایت محیط زیست آبزیان شود و در گستره وسیعی از آبزیان غیرهدف ازجمله ماهیان، پستانداران و بی‌مهرگان آبزی تاثیر گذارد (Kuivila و Foe، ۱۹۹۵). عملکرد دیازینون به‌عنوان یک مهارکننده استیل کولین استراز، از طریق باند شدن با آنزیم‌های عصبی استیل کولین استراز و بلوکه نمودن آن سبب اسپاسم عضلانی در جانوران می‌گردد. مقدار LC۵۰ دیازینون بسیار متغیر می‌باشد و به سن، وزن و جنسیت موجود و شرایط اقلیمی محیط بستگی دارد (Maliji و همکاران، ۲۰۱۴). دوزهای تحت‌کشنده دیازینون ممکن است منجر به کاهش رشد و توان تولیدمثلی و بقای بی‌مهرگان آبزی و هم‌چنین کاهش توان تولیدمثلی، تاخیر در بلوغ جنسی، اختلال در تغذیه و افت وزن بدن و نیز ناهنجاری‌های عصبی و رفتاری در ماهی‌ها، دوزیستان، پرندگان و پستانداران شود (Eisler، ۱۹۸۶؛ Dutta و Arends، ۲۰۰۳).

تخمدان که با سنتز هورمون‌ها و تولید اووسیت نقش مهمی در عملکرد تولیدمثلی برعهده دارد، یکی از اندام‌هایی است که تحت تاثیر این سم قرار می‌گیرد (Johari و همکاران، ۲۰۱۰). سم دیازینون موجب کاهش قطر تخمدان شده و با ایجاد بافت نکروز میزان فولیکول‌های آترتیک را افزایش می‌دهد و یا این‌که با کاهش سطح استرادیول، اووسیت‌های بالغ را تخریب می‌کند (Maxwell و Dutta، ۲۰۰۵). هم‌چنین این سم می‌تواند تقسیم میتوزی را در مراحل اولیه تقسیم سلولی کاهش داده و با تخریب میکروفلامنت‌ها اسکلت سلولی را از بین برد و بر سنتز DNA تاثیر منفی گذارد (Pesando و همکاران، ۲۰۰۳). لذا تاثیر این سموم بر آبزیان از نگرانی‌های مهم زیست محیطی به‌شمار می‌رود. اطلاعات ساختار و عملکرد تخمدان ماهیان استخوانی جمع‌آوری و مراحل مختلف تخمک گذاری در تخمدان‌های طبیعی به‌طور دقیق توصیف شده است (Groman، ۱۹۸۳).

تاکنون تحقیقات مختلفی بر روی اختلالات تخمدان آبزیان به علت قرار گرفتن در معرض آفت‌کش‌ها صورت گرفته است اما در مورد اثرات دیازینون روی آسیب بافت تخمدان ماهی گورخری تحت دوزهای مورد بررسی یافت نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی هیستوپاتولوژی بافت تخمدان ماهی گورخری در مواجهه با دوزهای تحت‌کشنده دیازینون انجام شد.

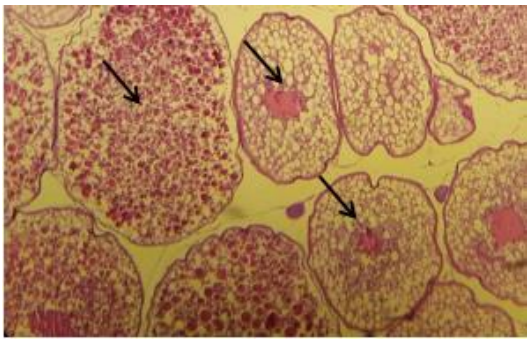
مواد و روش‌ها

بچه ماهیان گورخری ماده با سن حدود ۲ ماه از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت کلا گرگان خریداری و به مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. پس از ۲ هفته سازگاری ماهی‌ها با تراکم ۴۵ عدد در هر آکواریوم شیشه‌ای ۲۵۰ لیتری که ۲۵ لیتر از آن آبگیری شده بود به‌طور تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار رهاسازی شدند. به‌منظور هوادهی آکواریوم‌ها از سنگ هوا و تنظیم دمای آب در ۲۶ درجه سانتی‌گراد از هیتر برقی استفاده شد. میانگین pH آب ۸/۳ بود. برای تغذیه ماهی‌ها از غذای بیومار (فرانسه) استفاده شد که مقدار آن براساس ۴- ۳ درصد میانگین وزنی ماهی محاسبه و در ۵ الی ۶ نوبت به‌طور روزانه غذادهی شدند. در روز اول شروع آزمایش، تزریق سم درون آب انجام شد و هر ۴۸ ساعت یک‌بار تا حدود ۹۰ درصد از آب آکواریوم تعویض و سم تجدید شد. میزان LC۵۰ برای سم دیازینون پس از انجام تست LC۵۰ در آکواریوم‌ها، ۱۶میلی‌گرم بر لیتر (درویشی و همکاران، منتشر نشده) درنظر گرفته شد که میزان ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از LC۵۰ مورد نظر که به‌ترتیب ۰، ۰/۸، ۱/۶، و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شدند، برای تیمارها استفاده شد. پس از ۳۰ روز

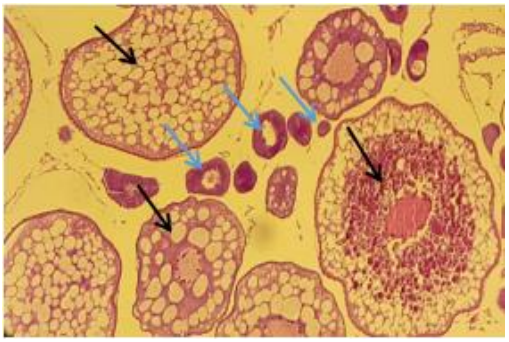
مواجهه با دیازینون و پایان دوره آزمایش۶ ماهی به‌طور تصادفی از هر تیمارها صید و با استفاده از پودر گل میخک ۰/۵ گرم بر لیتر بی‌هوش و کشته شدند. جهت مطالعات بافت‌شناسی و تعیین مرحله رسیدگی جنسی در هرکدام از تیمارها در انتهای دوره نمونه‌برداری از گناد انجام و در فرمالین فیکس شد. بافت‌های گناد تثبیت‌شده در فرمالین ۱۰٪ پس از ۲۴ ساعت به الکل ۷۰٪ منتقل شد. سپس آبگیری با افزایش اتانول (۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۰۰٪) انجام و در ادامه در زایلن وارد شدند. تمامی این مراحل توسط دستگاه پاساژ بافت تحت برنامه تعریف شده برای این کار صورت گرفت. بافت‌ها سپس با پارافین (دمای ذوب ۵۸°C-۵۶) بر روی قالب‌های تیشیوتک قالب‌گیری و پارافینه شدند(Fernandes و همکاران، ۲۰۰۷). از قالب‌های پارافینِ با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و پس از قرار دادن بر روی لام، به‌مدت ۰/۵ ساعت در آون (۶۰°C) قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین‌زدایی و جایگزینی آن با زایلن به‌وسیله سری‌های کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰و ۷۰) آب‌دهی مجدد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. بافت‌های تهیه‌شده مجدداً به آون منتقل‌شده تا خشک شوند. تمامی مواد مورداستفاده در این مراحل محصول شرکت مرک بود. در نهایت با استفاده از چسب هیستوفلوید بر روی لام‌های تهیه‌شده لامل چسبانده شد (Fanta و همکاران، ۲۰۰۳). سپس اسلایدهای بافت‌های تهیه‌شده توسط میکروسکوپ اینورت (مدل نیکون TS۱۰۰) آزمایشگاه ماهی‌شناسی دانشکده شیلات و محیط‌زیست مورد مطالعه قرار گرفت و سپس با استفاده از میکروسکوپ اینورت، از نمونه‌ها عکس‌هایی با بزرگ‌نمایی (۱۰X) تهیه شد و عکس‌ها به‌صورت کیفی بررسی گردید.

نتایج

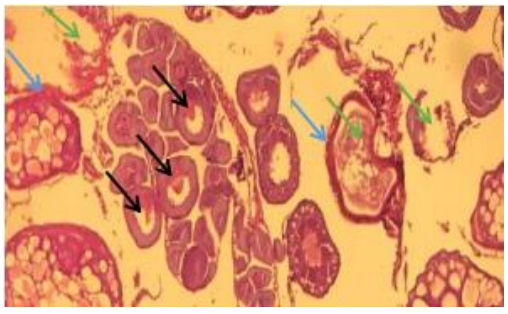
در پایان دوره و ۳۰ روز مواجهه با سم دیازینون هیچ‌گونه مرگ و میری در تیمارها مشاهده نشد. کاهش اشتها و عدم تعادل ازجمله علائم رفتاری مشاهده شده در تیمارهای با دوز بالا بود. در بررسی بافتی تخمدان مهم‌ترین علائم مشاهده شده کاهش چشمگیر اندازه تخمدان در تیمارهای مختلف به‌ویژه با دوز بالا (۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر) نسبت به گروه شاهد بود. در بررسی رسیدگی جنسی اووسیت‌ها، بیش‌تر اووسیت‌های گروه شاهد (شکل ۱) که در معرض سم قرار نگرفته بودند در ابتدا و انتهای مرحله چهارم رسیدگی جنسی بودند، درصورتی‌که اووسیت‌های تیمارهای مختلف در مراحل پایین‌تر رسیدگی جنسی قرار داشتند. در تیمار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر (شکل ۲) اووسیت‌ها در مرحله دوم و سوم رسیدگی، تیمار ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر (شکل ۳) بیش‌تر اووسیت‌ها در مرحله دوم و در تیمار ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر (شکل ۴) اکثر اووسیت‌ها در مراحل ابتدایی رسیدگی جنسی خود قرار داشتند. این روند رسیدگی اووسیت‌ها در تیمارهای مختلف نشان‌دهنده کاهش رشد اووسیت نسبت به افزایش دوز سم می‌باشد. هم‌چنین در دوزهای بالا فولیکول‌های آترتیک و هایپرپلازیا در لایه گرانولوزا نیز مشاهده شد در صورتی که بافت تخمدان در گروه شاهد طبیعی بوده و رشد خوبی را داشته است.



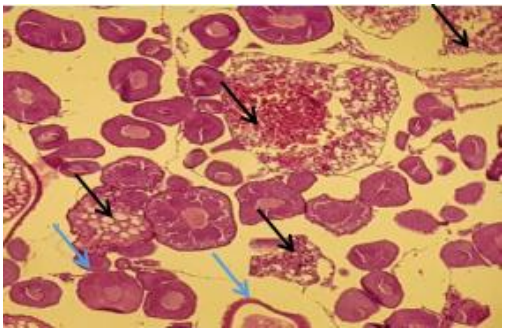
شکل ۱: گروه شاهد. بافت تخمدان طبیعی. عمده اووسیت ها در مرحله چهار و انتهای مرحله چهار رسیدگی جنسی



شکل۲: تیمار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون در ماهی گورخری. رشد اووسیت‌ها در مرحله سوم و انتهای مرحله سوم (فلش سیاه)، وجود اووسیت‌ها در مرحله دوم و وجود اووگونیا (فلش آبی)



شکل ۳: تیمار ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون در ماهی گورخری. رشد ناچیز و کاهش اندازه تخمدان، رشد اووسیت‌ها عمدتاً در مرحله دوم رسیدگی جنسی (فلش سیاه)، هایپرپلازیا در لایه گرانولوزا (فلش آبی) و و جود فولیکول‌های آترتیک (فلش سبز)



شکل۴: تیمار ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون در ماهی گورخری. کاهش چشمگیر اندازه تخمدان، اووسیت‌ها در مراحل ابتدایی رشد (عمدتاً در مرحله دوم رسیدگی جنسی)، وجود فولیکول‌های آترتیک (فلش سیاه) و هایپرپلازیا در لایه گرانولوزا (فلش آبی)

بحث

کیفیت آب عامل مهمی در موفقیت‌آمیز تولیدمثل ماهی به‌شمار می‌رود. هنگامی که کیفیت آب به‌علت مواد شیمیایی ارگانوفسفره یا سایر آلاینده‌های دیگر تغییر می‌کند، ساختار بافت شناختی حیات آبزی به‌شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد. سم دیازینون توانایی تجمع در بافت ماهیچه، کبد، گناد و آبشش را دارد (Sapozhnikova و همکاران، ۲۰۰۴) و از این طریق می‌تواند بر هوموستازی، تولیدمثل، رشد و یا رفتار ماهیان تاثیر بگذارد (Abadin و همکاران، ۲۰۰۹). هر چند بخش عمده این سم وارد شده به بدن از طریق سم‌زدایی در کبد از بدن دفع می‌شود ولی بخشی از آن نیز ممکن است در بافت‌های مختلف بدن ازجمله غدد‌جنسی تجمع پیدا کرده و با تاثیر بر سلول‌های غدد جنسی سبب بروز ضعف و کاهش توان تولیدمثلی در آبزیان گردد (Fattahi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Yilmaz و همکاران، ۲۰۱۲).

مطالعه انجام شده روی تخمدان ماهی گورخری در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف دیازینون نشان‌دهنده پیدایش آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی در بافت تخمدان می‌باشد که این آسیب با افزایش غلظت سم بیش‌تر نمایان شده، هم‌چنین افزایش مدت زمان تماس بافت تخمدان با سم دیازینون نیز تغییرات و آسیب‌های سلولی وارد شده بر بافت را تشدید کرده است. کاهش اندازه تخمدان و کاهش رشد و مرحله رسیدگی جنسی اووسیت‌ها به‌ویژه در گروه تیمار ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به گروه شاهد از مهم‌ترین علائم مشاهده شده در این آزمایش می‌باشد. در گروه شاهد بافت تخمدان حالت طبیعی داشته و اووسیت‌ها در ابتدا و انتهای مرحله چهارم رسیدگی جنسی خود هستند درصورتی‌که این حالت در تیمارهای دیگر مشاهده نمی‌شود. در تیمارهای با دوز سم بالا، هایپرپلازیا در لایه گرانولوزا و هم‌چنین سلول‌های آترزیا نیز مشاهده می‌شود. پدیده آترزیا یک فرآیند کنترل شده هورمونی و فاسد کننده طبیعی است که برای توصیف شکست و دوباره جذب شدن گامت‌ها استفاده می‌شود و آترزیای فولیکولی یک فرآیند تخریبی است که سبب می‌شود فولیکول‌های تخمدانی مهره‌داران یک‌پارچگی خود را از دست داده و پیش از تخمک‌گذاری حذف شوند (Santos و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین وقوع آترزیا یا دژنره شدن اووسیت در اغلب تخمک‌های در مرحله زرده‌سازی ممکن است از نظر فیزیولوژیک امری طبیعی باشد، اما افزایش تعداد اووسیت‌هایی که دچار آترزیا می‌شوند، در شرایط نامساعد محیطی و فیزیولوژیکی می‌تواند به‌عنوان یک شاخص زیستی به‌شمار آید (بنایی و همکاران، ۱۳۸۸). با این وجود می‌توان نتیجه گرفت که آسیب‌های ناشی از آفت‌کش‌ها به دوز و یا زمان مواجهه بستگی دارد و به‌وسیله اتولیز ناشی از آنزیم‌های سلولی خود و یا تحلیل سریع ناشی اثر مستقیم سموم ایجاد می‌شود.

مطالعات زیادی در رابطه با میزان تاثیرگذاری سم دیازیون بر وضعیت تولیدمثلی ماهیان انجام شده که همه آن‌ها تاثیر مخرب این سم بر پیشرفت فرآیند تولیدمثلی را تایید کرده‌اند. Dutta و همکاران (۱۹۹۲) تنها پس از ۲۴ ساعت مواجهه با دوزهای تحت‌کشنده دیازینون تجمع سیتوپلاسمی را در ماهی *Heteropneustes fossilis* مشاهده کردند. در تخمدان ماهی *Lebistes reticulatus* پس از مواجهه با dimethoate که یک ماده حشره‌کش ارگانوفسفریک می‌باشد، آسیب هسته درون تخمک، نازک‌تر شدن دیواره تخمدان و پیدایش فضاها مشاهده شد (Ramana و همکاران، ۱۹۹۲). هنگامی که ماهی آب شیرین *Colisa lalia* در معرض دوزهای متوسط و تحت‌کشنده کاربوفوران قرار گرفت در بافت تخمدان تعداد زیادی فولیکول‌های آترتیک مشاهده شد درحالی‌که تخمک‌های بالغ کم‌تر بودند (Karpagaganapathy و Sukumar، ۱۹۹۲). Dutta و Maxwell (۲۰۰۳) نیز اثرات تحت کشنده سم دیازینون بر تخمدان ماهی *Lepomis macrochirus* را بررسی کردند. آسیب شدید لاملاهای شفاف، افزایش فضای داخل فولیکولی، سیتوپلاسم واژینال و نکروز در سیتوپلاسم پس از ۳ هفته مواجهه در این ماهی مشاهده شد. هم‌چنین پس از ۳ هفته مواجهه دیواره تخمدان فرسوده و شکسته شد و تعداد قابل توجهی فولیکول‌های آترتیک در تخمدان وجود داشت. افزایش اووسیت‌های آترتیک شده در مطالعه Koç و همکاران (۲۰۰۳) نیز مشاهده شد. آن‌ها ماهی گورخری را در معرض حشره‌کش دالتمترین قرار دادند که پس از ۵ روز مواجهه تخمک‌ها از بین رفته و رشد خوبی نکردند. در تخمدان ماهی کپور معمولی که در معرض غلظت‌های تحت‌کشنده دیازینون قرار گرفته بود پس از ۳۰ روز مواجهه افزایش اووسیت‌های آترزی شده و هم‌چنین افزایش فاگوسیتوز سلول‌های دژنره شده مشاهده شد. اندازه کوچک‌تر و تحلیل تخمدان در ماهی‌های تحت تیمار با سم به‌ویژه در گروه تیمار ۱۲۰ میکروگرم بر لیتر نسبت به گروه شاهد از دیگر علائم

مشاهده شده می‌باشد (بنایی و همکاران، ۱۳۸۸). Yu و همکاران (۲۰۱۴) در ماهی گورخری پس از مواجهه با PBDE کاهش تولید تخمک، میزان پروتئین تخمک و تغییرات رشد گنادی را مشاهده کردند. در بررسی بافتی Kwon و همکاران (۲۰۱۶) نیز تغییرات در مرحله رشد فولیکول پس از مواجهه ماهی گورخری با میکروسیستین مشاهده شد. مواجهه ماهی گورخری با باریم کلرید منجر به کاهش چشمگیر تولید تخمک همراه با کاهش اندازه گناد (شاخص گنادوسوماتیک) گردید که این کاهش می‌تواند نتیجه تغییر در تعداد و یا اندازه سلول‌های سرتولی و سلول‌های زاینده باشد (Kwon و همکاران، ۲۰۱۶).

در مطالعه حاضر کاهش رشد غدد جنسی و تخمدان و افزایش آسیب بافت تخمدان با افزایش دوز مشاهده شد. مواجهه شدن ماهی‌ها با سمومی نظیر دیازینون می‌تواند تاثیر به‌سزایی در کاهش انرژی تخصص یافته جهت رشد و تکامل غدد جنسی بگذارد. در واقع، ماهی‌ها پس از قرار گرفتن در معرض یک آلاینده، بخش قابل توجهی از انرژی دریافتی از طریق غذا را صرف برقراری هوموستازی و حفظ تعادل فیزیولوژیکی خود در جهت مقابله با پیامدهای ناخواسته ورود سم به بدن خود می‌نمایند. از سویی دیگر کاهش اشتهای این ماهی‌ها و هم‌چنین ایجاد تغییر در توانایی یافتن و گرفتن غذا ناشی از تاثیر سم دیازینون بر حواس بویایی و چشایی و نیز بلوکه نمودن فعالیت استیل کولین استراز نیز موجب افزایش وخامت وضعیت فیزیولوژیکی این ماهی‌ها می‌شود.

منابع

۱. **بنایی، م.؛ میرواقفی، ع.ر.؛ احمدی، ک. و عاشوری، ر.، ۱۳۸۸.** تاثیر غلظت تحت کشنده دیازینون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه و تخمدان ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*). مجله بیولوژی دریا. دوره ۱. شماره ۲. صفحات ۱۴ تا ۲۶.

۲. **Abadin, H.; Todd, D.; Wohlers, D. and Hard, C.M., 2009.** Priority data needs for Diazinon. Syracuse Research Corporation. 75 p.

۳. **Anbarkeh, F.R.; Nikravesh, M.R.; Jalali, M.; Sadeghnia, H.R.; Sargazi, Z. and Mohammdzadeh, L., 2014.** Single dose effect of diazinon on biochemical parameters in testis tissue of adult rats and the protective effect of vitamin E. Iranian journal of reproductive medicine. Vol. 12, 731 p.

۴. **Bagheri, F., 2007.** Study of pesticide residues (Diazinon, Azinphosmethyl) in the rivers of Golestan province (GorganRoud and Gharehsou). M.Sc. Thesis, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

۵. **Dutta, H.M. and Arends, D., 2003.** Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. Environmental Research. Vol. 91, pp: 157-162.

۶. **Dutta, H.M. and Maxwell, L., 2003.** Histological examination of sublethal effects of Diazinon on ovary of Bluegill, *Lepomis macrochirus*. Environmental Pollution. Vol. 121, pp: 95-102.

۷. **Dutta, H.M.; Nath, A.; Adhikari, S.; Roy, P.K.; Singh, N.K. and DattaMunshi, J.S., 1992.** Sublethalmalathion induced changes in the ovary of an air-breathing fish, Heteropneustesfossilis: a histological study. Hydrobiologia. Vol. 29, pp: 215-218.

۸. **Eisler, R., 1986.** Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A Synoptic review. Fish and Wildlife Service.

۹. **Fanta, E.; Rios, F.S.; Romao, S.; Vianna, A. and Freiberger, S., 2003.** Histopathology of the fish Corydoras paleatus contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 54, pp: 119-130.

۱۰. **Fattahi, E.; Jorsaraei, S.G.A.; Parivar, K. and Moghaddamnia, A.A., 2010.** The effects of a single dosage of Diazinon and Hinosan on the structure of testis tissue and sexual hormones in Mice. Yakhteh Medical Journal. Vol. 12, pp: 405-410.

۱۱. **Fattahi, E.; Parivar, K. and Jorsaraei, S.G.A., 2009.** The effects of diazinon on testosterone, FSH and LH levels and testicular tissue in mice. International Journal of Reproductive BioMedicine. Vol. 7, pp: 59-64.

۱۲. **Fernandes, A.; Ferreira-Cadoso, J.V.; Garcia-Santos, S.; Monteiro, S.M.; Carrola, J.; Matos, P. and Fontainhas Fernandes, A., 2007.** Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinaria Brasileria. Vol. 27, No. 3, pp:103-109.

۱۳. **Fulton, M.H. and Key, P.B., 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 20, pp: 37-45.

۱۴. **Groman, D.B., 1982.** Histology of the Striped Bass. American FisheriesSociety: Department of Pathobiology.

۱۵. **Johari, H.; Shariati, M.; Abbasi, S.; Sharifi, E. and Askari, H.R., 2010.** The effects of diazinon on pituitary gonad axis & ovarian histological changes in rats. International Journal of Reproductive BioMedicine. Vol. 8, pp: 125-130.

۱۶. **Koc, N.D.; Muslu, M.N.; Kayhan, F.E. and Colak, S., 2009.** Histopathological changes in ovaries of zebrafish (*Danio rerio*) following administration of deltamethrin. Fresenius Environmental Bulletin. Vol. 18, pp: 1872-1878.

۱۷. **Kuivila, K.M. and Foe, C.G., 1995.** Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco Estuary California. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 14, pp: 1141-1150.

۱۸. **Kwon, B.; Ha, N.; Jung, J.; Kim, P.G.; Kho, Y.; Choi, K. and Ji, K., 2016.** Effects of Barium Chloride Exposure on Hormones and Genes of the Hypothalamic–Pituitary–Gonad Axis, and Reproduction of Zebrafish (*Danio rerio*). Bulletin of environmental contamination and toxicology. Vol. 96, pp: 341- 346.

۱۹. **Kwon, B.; Shin, H.; Moon, H.B.; Ji, K. and Kim, K.T., 2016.** Effects of tris (2-butoxyethyl) phosphate exposure on endocrine systems and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Pollution. Vol. 214, pp: 568-574.

۲۰. **Maliji, G.; Jorsaraei, S.; Zabihi, E.; Fattahi, E.; Rezaie, E. and Faraji, A.S., 2014.** Diazinon alters sex hormones, Interferon-gamma, Interleukin-4 and 10 in male Wistar rats. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. Vol. 16.

۲۱. **Maxwell, L.B. and Dutta, H.M., 2005.** Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 60, pp: 21-27.

۲۲. **Nouri, J.; Arjmandi, R. and Bayat, H., 2000.** Ecological investigation of application of pesticides in rice fields. Iran Journal Public Health. Vol. 29, pp: 137-146.

۲۳. **Pesando, D.; Huitorel, P.; Dolcini, V.; Angelini, C.; Guidetti, P. and Falugi, C., 2003.** Biological targets of neurotoxic pesticides analysed by alteration of developmental events in the Mediterranean Sea urchin, *Paracentrotusl ividus*. Marine environmental research. Vol. 55, pp: 39-57.

۲۴. **Ramana, Y.V.; Pandey, A.K. and Singh, S., 1992.** Dimethoate toxicity to gestational embryonic ovary of a live bearing fish, Lebistes reticulates. Bulletin of environmental contamination and toxicology. Vol. 48, pp: 907-913.

۲۵. **Santos, H.B.; Sato, Y.; Moro, L.; Bazzoli, N. and Rizzo, E., 2008.** Relationship among follicular apoptosis, integrin β1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost Prochilodus argenteus after induced spawning. Cell and tissue research. Vol. 332, pp: 159-170.

۲۶. **Sapozhnikova, Y.; Bawardi, O. and Schlenk, D., 2004.** Pesticides and PCBs in sediments and fishfrom the Salton Sea, California, USA. Chemosphere. Vol. 55, pp: 797-809.

۲۷. **Shah Muhammad, D. and Iqbal, M., 2010.** Diazinon induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. Food and chemical toxicology. Vol. 48, pp: 3345-3353.

۲۸. **Sukumar, A. and Karpagaganapathy, P.R., 1992.** Pesticide-Induced atresiain ovary of a freshwater fish, Colisalalia (*Hamilton-Buchanan*). Bulletin of environmental contamination and toxicology. Vol. 48, pp: 457-462.

۲۹. **Van Der Geest, H.G.; Stuijfzand, S.C.; Krak, M.H.S. and Admiral, W., 1997.** Impact of diazinon calamity in 1996 on the aquatic macroinvertebrates in the river Mesue. The Netherlands Journal of Aquatic Ecology. Vol. 30, pp: 327-330.

۳۰. **Wendelaar- Bonga, S.E., 1997.** The stress response in fish. Physiological reviews. Vol. 77, pp: 591-625.

۳۱. **Yilmaz, N.; Yilmaz, M. and Altuntas, I., 2012.** Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. Toxicology and industrial health. Vol. 28, pp: 51-57.

۳۲. **Yu, L.; Liu, C.; Chen, Q. and Zhou, B., 2014.** Endocrine disruption and reproduction impairment in zebrafish after long-term exposure to DE-71. Environmental toxicology and chemistry. Vol. 33, pp: 1354-1362.