



تأثیر سطوح مختلف روی بر ساختار ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*)

مریم نصراله پورمقدم، سهیل ایگدري*، باقر مجازی امیری، هادی پورباقر، نیما نعمتی مبین

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

<p>نوع مقاله: پژوهشی</p> <p>تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۶/۰۳/۰۶ اصلاح: ۹۶/۱۱/۲۷ پذیرش: ۹۷/۰۳/۱۰</p> <p>کلمات کلیدی: اسپرم ریخت‌شناسی فلزات سنگین لقاح مارماهی دهان‌گرد</p>	<p>چکیده</p> <p>مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی تأثیر فلز روی بر شاخص‌های ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری صورت پذیرفت. برای این منظور، اسپرم‌ها در سه تیمار زمانی؛ ۳ دقیقه، ۳ ساعت و ۳۶ ساعت، در شرایط آزمایشگاه تحت تأثیر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از فلز روی قرار گرفتند. نتایج نشان داد، تخریب ساختار اسپرم تحت تأثیر روی، شامل افزایش طول، عرض و سطح سر، تخریب تاژک و تا حدودی قطع تاژک بود که با افزایش غلظت و یا افزایش زمان مواجهه اثرات تخریبی شدیدتر می‌گردد. زمانی که مواجهه با آلاینده از زمان مشخصی (۳ دقیقه)، به‌منظور شبیه‌سازی تجمع فلز روی در بافت گناد، فراتر رفت، اثرات تخریبی سبب تغییر ساختار اسپرم به‌صورت کاهش طول و افزایش عرض سر و در نتیجه کاهش سطح سر، قطع کامل تاژک در تمام نمونه‌ها و تغییر شکل سر اسپرم از بیضی شکل به دایره‌ای شکل شد. بنابراین ورود آلاینده‌های مختلف از جمله روی به محل تکثیر طبیعی این ماهی، می‌تواند با ایجاد اثرات تخریبی در فاکتورهای ریخت‌شناسی اسپرم، در قابلیت لقاح اسپرم‌ها اثرات نامطلوبی گذاشته و نرخ لقاح و تخم‌گشایی را به‌صورت محسوسی کاهش دهد و بدین صورت تهدیدی جدی جهت بقای نسل این گونه‌ی نادر به حساب آید.</p>
---	---

مقدمه

عوامل زیستی و غیر زیستی در حد مطلوب مفید هستند ولی کاهش یا افزایش بیش از حد آن‌ها سبب بر هم زدن تعادل موجودات زنده در محیط‌زیست آن‌ها می‌گردد که تغییرات شدید در جمعیت آن‌ها را به دنبال خواهد داشت. فلزات سنگین از جمله این عوامل می‌باشند که به‌طور طبیعی کم‌تر از یک درصد از وزن بدن موجودات زنده را تشکیل می‌دهند و نوسانات غلظتی آن‌ها سبب ناپایداری محیط و ایجاد اختلال در موجودات می‌شود (Clark, 1986). فلزات سنگین از منابع طبیعی و غیرطبیعی به‌طور پیوسته وارد اکوسیستم‌های آبی شده و تهدیدی جدی برای آن‌ها به شمار می‌روند (Eisler, 1988). اگرچه در اغلب موارد غلظت مواد شیمیایی وارد شده به اکوسیستم‌های آبی با توجه به دبی رودخانه و حجم منابع آبی کاهش پیدا کرده و به کم‌تر از حدی می‌رسد که موجب مرگ و میر آبی ماهی‌ها شوند، اما در شرایط فوق‌العاده‌ها به‌طور مزمین در تماس با غلظت‌های کم‌تر از حد کشندگی مواد شیمیایی قرار می‌گیرند. این تماس در درازمدت به‌دلیل عدم توانایی جانور در دفع و

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: soheil.eagderi@ut.ac.ir

سم‌زدایی، به تدریج دچار تغییرات فیزیولوژیکی مختلف شده و در نتیجه سبب کاهش رشد و بقا و اختلال در تداوم نسل آن‌ها می‌گردد (Erickson et al., 2008).

مواد شیمیایی مخرب سیستم درون ریز (EDCs) با تأثیر بر سیستم تناسلی ماهیان ماده، در سنتز هورمون‌های جنسی اختلال ایجاد کرده و باعث تأخیر در بلوغ جنسی می‌گردند و در ماهیان نر نیز بر غلظت هورمون‌های جنسی، کیفیت منی، روند اسپرماتوژنز، تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و ساختار اسپرم اثر می‌گذارند (Hela et al., 2005). علاوه بر این، قابلیت تجمع زیستی این مواد در بافت و نسج موجودات زنده به دلیل عدم تجزیه بیولوژیکی و انتقال آن‌ها از طریق شبکه‌های غذایی، خطرات ناشی از آن‌ها را دو چندان ساخته و تأثیرات اکولوژیکی زیادی را به وجود می‌آورد (Geyer et al., 2001).

روی فلزی نرم به رنگ سفید مایل به آبی است. این عنصر طعم نامطلوب و تلخی به آب می‌دهد. روی بعد از آهن، آلومینیوم و مس چهارمین فلز مورد استفاده در دنیا می‌باشد. به‌عنوان محافظ فولاد در صنعت آب‌کاری، به‌صورت فلز آلیاژکننده با مس جهت تولید برنج، در ریخته‌گری‌ها و هم‌چنین به‌صورت ترکیبات شیمیایی در لاستیک و رنگ‌ها به کار می‌رود (Bradl, 2005). ماهیان تا حدی به عنصر روی نیازمند می‌باشند و این فلز را می‌توانند از طریق آب و غذا به دست آورند، اما این فلز نیز مانند سایر فلزات سنگین در غلظت‌های بالا برای ماهیان سمی می‌باشد (Berg and Shi, 1996; Sadeghi et al., 2017).

مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri* (Kessler, 1870) گونه بومی دریای خزر می‌باشد که در حوضه‌های آبریز شمالی، غربی و جنوبی آن زیست می‌کند (Satari, 2002). این ماهی، پس از رسیدن به سن بلوغ جهت تخم‌ریزی به بالادست رودخانه‌ها مهاجرت کرده و در این دوره، در نزدیکی سطح بستر، جایی که شدت جریان آب بین ۰/۴ تا ۰/۶ متر بر ثانیه باشد، حرکت می‌کند. مکان تخم‌ریزی آن‌ها مناطق کم‌عمق رودخانه‌ها با بستر شنی و سنگلاخی می‌باشد و مولدین پس از تخم‌ریزی می‌میرند (Satari, 2002). در سال‌های اخیر میزان ذخایر این ماهی به دلایل مختلف از جمله ساخت سد، تخریب زیستگاه و آلودگی رودخانه‌ها کاهش چشم‌گیری پیدا کرده است (Close et al., 2002).

با توجه به شرایط رودخانه‌های محل مهاجرت مارماهی دهان‌گرد خزری برای تکثیر طبیعی در حوضه‌ی جنوبی دریای خزر به دلیل ورود آلاینده‌های صنعتی، کشاورزی و انسانی این سؤال مطرح می‌شود که در صورتی که منابع آبی محل تکثیر طبیعی مارماهی دهان‌گرد خزری به چنین آلاینده‌هایی آلوده باشند، چه تأثیری بر اسپرم‌های موجود در گناد و آزاد شده در آب و به‌دنبال آن بر تولیدمثل طبیعی این ماهی خواهند گذاشت. از این‌رو این تحقیق با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف فلز روی بر پارامترهای ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری در طول دوره‌ی تحرک پس از رهاسازی و در بافت بیضه قبل از رهاسازی با شبیه‌سازی تجمع آن در این بافت صورت پذیرفت. اگرچه اطلاعات اندکی در مورد غلظت فلز روی در رودخانه‌های حوضه دریای خزر و نواحی ساحلی آن وجود دارد، میزان آن در رودخانه‌ها و نواحی ساحلی دریای خزر ۰/۲۶-۰/۵۱ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است (Rajaei et al., 2012; Shanbehzadeh et al., 2013). شناخت تأثیر سطوح مختلف این فلز بر ریخت‌شناسی اسپرم می‌تواند به درک بهتر تأثیر آلاینده‌های موجود در جایگاه تخم‌ریزی این گونه بومی کمک کرده و در مدیریت حفاظت آن مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

از تعداد ۱۵ مارماهی دهان‌گرد خزری نر کاملاً رسیده که در حال مهاجرت به سمت بالادست رودخانه شیروود (واقع در شهرستان تنکابن) جهت تولیدمثل طبیعی بودند، نمونه‌برداری صورت گرفت. بلافاصله پس از نمونه‌برداری و خشک نمودن مولدین با حوله تمیز، اسپرم کشی از آن‌ها از طریق فشار دادن ناحیه شکمی انجام پذیرفت (Linhart et al., 1995). به‌منظور حذف تأثیر کیفیت مولدین و در نتیجه اسپرم آن‌ها، اسپرم‌های جمع‌آوری شده از تمامی ۱۵ نمونه، جهت ایجاد ذخیره‌ی اولیه با یکدیگر مخلوط گردید. پس از استحصال اسپرم، مولدین مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند.

به‌منظور بررسی تأثیر فلز سنگین روی بر پارامترهای ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری، با استفاده از نمک کلرید روی ($ZnCl_2$ - Merck) محلول‌هایی با غلظت ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید. هدف از انجام این آزمایش بررسی تغییراتی بود که غلظت‌های مختلف فلز روی در سه تیمار سه دقیقه، سه ساعت و ۳۶ ساعت مواجهه بر

ساختار اسپرمتوزوئید ایجاد می‌کند. آزمایش سه دقیقه مواجهه جهت شبیه‌سازی تأثیر این فلز سنگین بر ساختار اسپرم از زمان رهاسازی در آب رودخانه تا رسیدن به سطح تخمک انجام گرفت. آزمایش‌های ۳ و ۳۶ ساعت مواجهه نیز به‌منظور بررسی تأثیر فلز روی تجمع یافته در بافت بیضه ماهی بر ساختار اسپرمتوزوئید صورت گرفت، به‌دلیل وجود این فلز در محیط‌زیست دریا، امکان تجمع آن در غلظت‌های بالاتر از حدود ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر که در آب‌های سطحی گزارش شده نیز وجود دارد (Rajaei *et al.*, 2012; Shanbehzadeh *et al.*, 2013). از این‌رو، علاوه بر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، و ۱ میلی‌گرم در لیتر (غلظت‌های نزدیک به حدود گزارش شده)، سه غلظت ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر (به‌عنوان سطوح احتمالی تجمعی در بافت گناد) نیز برای این تحقیق در نظر گرفته شد.

هر مرحله از آزمایش (سه دقیقه، سه ساعت و ۳۶ ساعت مواجهه) شامل یک تیمار شاهد با سه تکرار و شش تیمار (غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با سه تکرار برای فلز روی بود. برای این منظور در هر مرحله تعداد ۲۱ میکروتیوب استریل آماده گردید و در هر یک از آن‌ها مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از آلاینده روی ریخته شد. برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده گردید. برای شبیه‌سازی شرایط رودخانه، دمای میکروتیوب‌ها با دمای رودخانه محل نمونه‌برداری، هم‌دمای شد. در مرحله‌ی بعد، در داخل هر میکروتیوب، ۱۰ میکرولیتر از مایع اسپرمی ریخته و به آهستگی محتویات آن‌ها باهم مخلوط شد. مدت زمان مواجهه اسپرمتوزوئید با فلز سنگین در تیمار سه دقیقه براساس اندازه متوسط زمان تحرک اسپرمتوزوئید در نظر گرفته شد. پس از سه دقیقه زمان مواجهه، اسپرم‌ها پس از جدا نمودن محلول حاوی فلز روی جهت بررسی میکروسکوپی در محلول گلوآرال‌دئید ۲/۵ درصد در ۰/۱ مولار فسفات بافری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت گردید (Psenicka *et al.*, 2007).

در آزمایش‌های سه ساعت و ۳۶ ساعت، به‌منظور شبیه‌سازی شرایط بیضه و برای جلوگیری از ایجاد تحرک اسپرم‌ها، در هنگام اضافه کردن EDC به آن‌ها، اسپرم‌ها در محلول نگهدارنده (extender) به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شدند. محلول نگهدارنده مورد استفاده شامل ۱۳۷ mM NaCl، ۱۲ mM KCl، ۱ mM CaCl₂، ۱۰ mM هیپس بود که در pH ۷/۴ توسط NaOH تعدیل گردید (Kobayashi and Yamamoto, 1994). تیمارهای مورد بررسی برای هر یک از زمان‌ها مشابه آزمایش اول شامل یک تیمار شاهد و شش تیمار برای فلز روی بود که هر کدام در سه تکرار انجام پذیرفت. اسپرم و مواد نگهدارنده، با نسبت ۱:۱ در تماس با فلز روی قرار گرفتند و سپس میکروتیوب‌های حاوی اسپرم و فلز سنگین در داخل انکوباتور در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سپری شدن ۳ و ۳۶ ساعت، اسپرم‌ها از انکوباتور خارج شده و پس از جدا نمودن محلول حاوی فلز روی و مواد نگهدارنده، جهت بررسی میکروسکوپی مشابه روش فوق تثبیت شدند.

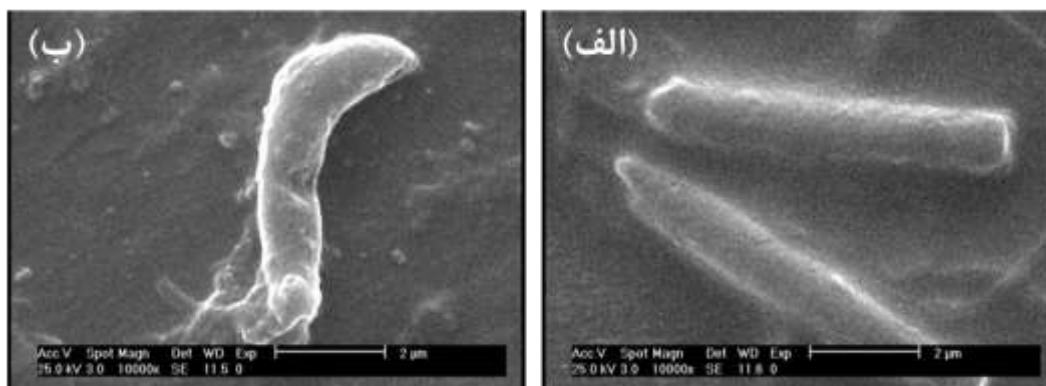
در مرحله‌ی بعد اسپرمتوزوئیدها توسط میکروسکوپ الکترونی SEM و میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی با میکروسکوپ نوری، نمونه‌های اسپرم تثبیت شده با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکاسی دیجیتالی Dino (با قدرت تفکیک ۶ مگاپیکسل)، بررسی و مورد عکس‌برداری قرار گرفتند. جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ الکترونی، در مرحله نخست اسپرم‌ها و مواد تثبیت‌کننده توسط فیلترهای کاغذی صاف شد و کاغذ صافی توسط فسفات بافر ۰/۱ مولار حاوی ۱۰ درصد سوکروز سه مرتبه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با فواصل زمانی یک ساعت شسته شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط محلول اسمیوم تتراکساید ۴٪ به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد شسته شده و سپس با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول استون (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه آب‌گیری شدند. پس از قرار دادن اسپرم‌ها در یک قطعه فویل آلومینیومی صیقل داده شده به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر، توسط دستگاه اسپوترکوتر به مدت ۷۰ ثانیه با حدود ۳۰ نانومتر طلا پوشانده شدند (Psenicka *et al.*, 2007). از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی SEM فیلپس (مدل XL-30، ساخت کشور هلند) با بزرگ‌نمایی‌های مختلف از حالت‌های طبیعی و غیرطبیعی اسپرم عکس تهیه شد.

تصاویر اسپرم‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی با استفاده از نرم‌افزار ImageJ مورد بررسی و شاخص‌هایی که در توان بارورکنندگی اسپرم نقش دارند، مورد سنجش قرار گرفتند. این شاخص‌ها به دلیل نیاز به تطابق اسپرم با میکروپیل و ارتباط مستقیم با تحرک اسپرم انتخاب شدند. این شاخص‌ها عبارت بودند از: طول سر (L)، عرض سر (W)، سطح سر (A)، شاخص کشیدگی سر ($Elongation = 100 \times (L-w)/(L+W)$)، شاخص بیضی‌واری سر ($Ellipticity =$

(W/L)، طول تاژک (L_t)، درصد قطع تاژک، درصد تخریب سر، درصد تخریب تاژک و درصد تخریب کل (Brito, 2007). شاخص‌های تخریب سر شامل بزرگ شدن سر، کوچک شدن سر، ایجاد بدشکلی در سر (سر شلاقی، سوزنی، گریزی شکل)، وجود دو سر، پارگی غشاء سر، شاخص‌های تخریب تاژک شامل قطع تاژک، کوتاه شدن و پیچ‌خوردگی تاژک و شاخص‌های تخریب کل شامل درصد تخریب سر و درصد تخریب تاژک بودند (Brito, 2007). داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. پس از آزمون همگن بودن واریانس‌ها، جهت مشخص نمودن تفاوت معنی‌داری در تیمارهای مورد بررسی از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و در صورت معنی‌دار بودن تفاوت‌ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها در تیمارهای مختلف استفاده گردید. معنی‌دار بودن اختلافات آماری در سطح ۵٪ تعیین شد و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL و SPSS استفاده گردید.

نتایج

در زمان سه دقیقه مواجهه با غلظت‌های مختلف روی، تنها غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0.05$). تحلیل همبستگی پیرسون در زمان سه دقیقه مواجهه، یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین غلظت‌های مختلف فلز روی و طول سر اسپرم ($r = 0.111^{**}$) نشان داد. در زمان سه ساعت مواجهه، طول سر اسپرم تنها در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P < 0.05$). در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، طول سر اسپرم به‌طور معنی‌داری نسبت به تمامی غلظت‌های کم‌تر، افزایش داشت ($P < 0.05$) (شکل ۱-الف). تحلیل همبستگی پیرسون بین غلظت‌های مختلف فلز روی و طول سر اسپرم در زمان سه ساعت، یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان داد ($r = 0.248^{**}$). در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، طول سر اسپرم دارای تغییرات بیشتری بود. طول سر اسپرم از غلظت صفر تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش و با افزایش غلظت به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت (شکل ۲). هرچند بین غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، از نظر کاهش طول اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$)، اما با افزایش غلظت به ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش معنی‌دار نسبت به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نمایان گشت ($P < 0.05$)، ولی این کاهش نسبت به غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). هم‌چنین درصد فراوانی در این غلظت در حال انتقال اوج فراوانی به سمت چپ (در جهت کاهش طول سر اسپرم) بود. در غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، در برخی اسپرم‌ها، افزایش اندازه‌ی سر اسپرم و در برخی کاهش اندازه‌ی سر اسپرم مشاهده شد (شکل ۱-ب). تحلیل همبستگی پیرسون بین غلظت‌های مختلف فلز روی و طول سر اسپرم در مدت زمان ۳۶ ساعت مواجهه، رابطه‌ی معنی‌داری نشان نداد ($r = 0.14$).



شکل ۱. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی افزایش نسبی طول سر اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*) تحت تأثیر ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلز روی (الف) به مدت سه ساعت مواجهه که سر اسپرم بدون بدشکلی را نشان می‌دهد و (ب) به مدت ۳۶ ساعت که بدشکلی سر و قطع تاژک را نشان می‌دهد ($\times 10000$).



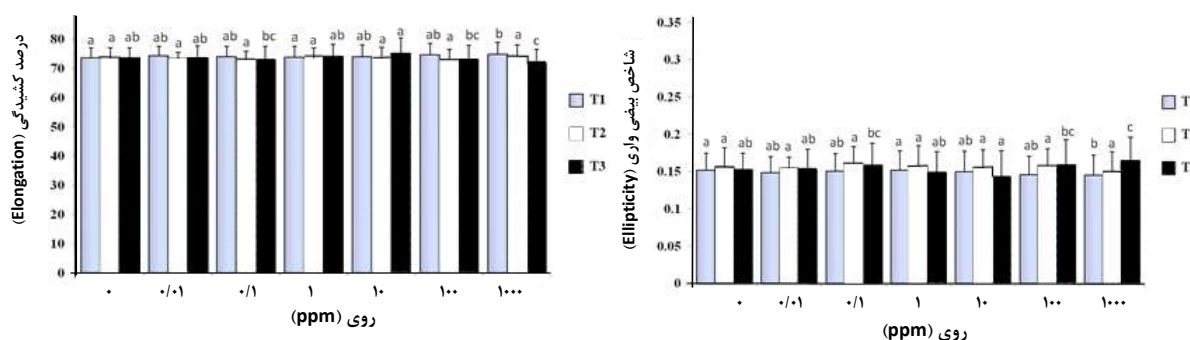
شکل ۲. اسپرم‌های مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*) قرار گرفته در معرض ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلز روی به مدت ۳۶ ساعت. (a) اندازه سر طبیعی، (b) افزایش طول سر و (c) کاهش طول سر. تخریب و پیچ‌خوردگی تازک به وضوح قابل مشاهده می‌باشد.

در زمان سه دقیقه مواجهه با فلز روی، میانگین عرض سر اسپرم در غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای دیگر نشان ندادند ($P>0.05$). هم‌چنین در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، درصد فراوانی در حال تشکیل اوج فراوانی در جهت افزایش عرض سر می‌باشد. تحلیل همبستگی پیرسون بین غلظت‌های مختلف فلز روی و عرض سر اسپرم در زمان سه دقیقه مواجهه، رابطه‌ی معنی‌داری نشان نداد ($r=0/031$). در زمان سه ساعت مواجهه با فلز روی تنها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، عرض سر نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0.05$). هم‌چنین بین غلظت‌های مختلف فلز روی از نظر عرض سر، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0.05$). تحلیل همبستگی پیرسون، بین غلظت‌های مختلف فلز روی و عرض سر اسپرم در زمان سه ساعت مواجهه، رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان داد ($r = 0/093^*$). در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، روند افزایشی عرض سر اسپرم شدیدتر شد، به‌طوری‌که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد، فراوانی ازدیاد عرض سر اسپرم افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$) و در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، نسبت به سایر غلظت‌ها افزایش معنی‌دار بود ($P<0.05$). تحلیل همبستگی پیرسون، بین غلظت‌های مختلف فلز روی و عرض سر اسپرم در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۱ درصد نشان داد ($r = 0/174^*$). سطح سر اسپرم در زمان سه دقیقه مواجهه با غلظت‌های مختلف فلز روی، اختلاف معنی‌داری را نسبت به یکدیگر و نسبت به تیمار شاهد نشان نداد ($P>0.05$). تنها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اختلاف نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود ($P<0.05$). اما نمودار درصد فراوانی در غلظت‌های مختلف نسبت به تیمار شاهد نامنظم‌تر بود. تحلیل همبستگی پیرسون، بین غلظت‌های مختلف فلز روی و سطح سر اسپرم در مدت زمان سه دقیقه مواجهه، رابطه معنی‌داری را نشان نداد ($r = 0/044$). در زمان سه ساعت مواجهه با غلظت‌های مختلف فلز روی، سطح سر اسپرم روند افزایشی پیدا کرد، به‌نحوی‌که این افزایش از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به بالا معنی‌دار بود ($P<0.05$). اما از غلظت صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر، اختلاف معنی‌داری در روند افزایشی سطح سر اسپرم مشاهده نشد ($P>0.05$). تحلیل همبستگی پیرسون بین غلظت‌های مختلف فلز روی و سطح سر اسپرماتوزویید در زمان سه ساعت مواجهه، یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۱ درصد ($r = 0/234^{**}$) نشان داد. در زمان ۳۶ ساعت مواجهه با غلظت‌های مختلف فلز روی، روند افزایشی سطح سر اسپرم بسیار شدید بود، به‌طوری‌که حتی در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. هم‌چنین بین غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌دار بود ($P<0.05$)، اما بین غلظت‌های بیش از ۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری در افزایش سطح سر اسپرم مشاهده نشد ($P>0.05$). تحلیل همبستگی پیرسون بین غلظت‌های مختلف فلز روی و سطح سر اسپرماتوزویید در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۱ درصد ($r=0/127^{**}$) را نشان داد.

با توجه به شکل ۳، شاخص کشیدگی سر اسپرم در زمان سه دقیقه مواجهه تنها در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$). هم‌چنین در زمان سه ساعت مواجهه، هیچ یک از تیمارها با یکدیگر دارای

اختلاف معنی‌دار نبودند ($P>0.05$). در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فلز روی، شاخص کشیدگی سر اسپرم تغییرات منظمی را نشان نداد. به‌طوری‌که بیشترین درصد کشیدگی، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و کم‌ترین آن در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و در سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار نبود ($P>0.05$) (شکل ۳).

تحلیل همبستگی پیرسون بین غلظت‌های مختلف فلز روی و شاخص بیضی واری، یک رابطه‌ی منفی و معنی‌دار در سطح ۵ درصد در زمان‌های سه دقیقه ($r=0.079^*$) و در زمان سه ساعت ($r=0.097^*$) نشان داد. هم‌چنین برای زمان ۳۶ ساعت یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۱ درصد ($r=0.128^{**}$) نشان داد. هم‌چنین تحلیل همبستگی پیرسون، یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۵ درصد، بین غلظت‌های مختلف فلز روی و درصد کشیدگی در زمان سه دقیقه ($r=0.081^*$) و سه ساعت ($r=0.1^*$) و یک رابطه‌ی منفی و معنی‌دار در سطح ۱٪ برای زمان ۳۶ ساعت ($r=0.127^{**}$) نشان داد.

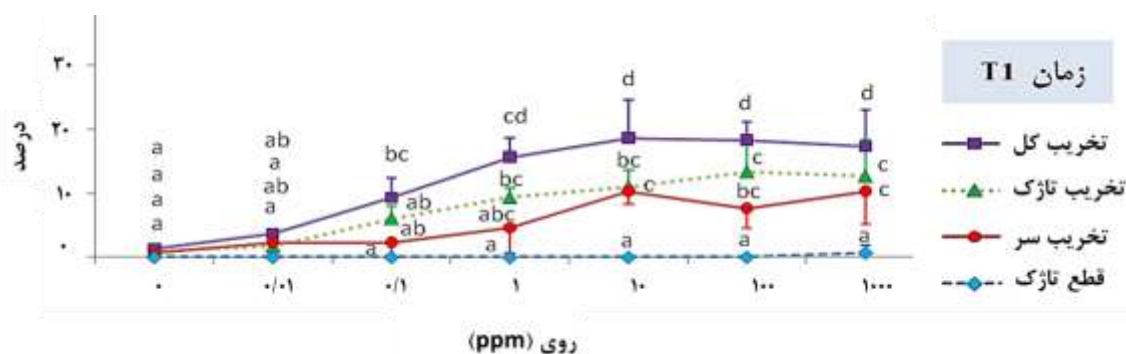


شکل ۳. الف): شاخص بیضی واری سر اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری (ب): میانگین درصد کشیدگی سر اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری تحت تأثیر غلظت‌های مختلف روی (T۱: زمان سه دقیقه مواجهه (n=۱۱۹۵)، T۲: زمان سه ساعت مواجهه (n=۱۲۸۰) و T۳: زمان ۳۶ ساعت مواجهه (n=۱۲۶۷) حروف غیر همسان در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P<0.05$).

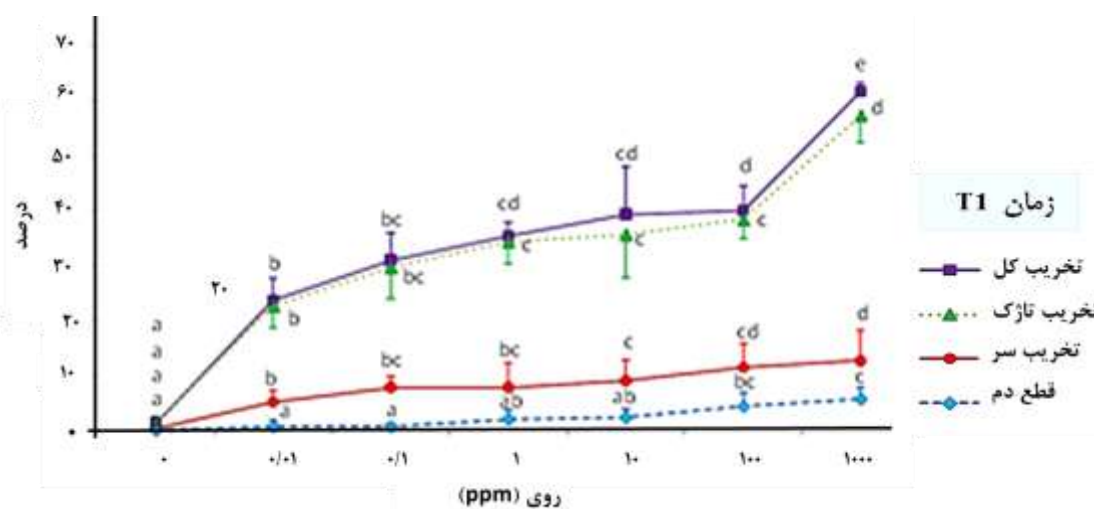
در زمان سه دقیقه مواجهه با فلز روی قطع تاژک در غلظت‌های مختلف مشاهده نشد. اما پیچ‌خوردگی تاژک با افزایش غلظت روی روندی افزایشی را نشان داد ($P<0.05$). در این زمان، سر اسپرم‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف روی مورد تخریب قرار گرفت، اما درصد آن نسبت به تخریب تاژک کم‌تر بود. تخریب کل در این زمان شامل تخریب سر و تاژک بود. تخریب کل از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$)، اما در غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری در تخریب کل اسپرم‌ها مشاهده نشد ($P>0.05$). تحلیل همبستگی پیرسون در زمان سه دقیقه مواجهه، رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین غلظت‌های مختلف فلز روی و درصد تخریب سر تاژک ($r=0.477^*$) نشان داد. اما رابطه‌ی معنی‌داری را بین غلظت‌های مختلف فلز روی و درصد قطع دم ($r=0.321$)، درصد تخریب تاژک ($r=0.414$) و درصد تخریب کل ($r=0.287$) وجود نداشت (شکل ۴).

در زمان سه ساعت مواجهه با فلز روی، قطع تاژک تنها در غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$). تخریب سر از تیمار ۰/۱ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$)، اما بین غلظت‌های مختلف افزایش درصد تخریب به‌کندی صورت گرفت به‌طوری‌که از غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به غلظت ۰/۱ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد و با افزایش غلظت، تنها در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، نسبت به غلظت ۱۰ تخریب سر به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($P<0.05$). تحلیل همبستگی پیرسون، یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۱ درصد بین غلظت‌های مختلف فلز روی در زمان سه ساعت مواجهه و درصد قطع تاژک ($r=0.647^{**}$)، درصد تخریب تاژک ($r=0.682^{**}$)، درصد تخریب کل ($r=0.697^{**}$) و هم‌چنین یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۵ درصد برای تخریب سر اسپرم ($r=0.530^*$) مشاهده شد (شکل ۵). در زمان ۳۶ ساعت مواجهه با فلز روی، درصد قطع تاژک و تخریب سر نسبت به زمان سه ساعت مواجهه اندکی افزایش پیدا کرد، اما پیچ‌خوردگی و تخریب تاژک به‌طور چشم‌گیری در تمامی غلظت‌ها

افزایش نشان داد. تخریب کل در این زمان متأثر از تخریب تاژک بود و از غلظت بیش از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به ۱۰۰ درصد رسید. قطع تاژک از غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار گشت ($P < 0.05$). تحلیل همبستگی پیرسون در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۱ درصد بین غلظت‌های مختلف فلز روی و درصد تخریب سر ($r = 0.616^{**}$) و یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار در سطح ۵ درصد برای درصد قطع تاژک ($r = 0.480^*$) نشان داد، اما بین غلظت‌های مختلف روی و درصد تخریب تاژک ($r = 0.232$) و درصد تخریب کل ($r = 0.235$) رابطه‌ی معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۶).



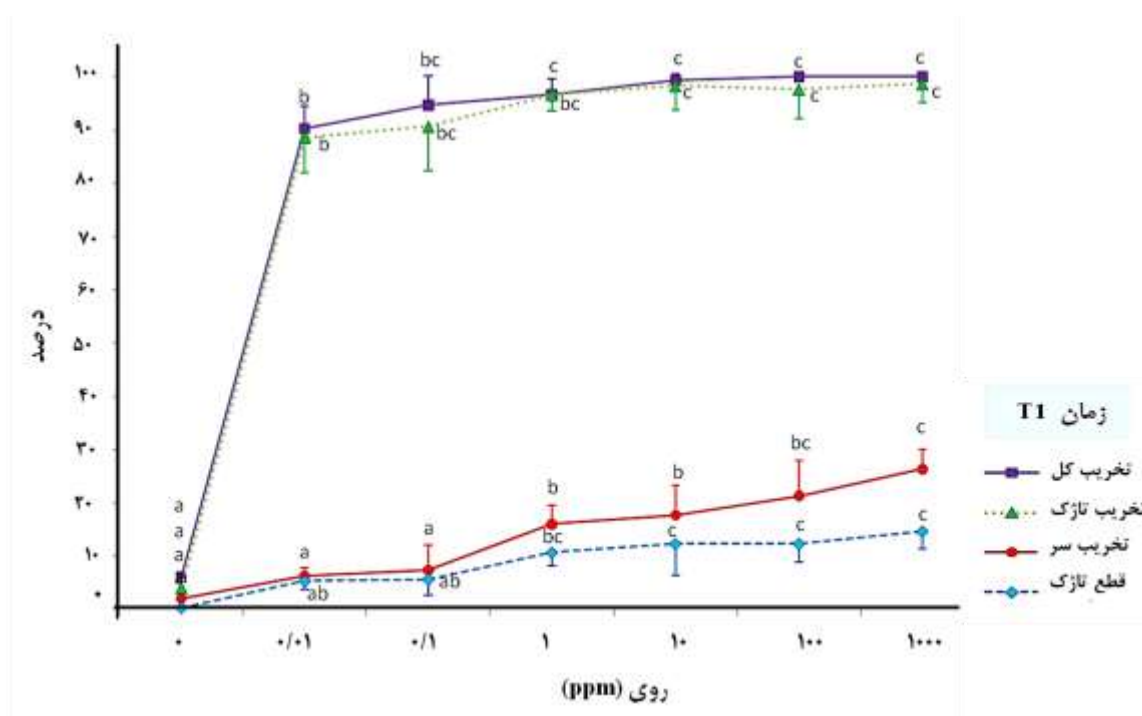
شکل ۴. درصد تخریب اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری تحت تأثیر غلظت‌های مختلف روی در زمان سه دقیقه مواجهه ($0.01 = 2.58$, $0.1 = 3.35$, $1 = 3.17$, $10 = 2.76$, $100 = 2.84$, $1000 = 2.36$ یا تعداد اسپرم‌های مورد شمارش - حروف غیر همسان در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است $(P < 0.05)$).



شکل ۵. درصد تخریب اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری تحت تأثیر غلظت‌های مختلف روی در زمان سه ساعت مواجهه ($0.01 = 24.5$, $0.1 = 34.2$, $1 = 33.5$, $10 = 17.4$, $100 = 26.2$, $1000 = 35.7$ یا تعداد اسپرم‌های مورد شمارش - حروف غیر همسان در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است $(P < 0.05)$).

بحث

تولیدمثل جنسی در ماهیان وابسته به تولید اسپرم‌هایی با کیفیت بالا می‌باشد. خسارات وارد شده به ساختار اسپرم توسط مواد شیمیایی و آلاینده‌ها می‌تواند موجب بزرگ یا کوچک شدن سر اسپرم، کوتاه شدن یا قطع تاژک، پیچ‌خوردگی سر اسپرم و یا پارگی غشا شود و در نتیجه قابلیت تحرک و لقاح اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Van Look and Kime, 2003).



شکل ۶. درصد تخریب اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری تحت تأثیر غلظت‌های مختلف روی در زمان ۳۶ ساعت مواجهه (۱۰۰۰=۱۸۳، ۱۰۰۰۰=۲۳۸) $P < 0.05$.
 Π : ۰=۲۱۸، ۰/۰۱=۲۹۸، ۰/۱=۳۴۲، ۱=۳۱۹، ۱۰=۲۶۴

بر اساس نتایج این تحقیق، در زمان سه دقیقه مواجهه اسپرم با فلز روی، قطع تاژک حداکثر یک درصد گزارش گردید. بنابراین در این زمان فلز روی حتی در بیشترین غلظت نیز قدرت قطع تاژک را نشان نداد. اما پیچ‌خوردگی، بدشکلی و کوتاه شدن تاژک از جمله موارد تخریبی مشاهده شده بود. هم‌چنین سر اسپرم نیز در زمان سه دقیقه مواجهه با آلاینده روی آثار تخریبی از خود نشان داد. Van Look و Kime (۲۰۰۳) گزارش نمودند که سر اسپرم ماهی طلائی (*Carassius auratus*) در تماس آنی با غلظت‌های مختلف جیوه تغییر معنی‌داری نشان ندادند، اما تاژک اسپرم‌ها نسبت به اسپرم‌های طبیعی کوتاه‌تر گشته و شکستگی و تابیدگی در آن‌ها مشاهده شد. هم‌چنین انکوباسیون اسپرم باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) به مدت ۱ تا ۲ دقیقه تحت تأثیر جیوه، سبب شکستگی، کوتاه شدن و ایجاد حالت حبابی شکل در تاژک گردید (Abascal et al., 2007). فلزات سنگین مانند مس، کادمیوم و روی با اتصال به پروتئین و یا آنزیم‌های مؤثر بر متابولیسم تاژک اسپرماتوزوییدها موجب تغییر ساختار تاژک، دژنره شدن پروتئین‌ها و توقف تحرک می‌شوند (Dietricha et al., 2010). در زمان سه ساعت مواجهه اسپرم با فلز روی و با افزایش غلظت، مساحت سر اسپرم افزایش یافت. افزایش اندازه سر اسپرم در اثر تماس با فلزات سنگین در این مطالعه می‌تواند در اثر از دست دادن قوام سر اسپرم به واسطه حضور فلز روی باشد. این پدیده به دلیل از هم باز شدن رشته‌های پیچیده DNA (Uncoil) و خروج محتویات از هسته که معمولاً به علت قطع ارتباط در پل‌های گوگردی حاصل می‌شود، ایجاد می‌گردد (Leno et al., 1996).

بر اساس نتایج در زمان سه ساعت مواجهه اسپرم با فلز روی قطع تاژک نسبت به زمان سه دقیقه افزایش پیدا کرد. تابیده شدن و پیچ‌خوردگی تاژک می‌تواند سبب فشردگی و کشش محوری در میکروتوبول و در نتیجه جدا شدن آن‌ها گردد که در نهایت سبب شکستن تاژک می‌شود (Au et al., 2001). تخریب کل در این زمان بیشتر متأثر از تخریب تاژک بود، بدین معنی که اسپرم‌ها با سر تخریب یافته و تاژک اندک بودند و اسپرم‌هایی که دارای سر تخریب یافته بودند، از نظر تاژک نیز دچار تخریب شده بودند. نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تماس فلز روی با اسپرم علاوه بر تغییر در ساختارهای فیزیولوژیک اسپرم‌ها (مانند اختلال در فاکتورهای حرکتی اسپرم و اختلال در سیستم تنفسی) (Bradl, 2005; Ebrahimi, 2005; Kim et al., 2001)، باعث ایجاد نواقص ساختاری و آناتومیکی نیز می‌گردد.

هنگامی که اسپرم‌ها به مدت ۳۶ ساعت تحت تأثیر فلز روی انکوبه شدند، کاهش طول سر با افزایش غلظت تغییرات معنی‌داری نشان نداد زیرا در کم‌ترین غلظت نیز کاهش طول شدید بود. اسپرم‌ها تحت تأثیر فلز روی، تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش طول را نشان دادند اما در غلظت‌های بالاتر طول سر کاهش پیدا نمود، اما عرض سر با افزایش غلظت افزایش پیدا نمود. مساحت سر اسپرم‌های تحت تأثیر با فلز روی در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، نسبت به زمان‌های دیگر افزایش پیدا کرد. به عبارت دیگر در صورتی که شدت تخریب اسپرم، از حد خاصی فراتر رود، روند افزایشی اندازه‌ی سر اسپرم متوقف گشته و روند کاهش‌ی آغاز می‌گردد. در مواجهه با فلز روی نیز تنها در غلظت‌های بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روند کاهش‌ی آغاز می‌شود، اما شدت تخریب سبب نشد که اندازه‌ی اسپرم نسبت به تیمار شاهد کاهش یابد. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر فلز جیوه در مدت ۲۴ ساعت بر روی اسپرم ماهی طلائی انجام شده بود، نتایج نشان داد که تا غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، طول، عرض و مساحت سر اسپرم افزایش می‌یابد، اما با افزایش غلظت به ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، طول، عرض و مساحت سر اسپرم روند کاهش‌ی دارد (Van Look and Kime, 2003).

بر اساس نتایج، تخریب تاژک در غلظت‌های انتهایی، ۱۰۰ درصد بود. با این‌که تاژک در بسیاری از اسپرم‌ها هنوز به طور کامل قطع نشده بود، اما پیچ‌خوردگی شدید، کلافی شکل شدن، شکستگی‌های فراوان در تاژک، کوتاه شدن و تحلیل تاژک تقریباً در تمامی غلظت‌ها وجود داشت. بنابراین تخریب کل در این زمان تحت تأثیر تخریب تاژک بود و مانند تخریب تاژک ۱۰۰ درصد گزارش گردید. فلزات سنگین قادر به تجمع در بافت‌های جانوران بوده و در فرآیند توسعه اسپرم نیز تأثیرات منفی بر جا خواهند گذاشت (Ebrahimi, 2005). بررسی تأثیر فلزات سنگین بر خصوصیات ریخت‌شناختی در تمامی ماهیان باید به صورت جداگانه صورت گیرد؛ چون این امکان وجود دارد که تنها یکی از این خصوصیات تحت تأثیر آلاینده‌ها باشند و میزان تأثیرپذیری آن‌ها نیز در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد (Kime, 1995). تجمع مواد سمی در بیضه‌ی ماهیان علاوه بر آتروفی سلول‌های لایدیگ، می‌تواند موجب کاهش سطح سنتز هورمون‌های جنسی گردد. کاهش اندازه و تعداد سلول‌های زایا و ژرمینال فعال و کاهش قطر مجاری اسپرم‌ساز از دیگر تأثیرات سموم بر بیضه ماهیان می‌باشد (Dutta and Arends, 2003). با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، مشخص گردید که فلز روی می‌تواند از طریق ایجاد نواقص ریختی در ساختار اسپرم، موفقیت تولیدمثلی مارماهی دهان‌گرد خزری را در محیط‌های آلوده به شدت تحت تأثیر قرار دهد. هنگامی که در شبیه‌سازی تجمع فلز روی در بافت بیضه، اسپرم‌ها مدت زمان بیشتری تحت تأثیر این آلاینده قرار گرفتند، تخریب ساختار اسپرم شدت گرفت به طوری که با افزایش زمان مواجهه تقریباً تمامی اسپرم‌ها حتی در غلظت‌های کم، به شدت آسیب دیده و کاملاً از حالت طبیعی خارج شده بودند. بنابراین تماس با هرگونه آلودگی در تمامی مراحل زندگی، به خصوص در فصل تولیدمثل، حتی در غلظت‌های اندک نیز می‌تواند موفقیت تولیدمثلی این گونه را تحت تأثیر قرار داده و از بقای این ماهی در معرض خطر بکاهد.

منابع

- Abascal, F.J., Cosson, J., Fauvel. C. 2007. Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology*. 70: 509-522.
- Au, D.W.T., Reunov, A.A., Wu, R.S.S. 2001. Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: effects on sperm development. *Environmental Pollution*. 111: 11-20.
- Berg, J.M., shi, Y. 1996. The galvanization of biology: a growing appreciation for roles of zinc. *Science*. 271: 1050-1081.
- Bradl, H.B. 2005. *Heavy Metals in The Environment*. Academic Press. 269 p.
- Brito, L.F.C. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 6: 249-264.
- Clark, R.B. 1986. *Marine pollution*. Clarendon Press. Oxford. pp. 64-82.
- Close, D.A., Fitzpatrick, M.S., Li, H.W. 2002. The ecological and cultural importance of a species of extinction Pacific lamprey. *Fisheries*. 27: 19-25.

- Dietricha, G.J., Dietricha, M., Kowalskia, R.K., Doboszb, S., Karola, H., Demianowicza, W., Glogowska, J. 2010. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicology*. 97: 277-284.
- Dutta, H.M., Arends, D. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*. 91: 157-162.
- Ebrahimi, M. 2005. Effect of in vivo and in vitro zinc and cadmium treatment on sperm steroidogenesis of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Iranian Journal of Veterinary Research*. 6: 54-61.
- Eisler, R. 1988. Zinc hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. US fish wildlife serve. *Biological Report*. 85: 1-14.
- Erickson, R.J., Nichols, J.W., Cook, P.M., Ankley, J.T. 2008. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. In: Di Giulio, R., Hinton, D. (eds.). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press. New York. pp. 9-54.
- Geyer, H.J., Rimkus, G.G., Scheunert, I., Kaune, A., Schramm, K.W., Kettrup, A., Zeeman, M., Muir, D.C.G., Hansen, K.G., Mackay, D. 2001. Bioaccumulation and Occurrence of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), Persistent Organic Pollutants (POPs), and Other Organic Compounds in Fish and Other Organisms Including Humans. Springer-Verlag. Berlin. 166 p.
- Hela, D.G., Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A. 2005. Environmental monitoring and ecological risk assessment for pesticide contamination and effects in Lake Pamvotis, northwestern Greece. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24: 1548-1556.
- Kim, D.E., Van look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangüa, E., Olleveir, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology and Pharmacology*. 130: 425-432.
- Kime, D.E. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 5: 52-96.
- Kobayashi, W., Yamamoto, T. S. 1994. Fertilization in lamprey, lampetra japonica eggs: implications of the presence of fast and permanent blocks against polyspermy. *Zoological Science*. 269: 166-167.
- Leno, G.H., Mills, A.D., Philpott, A., Laskey, R.A. 1996. Zyperphosphorylation of nucleoplasmin facilitates Xenopus sperm decondensation at fertilization. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 7253-7256.
- Linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L. 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrineclus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathulla* Walbaum, 1797). *Journal of Fish Biology*. 97: 902-909.
- Psenicka, M., Hadi Alavi, S.M., Rodina, M., Gela, D., Nebesarova, J., Linhart, O. 2007. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. *Biology of the Cell*. 99: 103-115.
- Rajaei, Q., Hasanpour, M., Mehdinejad, M.H. 2012. Heavy metals concentration (zinc, lead, chrome and cadmium) in water and sediments of Gorgan Gulf and Estuarine Gorganroud River, Iran. *Journal of Health System Research*. 8(5): 748-756.
- Sadeghi, P., Attaran Fariman, G., Kasalkhe, N. 2017. Evaluation the Effects of Sub-lethal concentrations of Zinc Chloride on hepatic enzymes activity in grey mullet (*Mugil Cephalus*) in vitro. *Journal of Aquatic Ecology*. 6(4): 117-123. (in Persian)
- Shanbehzadeh, S., Vahid Dastjerdi, M., Hassanzadeh, A., Kiyanzadeh, T. 2013. Investigation of Heavy metals in water and sediment on Massjed soleymanTembi river before and after of wastewater entrance. *Health System Research Journal*. 9(10): 1108-1116. (in Persian)
- Satari, M., Shahsavani, D., Shafiei, S.H. 2002. *Systematic Ichthyology*. Hagh Shenan. 220 p. (In Persian)
- Van Look, K.J.W., Kime, E. 2003. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology*. 63: 1020-1033.