زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۳۴-۲۵

مقاله پژوهشی

تاثیر حشره‌کش موونتو بر میزان باروری در موش‌های کوچک سفید آزمایشگاهی نر

قدرت عبادی مناس*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، صندوق پستی ۸۸۹-۱۴۶۶۵، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: ebadimanas@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱

DOI: 10.22034/ascij.2023.1991328.1511

چکیده

در عصرحاضر به دلیل استفاده بی‌رویه از سموم و مقاوم شدن آفات نسبت به آنها ، هر سال نوع جدیدی از سموم تولید و وارد بازار می‌شود. مونتو، جدیدترین حشره‌کشی است که امروزه در باغات پسته، برای کنترل آفت پسیل مورد استفاده قرار می‌گیرد که عوارض جانبی آن بر روی سیستم تولیدمثلی مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر مونتو برروی قابلیت باروری در موش‌های کوچک سفید نر آزمایشگاهی بود. در این تحقیق تعداد ۱۸ موش نر بالغ و سالم تهیه و در شرایط استاندارد نگهداری شد. موش‌ها به طور تصادفی به دو گروه تجربی و کنترل تقسیم شدند. هر گروه شامل ۹ موش بود. گروه تجربی سم مونتو را به مقدار ۷۹ میلی‌گرم/کیلوگرم و گروه کنترل به همان نسبت آب مقطر را به صورت روزانه و به مدت ۶۰ روز از طریق دهانی بوسیله گاواژ دریافت نمودند. در پایان آزمایش موش‌ها با تزریق مخلوطی از زایلازین و کتامین، آسان کشی و دم اپیدیدیم بیضه موش‌ها جدا و در محیط کشت HTF قرار داده شد. تعداد اسپرم، قابلیت زنده ماندن اسپرم، میزان شکستگی DNAی اسپرم، تعداد اسپرم‌های نابالغ و توانایی لقاح اسپرم‌ها در محیط آزمایشگاهی ، تعداد جنین دو سلولی و تعداد بلاستوسیت ارزیابی شد. داده‌های حاصل از تحقیق به روش ANOVA بررسی و تحلیل آماری شد. یافته‌ها نشان داد در گروه تجربی نسبت به کنترل ؛ تعداد اسپرم‌های زنده، درصد اووسیت‌های لقاح یافته، تعداد جنین دوسلولی و چهار سلولی و تعداد بلاستوسیت به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. همچنین تعداد اسپرم گروه تجربی نسبت به کنترل کاهش یافته ولی معنی‌دار نبود. اما تعداد اسپرم های نابالغ و شکستگی در رشته DNA گروه تجربی نسبت به کنترل بطور معنی‌داری افزایش یافته بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت سم مونتو با آسیب DNA و کروماتین اسپرم موجب کاهش باروری در موش می‌شود.

کلمات کلیدی: حشره‌کش، مونتو، باروری، جنین، موش نر.

مقدمه

انسان همیشه در پی راه‌های برای مقابله با بیماری‌ها و آفاتی بوده که موجب کاهش محصولات کشاورزی می‌شوند. در گذشته انسان‌ها از مواد معدنی و گیاهی طبیعی برای کنترل آفات استفاده می‌کرده، امّا امروزه از سموم شیمیایی برای کنترل بسیاری از بیماری‌ها و آفات کشاورزی استفاده می‌کنند و به دلیل مقاومت آفات در برابر سموم روز به روز انواع جدیدتری توسط کارخانجات تولید و وارد بازار می‌شود که عوارض ناخواسته زیادی بر روی محیط زیست و انسان دارد و تحقیقات لازم در مورد عوارض همه جانبه آنها صورت نگرفته و همین امر موجب نگرانی‌های سازمان بهداشت جهانی در این زمینه شده است (۶). سم مونتو یکی از جدیدترین حشره‌کشی است که درحال حاضر توسط کشاورزان برای کنترل

جمعیت پسیل در باغات پسته بطور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. مونتو از اسید تترامیک مشتق شده و متعلق به گروه کتونول و با نام علمی اسپیروتترامات، منحصراً توسط شرکت بایر آلمان تولید می‌شود. با توجه به جدید بودن سم مونتو تحقیقات محدودی درباره آن انجام گرفته که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد. تحقیقات نشان داده مونتو پس از سمپاشی بطور مستقیم وارد آوند آبکش می‌گردد و از طریق شیره پرورده به تمام قسمت‌های گیاه منتقل می‌شود . این سم تاثیر زود هنگام روی حشره نداشته بلکه چند ساعت پس از سمپاشی، تغذیه آفات از گیاه متوقف شده و علائم تاثیر سه روز پس از سمپاشی مشاهده می‌شود. همچنین از تمامی حشره‌کش‌های موجود در بازار دوام بیشتری دارد (۱۷). تحقیقات دیگری در این زمینه مشخص کرده که مونتو پس از جذب برگی در گیاه در داخل آوندها به فرم انولی خود تجزیه می‌شود و به عنوان یک اسید ضعیف در داخل گیاه به مدت نسبتاً طولانی باقی می‌ماند (۱۶). در مورد مکانیسم اثر مونتو، بل و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کرده مونتو تنها حشره‌کش برگی است که از طریق خوراکی وارد دستگاه گوارشی حشره شده و موجب اختلال در بیوسنتز لیپیدها و عملکرد آنزیم استیل کوآنزیم کربوکسیلاز در حشرات می‌شود و عمدتا در حشرات نابالغ موثرتر است (۳). مطالعات در زمینه زمان مناسب استفاده از مونتو برای کنترل حشرات آشکار کرده که مونتو به دلیل نحوه عملکرد خود، در مرحله اولیه رشد حشرات مکنده بسیار موثر است و در حشرات ماده بالغ، این ترکیب به طور قابل توجهی باروری را کاهش می دهد و در نهایت مرگ حشره را در پی خواهد داشت (۹).

تحقیقات درباره اثر مونتو بر روی موش‌های صحرایی نشان داده که مونتو در این حیوانات موجب کاهش تحرک و جابجایی اسپرم، افزایش اسپرم‌های غیر طبیعی ، کاهش وزن ، اختلال در هورمون‌های تیروئیدی، مغز ، تیموس و سیستم تولیدمثلی می‌شود (۱۹). به علاوه مطالعه دیگری نشان داده که مونتو در موش‌های صحرایی باعث بروز علائم مسمومیت مانند دوبینی، اسهال، ترشح بزاق، آتاکسی، تشنج و خونریزی، افزایش ترانس آمینازها، و تغییرات بافتی در کبد و در نهایت موجب مرگ ۳۵ درصد شده است (۵).

درباره اثر مونتو بر روی موش‌های کوچک سفید آزمایشگاه گزارش شده که در موش‌های ماده موجب تغییر سطح هورمون‌های جنسی و ایجاد تغییر در ساختار فولیکول‌های تخمدانی و القاء آسیب به سیستم تولیدمثلی ماده می‌شود (۱۱). مونتو بر روی جوندگان نیز موثر بوده بطوری که نتایج مطالعات آشکار کرده که حشره‌کش مونتو تأثیر قابل‌توجهی بر روی پارامترهای بیوشیمیایی از جمله گلیسمی، کلسترول، تری‌گلیسیرید، اوره، کراتینین، هورمون آدرنوکورتیکوتروپین و استیل کولین استراز دارد (۲). تحقیقات دیگری نشان داده که مونتو تاثیر قابل توجهی بر روی سنین پورگی آفت (۲۰) داشته و در کنترل سفید بالک جالیز دارد خیلی موثر است (۸).

با توجه به عدم مطالعه عوارض جانبی احتمالی مونتو بر روی باروری و مراحل اولیه رشد جنین، هدف تحقیق حاضر بررسی تاثیرات مونتو بر روی قابلیت باروری در موش‌های کوچک سفید آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این کار تحقیقاتی، تعداد ۱۸ موش کوچک سفید آزمایشگاهی، با محدوده وزنی ۲±۲۴ گرم و با ظاهر کاملاً سالم از حیوان‌خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه و استفاده شد. برای

سازش با محیط آزمایشگاه به مدت ۱۰ روز قبل از شروع مطالعه در حیوان خانه نگهداری شدند. در طی این مدت موش‌ها از کنسانتره تغذیه و از شیشه‌های مخصوص آب می‌نوشیدند. تمام شرایط استاندارد از جمله ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، همچنین دما در محدوده ۲۱-۲٤ تحت کنترل بود. موش‌ها بطور تصادفی به دو گروه آزمایش و کنترل تقسیم شدند. هر گروه ۹ موش داشت. گروه آزمایش دوز ۷۹ میلی‌گرم/کیلوگرم از سم موونتو و گروه کنترل به همان نسب آب مقطر را به صورت روزانه به مدت ٦۰ روز از طریق دهان بوسیله گاواژ دریافت می‌کردند. همه بررسی‌ها براساس قوانین کمیته نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه (۵۰۲۰۱/۵۰۹/۲٤۰) انجام شد.

تهیه اسپرم: در پایان مطالعه برای تهیه اسپرم و بررسی آن، براساس قوانین کمیته اخلاقی آزمایشگاه ارومیه با تزریق مخلوطی از زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، موش‌ها آسان کشی شدند. اپیدیدیم موش‌های تجربی و کنترل زیر استرئومیکروسکوپ با بزرگنمایی ۲۰ برابر از بافت بیضه جدا شد.. اپیدیدیم‌های هر دو بیضه پس از جدا شدن در یک میلی‌لیتر محیط کشت HTF+4 mg/ml BSA با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که امروزه به عنوان محیط کشت مناسب برای اسپرم‌ها در نظر گرفته می‌شود قرار داده شد. بعد به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شد. سپس با خرد کردن اپیدیدیم اسپرم‌ها از آن آزاد شدند.

شمارش تعداد اسپرم: تعداد اسپرم‌های دم اپی‌دیدیم با استفاده از لام هموسیتومتری اندازه‌گیری شد (۲۱). برای شمارش اسپرم‌ها رقت ۱ به ۲۰ از اسپرم مذکور تهیه شد. به این صورت که در داخل یک میکروتیوب ۱ میلی لیتری ۱۹۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته و بعد به آن ۱۰ میکرولیتر از اسپرم مورد نظر افزوده شد سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر برداشته شده و بر روی لام نئوبار که لامل سنگی از قبل بر روی آن قرار داده شده ریخته شد و شمارش تعداد اسپرم‌ها به این روش صورت می‌گیرد. اسپرم ۵ قسمت مشخص از لام هموسیتومتری شمارش و با استفاده از فرمول زیر تعداد واقعی اسپرم بدست می‌آید. تعداد اسپرم = عکس رقت × ۵۰۰۰۰ × عدد بدست آمده از۵ مربع

قابلیت زنده ماندن اسپرم: رنگ‌آمیزی ائوزین ـ نگروزین برای بررسی اسپرم‌های زنده از مرده انجام گرفت. اصول این کار بر این استوار است که در اثر آسیب به غشاء پلاسمایی، اسپرم‌ها در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می‌شوند. لذا آن دسته از اسپرم‌هایی که هر یکی از قطعات سر، گردن و یا دم آنها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم‌های مرده اطلاق شدند. برای این منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم مورد نظر را در روی یک لام تمیز با ۲۰ میکرولیتر از محلول ائوزین حل نموده و پس از گذشت ۲۰-۳۰ ثانیه ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگی نگروزین به آن اضافه شد و پس از تهیه اسمیر از محلول مورد نظر و خشک شدن لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ٤۰ × درصد اسپرم‌های زنده (بی‌رنگ) واسپرم‌های مرده (رنگ گرفته) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از اسپرم‌های با درصد بالای ۸۰ درصد اسپرم زنده استفاده شد.

ارزیابی اسپرم‌های بالغ از نابالغ: برای بررسی میزان آسیب شبکه کروماتین هسته اسپرم از رنگ‌آمیزی آنیلن ـ بلو استفاده شد. اساس این آنالیز بر این استوار است که در طی مرحله اسپرمیوژنز، پروتامین بجای هیستون در کروماتین هسته قرار می‌گیرد که این جایگزینی در تراکم و پایداری اسپرم بسیار با اهمیت است. آنیلین بلو بطور اختصاصی با اسید آمینه لیزین هیستون هسته‌ای واکنش می‌دهد. اگر اسپرم نابالغ

باشد چون غنی از لیزین هستند در اثر واکنش رنگ آبی به خود می‌گیرد. از طرفی اسپرم‌های بالغ غنی از اسید آمینه آرژینین و سیستئین هستند و لیزین کمی دارند لذا رنگ آبی نمی‌گیرند. یک قطره اسپرمی تهیه و روی لام‌های شیشه‌ای پخش شد پس از خشک شدن به مدت ۳۰ دقیقه در گلوتارآلدئید ۳ درصد تثبت، سپس با آنیلین بلو ۵ درصد رنگ‌آمیزی و با اسید استیک ٤ درصد ترکیب و بعد از ۷ دقیقه بوسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

ارزیابی میزان آسیب DNAی اسپرم: برای بررسی میزان آسیب DNAی اسپرم، یک قطره از مایع اسپرمی روی لام‌های شیشه‌ای پخش و بعد از خشک شدن لام‌ها در متانول و اسیداستیک با نسبت ۳:۱ تثبت شدند. سپس اسلایدها با محلول آکریدین ـ اورنج ۱۹ درصد در سیترات فسفات به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. برای بررسی میزان آسیب DNAی اسپرم‌ها، اسلایدها با میکروسکوپ فلورسانس و با عدسی ۱۰۰ Xارزیابی شد و در نهایت سه نوع الگو مشخص شد: اسپرم‌های با DNAی دورشته‌ای (سبز رنگ) و اسپرم‌های با DNAی تک رشته‌ای با رنگ‌های قرمز و زرد (۱۵).

ارزیابی میزان باروری آزمایشگاهی: موش‌های گروه کنترل و تجربی جهت گرفتن اووسیت بالغ تحت تحریک تخمدانی قرار گرفتند. برای تحریک تخمدان و تخمک‌گیری، ۱۰ واحد هورمون PMSG (pregnant Mare serum Gonadotropin)، ساخت شرکت Folligon، هلند به صورت درون صفاقی به موش‌های گروه کنترل و آزمایش تزریق شد. بعد از ٤۸ ساعت ۱۰ واحد هورمون HCG (Human Chorionic Gonadotropin) ساخت شرکت Folligon، هلند تزریق شد. عمل تخمک‌گذاری معمولا ۱۰-۱۲ ساعت پس از تزریق HCG صورت می‌گیرد. ۱۰ـ۱۲ ساعت بعد از تزریق HCG، موش‌ها با تزریق مخلوطی از زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، آسان کشی شدند. قسمت آمپولای لوله‌های رحمی جدا و در ظرف پتریدیش محتوی محیط کشت HTF + ٤ میلی-گرم/میلی‌لیتر BSA با ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. با استفاده از روش Dissecting، تخمک‌ها از بخش آمپولا خارج و پس از شستشو با HTF تخمک‌ها را با قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF حاوی ٤ میلی-گرم/میلی‌لیتر BSA انتقال داده شد. میکروقطره‌های حاوی اسپرم‌های سالم در محیط کشت HTF + ٤ میلی‌گرم/میلی‌لیتر BSA تهیه شدند. بعد از ٤ـ۵ ساعت انکوباسیون لقاح انجام شد. عمل لقاح با مشاهده دو پیش هسته مشخص می‌شود. اووسیت‌های لقاح یافته ، بعد از دنود (لخت) و شستشو برای ادامه تقسیمات زیگوت به قطره‌های محیط کشت HTF + ٤ میلی-گرم/میلی‌لیتر BSA تازه‌ای منتقل شدند. روی تمام قطرات با روغن معدنی مخصوصی پوشیده شد. اووسیت‌های لقاح‌یافته و لقاح‌نیافته بوسیله میکروسکوپ اینورت جداسازی شد. بعد از لقاح، زیگوت‌ها سه مرتبه با محیط کشت KSOM (potassium simplex optimized medium) شستشو و به مدت پنج روز در انکوباتور قرار داده و بعد از ۲٤ ساعت از کشت زیگوت جنین دو سلولی و در روز ۵ مرحله بلاستوسیست بوسیله میکروسکوپ کنتراست بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: بررسی و تحلیل آماری یافته‌های حاصل از تحقیق با روش ANOVA و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد مقایسه میانگین‌ها با $p <$ ۰/۰۵ و با درنظر گرفتن انحراف معیار انجام گرفت.

نتایج

خصوصیات اسپرم: بررسی اسپرم‌های مرده از زنده بوسیله رنگ آمیزی ائوزین ـ نگروزین مشخص کرد که قابلیت زنده بودن اسپرم‌های گروه تجربی (۲/۸۱ ± ۶۰/۱۱) در مقایسه با گروه کنترل (۲/۲۴ ± ۷۹/۶۴) به طور معنی‌داری کاهش یافته است این اسپرم‌های مرده با سر قرمز مشخص قابل تشخیص بود. به علاوه در گروه تجربی، تعداد اسپرم‌های غیرعادی نیز قابل توجه بود (جدول ۱، شکل۱ـA) ($p < ۰/۰۵$). بررسی میزان آسیب‌های موجود در ساختار مولکول DNAی کروماتین اسپرم بوسیله رنگ آمیزی آکریدین ـ اورنج نشان داد که گروه تجربی (۳۴ /۳ ±۱۹/۳۲) در مقایسه با کنترل (۰/۲۵ ±۱۲/۰۱) به صورت معنی‌داری تعداد اسپرم‌ها با شکستگی در مولکول DNAی دورشته‌ای بیشتری دارد (جدول ۱، شکل۱ـB) ($p < ۰/۰۵$). بررسی بلوغ هسته اسپرم بوسیله رنگ آمیزی آنیلین ـ بلو نشان داد که تعداد اسپرم با هسته نابالغ در گروه تجربی(۰/۶۲ ± ۴۵/۰۱) نسبت به گروه کنترل (۱/۲۱ ± ۳۰/۵۱) به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. به علاوه در اسپرم‌های نابالغ قطرات سیتوپلاسمی نیز قابل مشاهده بود(جدول ۱، شکل ۱ـC) ($p < ۰/۰۵$).

تحلیل آماری نتایج حاصل از شمارش تعداد اسپرم‌ها بوسیله لام هموسیتومتری استاندارد نشان داد که تعداد اسپرم گروه تجربی (۱/۱۶ ± ۳۵/۱۳) در مقایسه با گروه کنترل (۲/۹ ± ۵۰/۲۸) کاهش یافته بود ولی معنی دار نبود. (جدول ۱، شکل ۱ـC) ($p > ۰/۰۵$).

تاثیر مونتو بر لقاح و مراحل اولیه رشد جنین: نتایج حاصل از آزمایش در محیط آزمایشگاه نشان داد که تعداد تخمک‌های لقاح یافته بوسیله اسپرم‌های استخراج شده از گروه تجربی (۱/۶۱ ± ۴۵/۵۱)، در مقایسه با تعداد تخمک‌های لقاح یافته بوسیله اسپرم‌های استخراج شده از گروه کنترل (۰/۳۲ ± ۷۸/۴۳)، به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. همچنین نتایج حاصل از بررسی و تحلیل تعداد جنین دوسلولی نشان داد که گروه تجربی (۱/۵۲ ± ۳۲/۲۱) در مقایسه با گروه کنترل (۱/۳۲ ± ۶۵/۱۱) بطور معنی داری کاهش یافته است. بعلاوه بررسی نتایج مشخص کرد در گروه تجربی (۱/۶۲ ± ۲۴/۷۱) تعداد جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند در مقایسه با گروه کنترل (۱/۹۱ ± ۵۹/۶۲) بطور معنی‌داری کاهش یافته بود (جدول ۲، شکل ۲) ($p < ۰/۰۵$).

جدول۱ـ مقایسه میانگین انواع پارامترهای اسپرم گروه‌های تجربی و کنترل(Mean± SE)

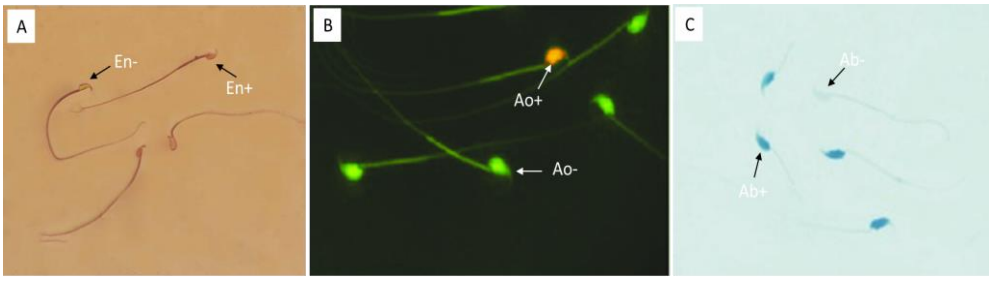
خصوصیات اسپرم	کنترل	گروه تجربی
شکستگی DNA	۱۲/۰۱± ۰/۲۵	۱۹/۳۲± ۳/ ۳۴*
قابلیت زنده بودن اسپرم	۷۹/۶۴± ۲/۲۴	۶۰/۱۱± ۲/۸۱*
اسپرم‌های نابالغ	۳۰/۵۱± ۱/۲۱	۴۵/۰۱± ۰/۶۲*
تعداد اسپرم	۵۰/۲۸±۲/۹	۳۵/۱۳±۱/۱۶

*= معنی‌دار بودن آن نسبت به گروه کنترل است(P<۰/۰۵)

جدول۲ـ مقایسه میانگین مراحل مختلف رشد جنین گروه‌های تجربی و کنترل(Mean± SE)

مراحل رشد جنین (٪)	کنترل	تجربی
اووسیت‌های لقاح یافته	۷۸/۴۳±۰/۳۲	۴۵/۵۱±۱/۶۱*
جنین دوسلولی	۶۵/۱۱±۱/۳۲	۳۲/۲۱± ۱/۵۲*
بلاستوسیست	۵۹/۶۲±۱/۹۱	۲۴/۷۱±۱/۶۲*

*= معنی‌دار بودن آن نسبت به گروه کنترل است ($p < ۰/۰۵$)



شکل ۱ـ تاثیر موونتو بر روی خصوصیات مختلف اسپرم‌ها با درشت نمایی x۱۰۰۰

A ـ اسپرم‌های رنگ آمیزی شده با ائوزین ـ نگروزین (En^- ـ اسپرم زنده به رنگ روشن ، En^+ ـ اسپرم مرده به رنگ قرمز B ـ اسپرم‌های رنگ آمیزی شده با آکریدین ـ اورنج(Ao^- ـ اسپرم با رشته DNAی سالم Ao^+ ـ اسپرم‌های با رشته DNAی آسیب دیده) C ـ اسپرم‌های رنگ آمیزی شده با آنلین ـ بلو(Ab^- ـ اسپرم بالغ به رنگ روشن ؛ Ab^+ ـ اسپرم نابالغ به رنگ آبی)

شکل۲ ـ تاثیر موونتو بر لقاح و مراحل رشد جنین در آزمایشگاه (اینورت میکروسکوپ ۲۰۰x)

A ـ تصویر اووسیت بارورنشده (شماره ۱) و اووسیت بارورشده (شماره ۲)؛ B ـ تصویر تعدادی جنین دوسلولی (شماره۱) و یک عدد جنین در مرحله ٤ سلولی؛ C ـ تصویر جنین در مرحله مورولا (شماره ۲) و جنین در مرحله بلاستوسیت(شماره ۱) همچنین تعدادی جنین فرگمنته

بحث

در دنیای امروز کشاورزان و دامداران برای افزایش محصولات و درآمد خود ، برای مبارزه با انواع آفات از سموم مختلف استفاده می‌کند و به خاطر مقاوم شدن آفات نسبت به سموم هرسال جدیدترین آن وارد بازار می‌شود که عوارض جانبی آنها بر کسی پوشیده نیست. از مهمترین مواد شیمیایی پرمصرف در محیط زیست ، حشره‌کش‌ها هستند (۱۲). یکی از حشره‌کشی‌هایی که جدیداً تولید و وارد بازار شده وتوسط کشاورزان به صورت گسترده استفاده می‌شود، موونتو است. این سم با نام علمی اسپیروتترامات و مشتق از اسید تترامیک است (٤) که بعد از ورود به بافت گیاهی هیدرولیز شده و به صورت الکلی در آمده (١٤) و به عنوان بازدارنده استیل کوآ کربوکسیلاز یا بازدارنده بیوسنتز لیپید درحشرات عمل می‌کند. (۳). اثرات موونتو بر روی سیستم تولید مثلی موش‌ها ناشناخته است. بنابراین هدف این تحقیق بررسی تاثیر سم موونتو بر روی کیفیت باروری در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی بود. بررسی و تحلیل یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که تعداد اسپرم‌های موش‌هایی که تحت تاثیر موونتو بودند نسبت به گروه کنترل کاهش یافته ولی این کاهش معنی‌دار نبود. دلیل احتمالی آن اثر منفی موونتو بر روی فعالیت سلول‌های لیدیگ و کاهش تولید هورمون تستوسترون و در نهایت کاهش اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم ساز است اما با توجه به کم بودن مدت زمان اثر و همچنین کم بودن دوز دریافتی توسط موش‌ها کاهش

تعداد اسپرم معنی‌دار نبوده است. در همین راستا اسوردراپ و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کرده سم موونتو در موش‌های صحرایی موجب کاهش تحرک و جابجایی اسپرم و افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی شده است (۱۹). همچنین کابلی و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اثر حشره‌کش موونتو بر سیستم تولیدمثلی موش‌های ماده کوچک سفید آزمایشگاهی نشان داده که موونتو باعث ایجاد تغییرات بافتی و بیوشیمیایی در موش‌های رت می‌شود که همسو با نتایج تحقیق است (۱۱).

یکی از وقایع ضروری در تبدیل اسپرم نابالغ به بالغ، متراکم شدن کروماتین اسپرم است که طی آن مولکول DNA به ساختار مارپیچی غنی از پروتامین تغییر شکل داده و آن را نسبت به عوامل مضر محیطی مقاوم می‌کند (۱۸). اسپرم نابالغ محتوی پروتئین هیستون با تعداد فراوانی آمینواسید لیزین است که تمایل زیای برای ترکیب با رنگ آنیلین بلو دارد و آن را به رنگ آبی در می‌آورد. اما اسپرم بالغ به خاطر فراوانی آمینواسیدهای سیستئین و آرژینین در پروتامین خود و عدم تمایل برای اتصال به آنیلین بلو، رنگ آبی به خود نمی‌گیرد. یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که در گروه تجربی نسبت به کنترل، تعداد بیشتری از اسپرم‌ها رنگ آبی بخود گرفته بود یعنی نابالغ بودند که دلیل احتمالی آن تاثیر موونتو بر روی DNA و مانع از پروتامین شدن آنها شده است. این نتایج در راستای یافته‌های ژانگ و همکاران (۲۰۲۰) است. ژانگ و همکاران گزارش کرده که موونتو در جنین گورخرماهی، یک عامل تراتوژن است و بر متابولیسم لیپیدها تأثیر می‌گذارد و باعث ضایعات میتوکندری می‌شود (۲۲).

یافته‌های حاصل از رنگ آمیزی ائوزین ـ نگروزین مشخص کرد تعداد اسپرم‌های مرده گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافته است. می‌توان این طور استنباط نمود با توجه به این که موونتو به گروه ترکیبات تترامیک اسید تعلق دارد پس از ورود به گیاه به فرم انولی تبدیل و با آسیب غشای اسپرم ، موجب آزاد شدن مولکول‌های رادیکال آزاد و به دنبال آن افزایش میزان استرس اکسیداتیو و در نتیجه باعث از بین رفتن اسپرم شده است.

در همین راستا، جیانگ و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی خواص بیولوژیکی انواع تترامیک اسید گزارش کرده که تترامیک اسید خاصیت سیتوتوکسیک دارد (۱۰).

یافته‌های حاصل از رنگ آمیزی آکریدین ـ اورنج نشان داد که میزان آسیب DNAی کروموزوم‌های اسپرم گروه تجربی نسبت به گروه کنترل، بیشتر است. ناهنجاری در ساختار کروموزوم احتمالاً نشان‌دهنده ناهنجاری در بسته بندی کروماتین یا آپوپتوز در آنها است. همسو با این یافته‌ها، گونزالس ـ مارین و همکاران (۲۰۲۱) ، با بررسی اثر موونتو بر روی مگس سرکه گزارش کرده سم موونتو باعث آسیب DNA در تخمدان‌های مگس سرکه می‌شوند (۷).

یافته‌های مربوط به لقاح آزمایشگاهی و مراحل تکوین جنین نشان داد اسپرم‌های استخراج شده از گروه تجربی درمقایسه با اسپرم‌های استخراج شده از گروه کنترل تعداد کمتری از تخمک‌ها را لقاح داده است. همچنین در ادامه تکوین، تعداد جنین دوسلولی و چهارسلولی گروه تجربی نسبت به کنترل کمتر بود. کاهش تخمک‌های لقاح یافته احتمالاً به دلیل کاهش تحرک اسپرم‌ها، افزایش اسپرم‌های نابالغ و آسیب DNA ی اسپرم‌ها در نتیجه کاهش کیفیت اسپرم و کاهش لقاح در اثر سم موونتو باشد. مطابق این یافته مانوچی و همکاران (۲۰۲۲)، گزارش کرد که عدم بلوغ اسپرم موجب کاهش میزان لقاح اسپرم می‌شود (۱۳).

نتایج تحقیق نشان داده تعداد جنین‌های مرحله بلاستوسیست گروه تجربی نسبت به کنترل کمتر بود.

بعلاوه جنین‌های تشکیل شده گروه تجربی نسبت به کنترل ، توانایی زنده ماندن ندارند و نمی‌توانند به رشد خود ادامه دهند که دلیل آن وجود آسیب در DNAی سلول‌های جنین است که از اسپرم به ارث برده است. مطابق این نتایج ، بیر و اشمیت (۲۰۱٤) گزارش کرد که موونتو با تداخل در توانایی تخم‌گذاری مانع ادامه تقسیمات سلول مورولا در حشرات می‌شود (۱).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد حشره‌کش موونتو با آسیب غشاء و DNA ی اسپرم موجب کاهش تعداد و تحرک اسپرم‌ها و افزایش اسپرم‌های ناهنجار شده و از این طریق موجب کاهش درصد لقاح و قابلیت باروری در موش‌های کوچک سفید آزمایشگاهی می‌شود.

منابع

1. Beers E.H., Schmidt R.A. 2014. Impacts of orchard pesticides on Galendromus occidentalis: Lethal and sublethal effects. *Crop protection*, 56:16-24.

2. Bekhakheche M., Manseur A., Masna F., Habbachi S., Habbachi W., Bairi A., ahraoui A. 2018. Chronic Contamination in Rats by Reduced Risk Pesticides: Cases of Spirotetramat and Citrullus Colocynthis (Cucurbitaceae) Extracts. *World Journal of Environmental Biosciences*, 6(4):1-6.

3. Bell J.W. 2013. Petition for a three-year extension of exclusive use data protection for spirotetramat as provided for under fifra section 3(c)(1) (F) (ii). *Bayer Corp Science*, 48 p.

4. Bretschneider T., Fischer R., Nauen R. 2007. Inhibitors of lipid synthesis (acetyl-CoA-carboxylase inhibitors). *Modern Crop Protection Compounds*, 3:909-926.

5. Falcón-Etchechury M., Silveira-Gramont M., Robles-Sánchez R., Canett-Romero R., Ramos-Enríquez R., López-Cervantes G., Aldana-Madrid M.L. 2013 . Spirotetramat induce cambios histológicos y bioquímicos en rata Wistar. *Revista de Toxicología*, 30(2):215-217.

6. Fenner K., Canonica S., Wackett L.P., Elsner M. 2013. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science*, 341(6147):752-758.

7. González-Marín B., Calderón-Segura M. E., Pérez A.K.G., Ciénega L.G.M. 2021. Movento® 240SC (Spirotetramat) and Envidor® 240SC (Spirodiclofen) keto-enol insecticides induce DNA damage in Drosophila melanogaster ovaries. *Fundamental Toxicological Sciences*, 8(3): 81-88.

8. Goroohi F., Imani S., Samih M.A., Panahi B. 2018. Effects of ethanolic extracts of Rubia tinctorum, Ferula gummosa and Nesidiocoris tenuis (Hem.: Miridae) on sweet potato whitefly, Bemisia tabaci (Hem.: Aleyrodidae), and comparison with Spirotetrmat. *IAU Entomological Research Journal*, 10(2):111-125.

9. Hodges L., Bell H., Adam K. 2012. Petition for a Three-Year Extension of Exclusive Use Data Protection for Spirotetramat. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Petition for Spirotetramat. 23 pp.

10. Jiang M., Chen S., Li J., Liu L. 2020. The biological and chemical diversity of tetramic acid compounds from marine-derived microorganisms. *Marine Drugs*, 18(2):114.

11. Kaboli Kafshgiri S., Parivar K., Baharara J., Hayati Roodbari N., Kerachian M.A. 2017. Comparison the effect of movento, a chemical pesticide, with chitosan, a biologic pesticide, on female reproductive system in Balb/C mice. *Nova Biologica Reperta*, 3(4):279-287.

12. Manas G.E., Hasanzadeh S., Parivar K. 2013. The effects of pyridaben pesticide on the histomorphometric, hormonal alternations and reproductive functions of BALB/c mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(10):1055.

13. Mannucci A., Argento FR., Fini E., Coccia ME., Taddei N., Becatti M., Fiorillo C. 2022. The impact of oxidative stress in male infertility. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8:799294.

14. Mohapatra S., Deepa M., Jagadish G. K. 2012. An efficient analytical method for analysis of spirotetramat and its metabolite spirotetramat-enol by HPLC. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88:124-128.

15. Moustafa M.H., Sharma R.K., Thornton J., Mascha E., Abdel-Hafez M.A., Thomas A.J. and Agarwal A. 2004. Relationship between ROS roduction, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, 19(1): 129-138.

16. Nauen R., Jeschke P., Velten R., Beck M.E., Ebbinghaus-Kintscher U., Thielert W., Raupach G. 2015. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Management Science*, 71(6): 850-862.

17. Nazari P., Poorjavad N., Izadi H., Sahafi S.R. 2020.Comparison of the effect of several common insecticides on Lepidosaphes malicola (Hem: Diaspididae) in Semirom apple orchards, *Plant Pest Research*, 1(10):17-30. (In Persian).

18. Ribas-Maynou J., Garcia-Bonavila E., Hidalgo CO., Catalán J., Miró J., Yeste M. 2021. Species-specific differences in sperm chromatin decondensation between eutherian mammals underlie distinct lysis requirements. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:669182.

19. Sverdrup L.E., Bjorge C., Eklo O.M., Grung M., Kallqvist T., Klingen I., Lag M. and Ropstad E. 2012. Risk assessment of the insecticide Movento 100 SC with the active substance spirotetramat. – *Bayer Crop Science Journal*, 13:1-25.

20. Toshimori K. 2009. Dynamics of the Mammalian Sperm Head. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology. Springer, *Berlin, Heidelberg*, 204:9-50.

21. Willmott A.L. 2012. Efficacy of systemic insecticides against the citrus mealybug, Planococcus citri, and pesticide mixtures against the western flower thrips, Frankliniella occidentalis. Ph.D dissertation, Faculty of protected environments, Kansas State University.

22. Zhang J., Qian L., Wang C., Teng M., Duan M., Chen X., Li X. and Wang C. 2020. UPLC-TOF-MS/MS metabolomics analysis of zebrafish metabolism by spirotetramat. Environ. *Pollution*, 2:266.

The Effect of Movento Insecticide on the Fertility Rate in Male Balb/c Mice

Ghodrat Ebadi Manas*

Department of Biology, Farhangian University, 14556-889 P.Box, Tehran, Iran

Abstract

Today, due to the indiscriminate use of poisons and the resistance of pests to them, new types of poisons are produced every year. Movento is the latest insecticide that is used in pistachio orchards to control the psyllid pest, whose side effects on the reproductive system have not been investigated. The aim of this study was to investigate the effect of Movento on fertility in Balb/c mice. In this study, 18 adult and healthy male Balb/c mice were prepared and kept under standard conditions. Each group consisted of 9 mice. Mice were randomly divided into experimental and control groups. The experimental group received 79 mg/kg Movento and the control group received the same amount of distilled water daily for 60 days through oral gavage. At the end of the study, the mice were euthanized by injecting a mixture of xylazine and ketamine. Epididymal tail of the testes of mice was separated and placed in HTF culture medium. The parameters of sperm count, sperm viability, DNA damage of sperm, immature sperms and fertilization ability of sperms and blastocyst were evaluated. The data obtained from the study were analyzed by ANOVA method. The findings showed that sperm viability, the percentage of fertilized oocytes, two-celled and four-celled embryos, and the number of blastocysts were significantly reduced in the experimental group compared to the control. Also, sperms count in the experimental group compared to the control group decreased but was not significant. However, immature sperms and DNA damage of sperm in the experimental group was increased compared to the control group. Therefore, it can be concluded that Movento poison reduces fertility in mice by DNA damage of sperm and chromatin.

Keywords: Insecticide, Movento, Fertility, Embryo, Male mouse.