

## "مقاله پژوهشی"

تأثیر خون‌های شتر و قورباغه بر رسیدگی جنسی، بازماندگی و میزان تولید  
کوکون و لارو در زالوی شرقی (*Hirudo orientalis*)حمیدرضا بیدمال<sup>۱</sup>، محمد سوداگر<sup>۱\*</sup>، مهدی شکوری<sup>۲</sup>

۱- گروه تکثیر و پرورش آبریان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران  
 ۲- سازمان شیلات ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۶

## چکیده

در سال‌های اخیر، زالو در درمان برخی از بیماری‌ها، استخراج بسیاری از آنزیم‌ها و مواد موثر در درمان بیماری‌ها، مورد استفاده قرار گرفته است. این تحقیق به منظور تعیین خون مناسب بر رسیدگی جنسی و میزان تولید کوکون و لارو در زالوی شرقی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۱۲۰ قطعه زالو با سن متوسط یک هفته و با وزن متوسط  $0.4 \pm 0.1$  گرم در ۲ تیمار (تغذیه با خون شتر و قورباغه) و هر تیمار با ۳ تکرار، در ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری تقسیم شدند. جهت تغذیه زالوها با خون قورباغه، تعداد ۱۰۰ عدد قورباغه تهیه شد. جهت تغذیه زالوها در تیمار بعد، خون موردنیاز از کشتارگاه تهیه شد. جهت تغذیه زالو، خون به دمای ۳۷ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد رسید. ۴۸ ساعت اول بعد از تغذیه آب ظروف پلاستیکی روزی ۲ مرتبه و به میزان ۷۰ درصد تعویض شد. تغذیه مجدد بعد از گذشت یک ماه از تغذیه قبل و طی ۶ مرحله انجام شد. به منظور اطلاع از رسیدگی جنسی زالوها، پایان مرحله ۵ و ۶ تغذیه از هر تیمار دو عدد زالو به صورت تصادفی انتخاب و تشریح شد. نتایج حاصل نشان داد تعداد کوکون و لارو در تیمار تغذیه شده با خون شتر به طور معنی‌داری نسبت به تیمار تغذیه شده با خون قورباغه بالاتر بود ( $p < 0.05$ ). بازماندگی زالوهای تغذیه شده با خون شتر به طور معنی‌داری نسبت به تیمار تغذیه شده با خون قورباغه بالاتر بود ( $p < 0.05$ ). نتایج این تحقیق بر موثر بودن تغذیه زالو با خون شتر دلالت می‌کند.

**کلمات کلیدی:** خون، بلوغ جنسی، کوکون‌گذاری، بازماندگی، زالوی شرقی.

## مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از زالو در امور پزشکی و درمانی در حال افزایش است (Baskova et al., 1983, 1992). به عنوان مثال زالوی *Hirudo orientalis* توسط جراحان پلاستیک برای ترمیم رگ‌ها در بافت‌های پیوندی که گردش خون در آن‌ها یک مشکل است، استفاده می‌شود (Sawyer, 1986; Rigbi et al., 1987; Roters and Zebe, 1992; Whitaker et al., 2004; Huang et al., 2006). کشف هیروودین در سال ۱۸۸۴ به عنوان ماده ضد انعقاد خون در بزاق زالو، منجر به افزایش محبوبیت زالو شد (Elliot and Kutschera, 2011; Philips and siddall, 2005). در بزاق زالو آنزیم‌های هیروودین، انگلین، بدلین و هیستامین (گشادکننده عروق) مشاهده شده است (Swyer, 1986). علاوه بر این به دلیل فرآورده‌های فراوانی که از زالو استخراج می‌شود زالو به عنوان یک موجود مفید برای درمان برخی از بیماری‌ها از جمله سردرد، تب، زخم‌های عفونی شده، دمل و آبسه، ورم‌ها، هموروئید و غیره استفاده می‌گردد (Philips and Siddall, 2005). زالو به طور گسترده به عنوان یک حیوان مدل در مطالعات سم شناسی، فیزیولوژیکی، عصبی، بیوشیمیایی و بافت شناسی استفاده می‌شود (Mann, 1962; Sawyer, 1986; Lapkina, 1992; Huguet and Molinas, 1992, 1996; Blackshaw and Nicholls, 1995; Petrauskienė, 2001).

در سال‌های اخیر برخی از جمعیت‌های زالو به دلیل سوء استفاده بیش از حد برای ماهیگیری (به عنوان طعمه)، اهداف دارویی و آلودگی شیمیایی آب‌ها به طرز چشمگیری کاهش یافته است (Sawyer, 1981; Elliott and Tullett, 1984; Wells and Coombes, 1987; Petrauskienė, 2003; Trontelj and Utevsky, 2005). در حال حاضر زالوهای طبی و

درمانی عمدتاً شامل سه گونه *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1785, *Hirudo verbena* Carena, 1820, and *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005 (Roman Csefalvay et al., 2017) می‌باشند. گونه زالوی شرقی تنها گونه زالو درمانی (Medicinal Leech) است که در ایران وجود دارد، اما در کشورهای آسیای میانه هم گسترش یافته است (Utevsky and Trontelj, 2005).

وضعیت جغرافیایی و توپولوژی بدست آمده یک رابطه خواهری بین گونه *Hirudo orientalis* و *Hirudo medicinalis* را نشان می‌دهد (Utevsky and Trontelj, 2005; Baskova et al., 2008). گونه هیروود اورینتالیس ناحیه پشت سبز چمنی و دارای نقاط پشتی سیاه گرد و یا چهار گوش است در حالیکه در گونه هیروودو مدیسینالیس نقاط پشتی دراز و کشیده هستند. الگوی رنگ آمیزی ناحیه شکمی در گونه هیروود اورینتالیس منظم و بر روی یک پس زمینه عمدتاً سیاه قرار می‌گیرند، در حالیکه رنگدانه‌های شکمی در گونه هیروودو مدیسینالیس به صورت الگوی نامنظم و اصطلاحاً جزیره ای پخش شده‌اند (Trontelj and Utevsky, 2005).

زالو‌ها (Clitellate) به وسیله کوکون‌هایی که از ناحیه سر (Anterior) خارج می‌کنند تولید مثل می‌کنند (Sawyer, 1986). در مدت فرآیند تولید مثل زالوهای مولد کوکون‌هایی را ترشح می‌کنند که از تخم‌های در حال رشد محافظت می‌کند (Yang, 1996; Sawyer et al., 1981). اجزا کوکون‌ها از غدد های تخصص یافته واقع در بخش داخلی قسمت های جنسی (Clitellar) رها می‌شوند. یک غلاف در اطراف ناحیه کلایتلومی (ناحیه جنسی) تشکیل و تخم‌های بارور شده را در داخل آن می‌گذارند. سپس غشا کوکون از سر

هزینه کمتر گردد، در این راستا ارزشمند و با اهمیت است. در این تحقیق، تأثیر خون‌های متفاوت شتر و قورباغه بر رسیدگی جنسی، بازماندگی و میزان تولید کوکون و لارو در زالوی شرقی مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش، از آبان ۱۳۹۷ تا تیرماه ۱۳۹۸ در کارگاه شرکت ارمغان سلامت آوید واقع در روستای کریم آباد گرگان انجام شد. بدین منظور تعداد ۳۰ عدد کوکون از شرکت ارمغان سلامت آوید تهیه و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ماه در خزه مرطوب نگهداری شد. در این مدت تخم‌های درون کوکون‌ها هچ شده و لاروها از مایع آلبومین داخل کوکون تغذیه نمودند (Sawyer, 1986). لارو زالوها بعد از گذشت ۲۱ روز تا یک ماه از داخل کوکون‌ها خارج شدند. سپس زالوهای نوجوان جمع آوری و تعداد ۱۲۰ قطعه شمارش و به سالن اصلی آزمایش منتقل گردیدند. زالوهای هفت روزه و با وزن متوسط  $0.1 \pm 0.04$  گرم در ۲ تیمار تغذیه ای شامل: خون شتر و خون قورباغه و هر تیمار ۳ تکرار در ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری تقسیم و تغذیه شدند. مدت ۷۲ ساعت زالوها جهت آداپتاسیون و جلوگیری از تلفات در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری و بعد از آن با خون مورد نظر تغذیه شدند. آب مصرفی فاقد کلر و جهت هم دمایی داخل سالن یک منبع ۲ هزار لیتری تعبیه گردید. آب ظروف ۱۰ لیتری یک روز در میان و به میزان ۵۰ درصد تعویض می گردید (Zhang et al., 2008).

جهت تغذیه زالوها با خون قورباغه، تعداد ۱۰۰ عدد قورباغه از آب بندان روستای محمدآباد تهیه و در آب

زالو خارج و هر دو انتهای آن بسته می شود (Mason et al., 2004). جنین‌ها بعد از خروج از تخم وابسته به مایع (آلبومین) داخل کوکون هستند و بعد از خروج از کوکون مستقل از کوکون هستند (Shain, 2007). زالوهای نوجوان (لاروها) در محیط طبیعی اولین وعده غذایی خود را از خون دوزیستان مصرف می کنند، در حالیکه وعده‌های غذایی بعدی را از خون دوزیستان، ماهی‌ها و یا پستانداران بدست می آورند (Marrotta and Shain, 2007). تغذیه مناسب زالوها در تعداد کوکون و کوکون گذاری و تعداد زالوی داخل کوکون و همچنین در میزان تبدیل تخم به لارو در داخل کوکون تأثیر بسزایی دارد. زالوی شرقی در باروری گرایش به خشکی داشته و در حاشیه آب‌بندان‌ها، روی چوب و خزه بعد از جفت گیری و انتقال اسپرم و در صورت ایجاد شرایط بهینه کوکون گذاری می کند. نوزادان خارج از کوکون، مستقل از والد خود بوده و ممکن است به دلیل رژیم غذایی متفاوت میزان بقا و رشد متفاوتی داشته باشند (Sawyer, 1981; Peterson, 1983).

زمان رسیدگی جنسی زالو در طبیعت حداقل ۲ سال بوده، ولی بر اساس شرایط محیطی به ۳ الی ۴ سال هم می رسد (Elliott and Mann, 1979). چنانچه تغذیه با خون پستانداران باشد بلوغ جنسی بین ۱۲ تا ۱۵ ماه اتفاق افتاده ولی در تغذیه با خون دوزیستان زالو ۱۷ تا ۲۰ ماهگی هم به بلوغ نمی رسد (Sineva, 1944).

با توجه به نیاز داخل کشور در زمینه طب سنتی و تولید فرآورده و محصولات جانبی از زالو، پتانسیل بالای زالو جهت صادرات به دیگر کشورها و علاقه - مندی کارآفرینان برای ورود به عرصه تکثیر و پرورش زالو یافتن راه کارهایی که منجر به تولید مدون، بهتر و با

(2015). ۴۸ ساعت اول بعد از تغذیه جهت جلوگیری از تلفات و کنترل آمونیاک، آب ظروف پلاستیکی و مخازن روزی ۲ مرتبه و به میزان ۷۰ درصد تعویض شد. تغذیه مجدد بعد از گذشت یک ماه از تغذیه قبل انجام شد. این کار ۶ مرتبه تکرار و زالوها ۶ بار توسط خون مورد نظر تغذیه شدند.

### نمونه برداری از کیسه اسپرمی

به منظور اطلاع از رسیدگی جنسی زالوها، پایان مرحله ۵ و ۶ تغذیه از هر تیمار دو عدد زالو به صورت تصادفی انتخاب و تشریح شد. برای تشریح و جداسازی کیسه اسپرمی و رنگ آمیزی کیسه اسپرمی ابتدا زالوها در الکل ۱۰ درصد بیهوش، سپس ناحیه پشتی برش و داخل بدن با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد (Ganjavi et al., 2013). بالافاصله بعد از برش و جداکردن کیسه اسپرمی، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد ثابت و به آزمایشگاه حکیم جرجانی جهت رنگ آمیزی منتقل شدند.

### تکنیر زالو

بعد از اطمینان از رسیدگی جنسی زالوها جهت جفت‌گیری و کوکون‌گذاری، زالوها به مخازن ۸۰ لیتری منتقل شدند. دمای آب طی یک هفته به ۲۷ درجه سانتی‌گراد رسید و زالوها دو ماه در این دما نگهداری شدند. با توجه به کوکون‌گذاری زالو در محیط مرطوب، در هر مخزن خارج از آب مقداری خزه در سبد میوه گذاشته شد تا زالوها جهت کوکون‌گذاری به آنجا رفته و کوکون‌گذاری نمایند. خزه‌ها قبل از انتقال به مخازن با آب کاملاً شستشو شدند. طی مدت کوکون‌گذاری هفته‌ای دو مرتبه خزه‌ها به آرامی کنترل و کوکون‌ها از داخل خزه جمع‌آوری و درون بستری از خزه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱

بدون کلر در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تا مرحله سوم تغذیه به ازای هر ۵ قطعه زالو یک عدد قورباغه و از مرحله سوم به بعد به ازای هر ۳ قطعه زالو یک عدد قورباغه استفاده شد. هنگام تغذیه دست و پای قورباغه را بسته و قورباغه را به داخل ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری وارد و هنگامی که تعداد لاروها به مورد نظر جهت تغذیه به قورباغه متصل می‌شدند، قورباغه را از آب خارج و پس از گذشت حدود ۲۰ دقیقه و رها کردن بدن قورباغه، زالوها به ظروف اصلی خود برگردانده شدند. جهت تغذیه زالوها با خون شتر، خون از کشتارگاه واقع در اینچه برون تهیه شد. برای جلوگیری از لخته شدن خون، ظرف خون‌گیری را از قبل به هیپارین سدیم آغشته و در حین خون‌گیری هیپارین سدیم کم‌کم به خون اضافه و ظرف به صورت مداوم تکان داده شد (Davies and Mcloughlin, 1996). بعد از رساندن خون به کارگاه، خون در ظرفی که از قبل ضد عفونی شده ریخته و روی آن یک الک پارچه‌ای قرار گرفت. دمای خون ۳۷ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد بود. پس از گذشت ۲۰ دقیقه زالوهایی که تغذیه شدند از زالوهایی که تغذیه نشدند، جهت جلوگیری از هم‌جنس‌خواری جدا شدند (Kutschera and Roth, 2005). زالوهای تغذیه‌شده، جهت شستشو و هم‌دمایی در ظروف دیگری که دمای آب در آن ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود، قرار داده تا از شوک دمایی جلوگیری گردد. بعد از گذشت زمان و رسیدن دمای آب به ۲۰ درجه سانتی‌گراد زالوها به ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری و در مراحل بالاتر تغذیه و افزایش سایز به مخازن ۸۰ لیتری منتقل و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۱۲ ساعات روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Elliott and Dobson, )

داشت ( $p < 0/05$ ) و بالاترین میانگین ( $192 \pm 14/17$ ) تعداد لارو مربوط به تیمار خون شتر بود. در پژوهش حاضر میانگین وزن کوکون‌های تولید شده در ۲ تیمار خون شتر و قورباغه اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند. بررسی درصد بازماندگی و تلفات زالوهای تغذیه شده با خون شتر و قورباغه گواه این مطلب است که میزان بازماندگی با خون شتر به مراتب بالاتر از خون قورباغه بوده و اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده شد (جدول ۱).

ماه نگهداری شدند. زالوهای نوجوان بعد از خارج شدن از کوکون جمع آوری و شمارش شدند.

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری Spss نسخه‌ی ۱۶ از آنالیز t-test ادر سطح معنی داری  $\alpha = 0/05$  استفاده شد (Riberio *et al.*, 2001).

### نتایج

در تحقیق حاضر میانگین تعداد کوکون در تیمار تغذیه با خون شتر و قورباغه اختلاف معنی داری با یکدیگر داشت ( $p < 0/05$ ). طبق نتایج بدست آمده میانگین تعداد لارو بین تیمارها اختلاف معنی داری

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار متغیرهای مورد بررسی زالو در دو تیمار خون شتر و قورباغه

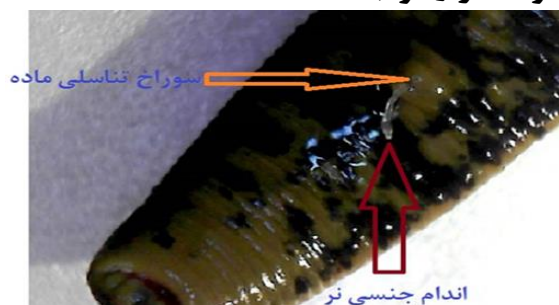
متغیر	تیمار شتر	تیمار قورباغه	سطح معنی داری
کوکون (تعداد)	$18/2 \pm 33/51$	$8/3 \pm 33/51$	p value = 0/016
لارو (تعداد)	$14 \pm 192/17$	$85/33 \pm 33/85$	p value = 0/007
جمع کل کوکون (تعداد)	55	25	
جمع کل لارو (تعداد)	576	256	
وزن کوکون (گرم)	$1/0 \pm 0.3/15$	$0/0 \pm 80/1$	p value = 0/091
بازماندگی (درصد)	$86/67 \pm 33/33^a$	$71/66 \pm 41/41^b$	p value = 0/033
تلفات (درصد)	$13/33 \pm 55/77^b$	$28/33 \pm 55/77^a$	p value = 0/033

اختلاف معنی دار ( $p < 0/05$ )



شکل ۲: دستگاه تناسلی نر. ۱) اپی دیدیم، ۲) پروستات.

### کیسه‌های اسپرمی در زالوهای تغذیه شده با خون شتر و قورباغه



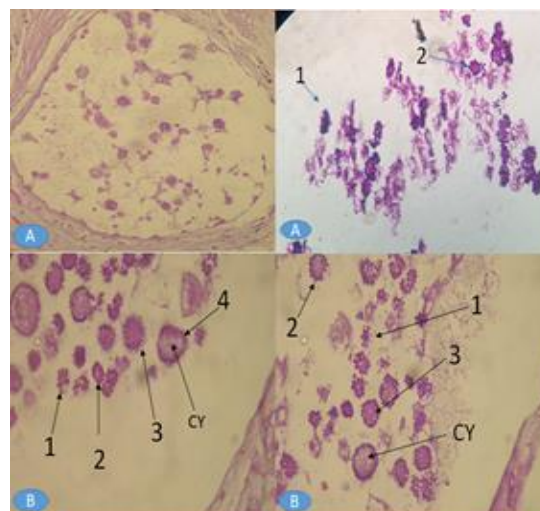
شکل ۱: ناحیه تناسلی میرو دو اورینتالیس. اندام جنسی واقع در ناحیه تناسلی (کلاتومی).

خون هموگلوبین بوده و همچنین پروتئین اصلی گلبول قرمز می‌باشد. گلبول قرمز ۴۵ درصد از وزن خون مهره‌داران را شامل می‌شوند (Sawyer, 1986). در زالوی خون‌خوار همولیز گلبول‌های قرمز در نتیجه فعالیت باکتری همزیست آئروموناس می‌باشد (Busing et al., 1953). باکتری آئروموناس همچنین مسئول حفاظت طولانی از گلبول‌های قرمز را دارد و این محافظت از طریق ترشح آنتی بیوتیک انجام می‌شود و مانع فساد خون ذخیره شده توسط دیگر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (Swyer, 1986).

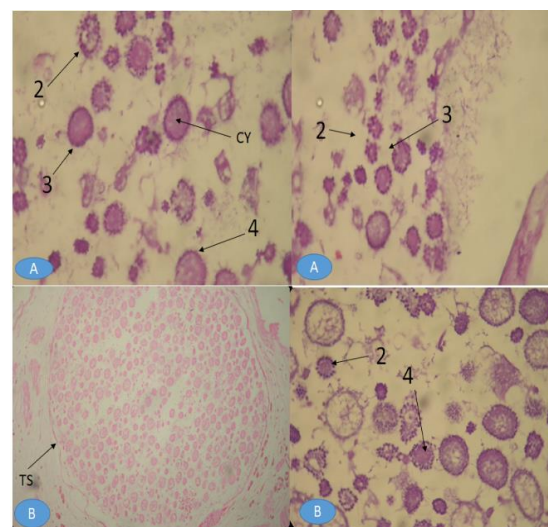
برخی از بیولوژیست‌ها اسپرماتوزنز و تکوین خوشه اسپرمی را به چهار مرحله تقسیم کرده‌اند (Hagdorn, 1962, 1966; Malecha, 1970; Tillma and Barnes, 1970; Webb, 1980; Sawyer, 1986).

حالی که Webb و Omar (۱۹۸۱) اسپرماتوزنز را به پنج مرحله تقسیم کردند. چرخه زندگی زالو با تغذیه ارتباط مستقیم دارد (Shams lahijani, 2009). به نظر می‌رسد خون‌خواری با بلوغ جنسی ارتباط مستقیم دارد (Ganjavi et al., 2014). در بدن زالوی بالغ مراحل اسپرماتوزنز و اووژنز کامل شده‌است و زالو آمادگی جفت‌گیری، انتقال و دریافت اسپرم و نهایتاً تولید کوکون را دارد (Swyer, 1986). Davies و Mcloughlin (۱۹۶۶) نشان دادند زالوها بعد از ۸ الی ۹ بار تغذیه و به فاصله هر ماه یکبار و بعد از ۲۸۹ روز به بلوغ جنسی می‌رسند. انرژی خون پستانداران از دوزیستان بیشتر است (Merilä and Sterner, 2002).

محتوای انرژی بیشتر در خون میزبان به طور مثبت عملکرد تولید مثلی زالو را تحت تاثیر می‌گذارد. به عنوان مثال زالو در زمان تغذیه از خون قورباغه و پستانداران به بلوغ جنسی رسیده ولی زمان بلوغ در



شکل ۳: برش کیسه‌های اسپرمی مراحل ۵ و ۶ تیمار تغذیه با خون قورباغه. A (کیسه اسپرمی مرحله ۵ تغذیه)، B (کیسه اسپرمی مرحله ۶ تغذیه). 1 (خوشه اسپرمی مرحله ۱)، 2 (خوشه اسپرمی مرحله ۲)، 3 (خوشه اسپرمی مرحله ۳)، 4 (خوشه اسپرمی مرحله ۴). CY (سیتوفور).



شکل ۴: برش کیسه‌های اسپرمی مراحل ۵ و ۶ تیمار تغذیه با خون شتر. A (کیسه اسپرمی مرحله ۵ تغذیه)، B (کیسه اسپرمی مرحله ۶ تغذیه). 1 (خوشه اسپرمی مرحله ۱)، 2 (خوشه اسپرمی مرحله ۲)، 3 (خوشه اسپرمی مرحله ۴)، 4 (خوشه اسپرمی مرحله ۴). CY (سیتوفور).

## بحث

خون از سه جزء گلبول سفید، گلبول قرمز و پلاکت تشکیل شده‌است. ۳۳ درصد از وزن گلبول‌های قرمز

زالو در صورت تغذیه از خون پستانداران بعد از ۱۲ ماه و تغذیه از خون قورباغه بعد از ۲۰ ماه به بلوغ می‌رسد و همچنین میزان تلفات در خون قورباغه به دلیل انرژی کمتر به مراتب بالاتر و بیشتر از خون پستانداران گزارش شد (Davies and McLoughlin, 1996; Sineva 1944).

Keim (۱۹۹۳) محتوای مواد خونی موجود در لوله گوارش زالو را بررسی و مشاهده کرد که زالوهایی که در لوله گوارش آن‌ها خون قورباغه وجود داشت، به طور آشکار وزن کمتری نسبت به آن‌هایی که از خون اسب و گاو تغذیه نموده بودند، داشتند؛ و دلیل آن را محتوای انرژی کمتر خون قورباغه نسبت به خون اسب و گاو اعلام کرد. انرژی خون پستانداران از دوزیستان بیشتر است (Merilä and Sterner, 2002). میزان پروتئین محلول در خون برای قورباغه  $1/4$  g/cc و میزان پروتئین در خون گوسفند  $7/4$  g/cc عنوان شده است (Wilkin, 1989).

در این مطالعه بالاترین لارو تولید شده در تیمار خون شتر و کمترین در قورباغه بود. دلیل آن را می‌توان انرژی کمتر خون قورباغه نسبت به خون پستانداران دانست و این کمبود انرژی در تولید و رهاسازی تخم داخل کوکون موثر است.

بیشتر زالوها کم و بیش از خون مهره‌داران تغذیه می‌کنند و خون مهره‌داران منبع غذایی بسیار موثر مخصوصاً از لحاظ انواع پروتئین است (Andrew, 1965). Murat و همکاران (۲۰۱۹) اعلام کردند هرچند اولویت میزبان زالو شناخته شده است (خون گاو و خوک)، اما تاثیرات میزبان روی عملکرد تولید مثل و رشد ناشناخته است و تعیین این منابع به طور قابل

تغذیه با خون قورباغه افزایش و مدت باروری نیز کاهش می‌یابد (Davies and McLoughlin, 1996). در تحقیق حاضر زالو بعد از گذراندن از ۶ مرحله تغذیه، جهت کوکون‌گذاری به بستر خزه منتقل شد و نتایج نشان داد بالاترین میزان تولید کوکون در تیمار تغذیه از خون شتر و کمترین میزان تولید کوکون در تیمار تغذیه از خون قورباغه بود که دلیل آن را می‌توان انرژی کمتر خون قورباغه نسبت به خون پستانداران دانست. در برش کیسه اسپرمی بعد از مرحله ۶ تغذیه، تعداد اسپرماتوزوا (مرحله ۴ اسپرماتوزنز) تیمار خون شتر بالاتر از قورباغه بود. در برش کیسه اسپرمی بعد از مرحله ۵ تغذیه در تمام تیمارها اسپرماتوزنز (مرحله ۴ اسپرماتوزنز) بسیار کم دیده شد و به همین دلیل زالوها بعد از مرحله ۶ تغذیه‌ای به بستر خزه جهت کوکون-گذاری منتقل شدند.

زالو دارای طیف گسترده‌ای از میزبان از جمله پرندگان، ماهی، دوزیستان و پستانداران است (Elliott and Tullett, 1984; Wilkin and Scofield, 1990; Elliott and Dobson, 2015). با توجه به نقش اساسی تغذیه در رشد و بازماندگی زالو یکی از عوامل مهم در توزیع و تراکم آن‌ها وجود مواد غذایی و میزبان در زیستگاه زالو است (Sawyer, 1986). Elliott و Mann (۱۹۷۹) و Elliott و Tullett (۱۹۸۴) پیشنهاد دادند که زالو در تالاب و محیط طبیعی به علت تغذیه از خون قورباغه مدت ۲ الی ۴ سال به بلوغ می‌رسند. جمعیت زالو در سال‌های گذشته در تالاب‌ها و باتلاق‌ها نسبت به گذشته به مراتب کمتر شده و یکی از دلایل آن صنعتی شدن پرورش گاوها و اسب‌ها و تامین نیاز آبی آن‌ها در مزارع پرورش و جلوگیری از چریدن آن‌ها در تالاب‌ها و باتلاق‌ها می‌باشد (Mann, 1955).

- medicinal leeches. *Thrombosis Research* 67 (6), 721–730.
5. Blackshaw, S.E., and Nicholls, J.G., 1995. Neurobiology and development of the leech. *Journal of Neurobiology*, 27, (3), 267–276.
  6. Busing, K.H. and Doll, W.J., 1953. Die Bakterienflora der medizinischen Blutgel. *Arch. Microbiol.* 19(1). 52-86.
  7. Davies, R.W and McLoughlin, N.J., 1996. The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Freshwater Biology*, 36, 563-568.
  8. Elliott, J.M., and Dobson, M., 2015. Freshwater leeches of Britain and Ireland: keys to the Hirudinea and a review of their ecology. *Freshwater Biological Association. Scientific Publication*, London No. 69.
  9. Elliott, J., and Kutschera, U., 2011. Medicinal leeches: Historical use, ecology, genetics and conservation. *Freshwater Journal*, 4(21), 41.
  10. Elliott, J. M., and Mann, K.H., 1979. A key to the British freshwater leeches with notes on their life cycles and ecology. *Freshwater Biological Association Scientific Publications*, No. 40.
  11. Elliott, J.M., and Tullett, P.A., 1984. The status of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* in Europe and especially in the British Isles. *Biological Conservation*, 29, 15-26.
  12. Ganjavi, M.K., Mahdavi, N., Ghasemzadeh, F., Shriatzadeh, M.A., and Mirshamsi, O., 2014. The Study of Testis Sac Structure and Its Relation to Body Length, Width and Weight in *Hirudo orientalis*, Using Morphometrical and Histological Methods. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*. Winter 2014; 4(4), 425- 434.
  13. Hagadorn, I. R., 1962. Neurosecretory phenomena in the leech, *Theromyzon rude*. Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Conf. Neurosecretion, Memoir No. 12, pp. 313-21
  14. Hagadorn, I. R., 1966. The histochemistry of the neurosecretory system in *Hirudo medicinalis*. *Gen. comp. Endocr.* 6(2), 288-94.

توجهی در ایجاد پروتکل تولید زالو کمک خواهد کرد.

در مطالعه حاضر درصد بازماندگی زالوها در تیمار تغذیه با خون قورباغه نسبت به تیمار تغذیه از خون شتر کمتر بود. دلیل آن را می توان به ترکیبات شیمیایی متفاوت خون میزبان زالو و همچنین میزان انرژی آن دانست که این عامل در رشد و بقای زالو مهم است. اگرچه می بایست مطالعات بیشتری در این خصوص صورت پذیرد. در پایان با توجه به یافته های تحقیق، پیشنهاد می گردد در کارگاه های تکثیر و پرورش زالو با توجه به بالا بودن هزینه های تولید و اهمیت زمان در تکثیر و پرورش زالو از خون شتر به جای خون قورباغه در تغذیه زالوها استفاده گردد.

### سپاسگزاری

از کمک های همه دوستان در اجرای این تحقیق تشکر می نمایم.

### منابع

1. Andrew W., 1965. *Comparative Hematology*. Grune and Stratton, USA. 188P
2. Baskova I, Kostrjukova E, Vlasova M, Kharitonova O, Levitskiy S, Zavalova L, Moshkovskii S, and Lazarev V., 2008. Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. *Biochemistry (Moscow)*. 73, 315–320.
3. Baskova, I.P., Cherkesova, D.U., and Mosolov, V.V., 1983. Hirudin from leech heads and whole leeches and “pseudo-hirudin” from leech bodies. *Thrombosis Research* 30 (5), 459–467.
4. Baskova, I.P., Khalil, S., Nartikova, and V.F., Paskhina, T.S., 1992. Inhibition of plasma kallikrein. kininase and kinin-like activities of preparations from the

27. Peterson, E.L., 1983. Visual processing in the leech central nervous system. *Nature* 303, 240-2.
28. Petrauskienė, L., 2001. Water toxicity assessment using medicinal leeches. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 4, 203–208.
29. Petrauskienė, L., 2003. Water and sediment toxicity assessment by use of behavioural responses of medicinal leeches. *Environment International* 28, 729–736.
30. Philips, A., and Siddall, M., 2005. Phylogeny of the new world medicinal leech. *Zool scripta*, 34(6), 559-564.
31. Ribeiro, E.A., Genofre, G.C., and McNamara, J., 2001. Identification and quantification of carotenoid pigments during the embryonic development of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 34.
32. Rigbi, M., Levy, H., Iraqi, F., Teitelbaum, M., Orevi, M., Alajoutsijärvi, A., Horovitz, A., and Galun, R., 1987. The saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* I. Biochemical characterization of the high molecular weight fraction. *Comparative Biochemistry and Physiology B.* 87 (3), 567–573.
33. Roman Csefalvay., Milan Janak., and Barbara Immerova. 2017. First reliable records of *Hirudo verbena* Carena, 1820 (Annelida: Hirudinea) from Slovakia and notes on its syntopy with *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1785. *Folia faunistica*, 22, 63-66.
34. Roters, F.J., and Zebe, E., 1992. Proteinases of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*: purification and partial characterization of three enzymes from the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology B.* 102, 627–634.
35. Sawyer, R., 1981. *Leech biology and behaviour*, Volume I. Clarendon Press. Oxford.
36. Sawyer, R., 1986. *Leech biology and behaviour*, Volume II. Clarendon Press. Oxford.
15. Huguet, G., and Molinas, M., 1992. Changes in epithelial cells in *Hirudo medicinalis* during wound healing. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 11–17.
16. Huang, A.M., Li, Z.Y., Liao, G.S., Huang, H.K., Ban, J.D., and Lin, F.Q., 2006b. The anticoagulant effect of Bufrudin on human plasma in vitro and rabbit plasma in vivo. *Journal of Guangxi Medical University* 23 (1), 30–32 (In Chinese).
17. Keim A. 1993. Studies on the host specificity of the medicinal blood leech *Hirudo medicinalis*; 79(3), 253.
18. Kutschera U., 2012. The *Hirudo medicinalis* species complex. *Naturwissenschaften*, 99, 433- 434.
19. Kutschera, U., and Roth, M., 2005. Cannibalism in a population of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis* L.). *Biology Bulletin*, 32(6):626-628.
20. Lapkina, L.N., 1992. Comparative study of lethal and sublethal effects of trichlorphon on leeches. *Information bulletin IBVV. RAN.* 94, 67–73 (In Russian).
21. Malecha, J., 1975. Etude ultrastructurale de la spermiogenese de *Piscicola geometra* L. (Hirudinee, Rhynchobdelle). *J. ultrastr. Res.* 51(2), 188-203.
22. Mann, K.H., 1962. *Leeches (Hirudinea): Their Structure, Physiology, Ecology and Embryology*, p. 200. Oxford, London.
23. Mann, K.H., 1955. The ecology of the British freshwater leeches. *Journal of Animal Ecology*, 24(1), 98-119.
24. Mason, T.A., Mcllroy, P.J., and Shain, D.H., 2004. A cysteine-rich protein in the *Theromyzon* (Annelide: Hirudinea) cocoon membrane. *FEBS Letters.*, 561, 167-172
25. Merilä, J., Sterner, M., 2002. Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) attacking and killing adult amphibians. *Annales Zoologici Fennici*, 39, 343-346.
26. Murat Manav., Mustafa Ceylan., and Hakan Murat., 2019. Investigation of reproductive efficiency, growth performance and survival of the southern medicinal leech, *Hirudo verbena* Carena, 1820 fed with mammalian and poultry blood. *Animal Reproduction Science.* 206, (2019) 27-37.

- the North American medicinal Leech *Macrobdella decora*. General and Comparative Endocrinology. 44: 54-63.
44. Wells, S., and Coombes, W., 1987. The status of and trade in the medicinal leech. Traffic Bulletin 8, 64-69.
  45. Wilkin, P. J., 1989. The medicinal leech, *Hirudomedicinalis* (L.) (Hirudinea: Gnathobdellae) at Dungeness. Kent. Bot. J. Linn. Soc. 101, 45-57.
  46. Wilkin, P., and Scofield, A., 1991. Growth of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* under natural and laboratory conditions. 25(3), 547-553.
  47. Whitaker, I.S., Izadi, D., Oliver, D.W., Monteath, G., and Butler, P.E., 2004. *Hirudo medicinalis* and the plastic surgeon. British Journal of Plastic Surgery 57, 348-353.
  48. Yang, T., 1996. Fauna sinica (Annelida Hirudinea). Science Press, Beijing, China, pp: 117-129 (In Chinese).
  49. Zhang, B., and Lin, Q., and Lin, X., 2008. Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the leech, *Hirudinaria manillensis* Lesson, 18421 276(1-4), 198-204.
  37. Sineva M.V., 1944. Observation on breeding the medicinal leech. Zoologicheskii Zhurnal, 23, 293-303.
  38. Shams lahijani, M., 2009. Embryology, Reproduction and Embryogenesis in Invertebrates and small vertebrates. 1th Ed. Tehran. University of Beheshti press.
  39. Shain, D.H., 2007. Irregular helicoids in leech cocoon membranes. Journal of Structural Biology, 158; 336-343
  40. Tillman, D. L., and Barnes, J. R., 1973. The reproductive biology of the leech *Helobdella stagnalis* (L) in Utah Lake, Utah. Freshwat. Biol. 3, 173-45
  41. Utevsky S, and Trontelj P., 2005. A new species of the medicinal leech (Oligochaeta, Hirudinida, Hirudo) from Transcaucasia and an identification key for the genus *Hirudo*. Parasitol Res. 98, 61-66.
  42. Webb, R.A., 1980. Intralamellar neurohemal complex in the cerebral commissure of the leech, *Macrobdella decora*: an electron microscope study. 163(2), 157-66.
  43. Webb RA, Omar FE., 1981. Spermatogenesis in leeches II: the effect of the supraesophageal ganglion and ventral nerve cord ganglia on spermatogenesis in