

## "مقاله پژوهشی"

## شناسایی مناسب‌ترین گونه زالوی طبی ایران جهت تجاری‌سازی تکثیر و پرورش آن

عباس توایان<sup>۱</sup>، مجیدرضا خوش‌خلق<sup>۱\*</sup>، سجاد نظری<sup>۲</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران

۲- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، یاسوج، کهگیلویه و بویراحمد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۱۸

### چکیده

مطالعه حاضر با هدف شناسایی مناسب‌ترین گونه زالوی طبی بومی ایران برای آبی‌پروری از طریق بررسی مقایسه‌ای رشد، بقا و تولیدمثل زالوهای مدیسینالیس (*Hirudo medicinalis*) و اورینتالیس (*Hirudo orientalis*) که بومی حاشیه جنوب دریای خزر بوده و اطلاعات کافی در خصوص زیست‌شناسی آن وجود ندارد، انجام شد. رشد مدیسینالیس تا ماه پنجم به‌طور معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) سریع‌تر بود، سپس رشد به نفع اورینتالیس افزایش یافت. باروری تقریباً در همه بالغین مدیسینالیس (۹۶ درصد) و اورینتالیس (۹۸ درصد) تشخیص داده شد. میزان بقا در اورینتالیس در طول دوره رشد و تولیدمثل بیشتر بود. باروری و پيله‌گذاری در اورینتالیس مدت بیشتری طول کشید. تعداد پيله کمتر با اندازه کوچک‌تر و تعداد نوزاد حاصل از هر پيله بیشتر در گونه اورینتالیس وجود داشت. مدیسینالیس به همین ترتیب، تعداد پيله بیشتر با اندازه بزرگ‌تر و تعداد نوزاد حاصل از هر پيله کمتر داشت. در مجموع، یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که اورینتالیس نسبتاً زودتر به اندازه بزرگسالان می‌رسد، در شرایط نامساعدتر محیطی و پرورشی تولیدمثل خود را ادامه می‌دهد و عملکرد باروری بالایی را نشان می‌دهد، بنابراین آن را به یک گزینه مناسب‌تر برای پرورش زالوی طبی در مراکز تکثیر و پرورش زالو تبدیل می‌کند.

**کلمات کلیدی:** تغذیه زالوی طبی، پرورش زالو، تولیدمثل زالو، زالوی طبی بومی ایران

## مقدمه

تنها تعداد بسیار اندکی از حدود ۸۰۰ گونه زالوی شناسایی شده (Ceylan *et al.*, 2021) به عنوان زالوی طبی هستند (Sket and Trontelj, 2007) و این درحالی است که سابقه استفاده از زالوی طبی در پزشکی به قرن‌ها قبل بر می‌گردد (Phillips and Siddall, 2009). امروزه نیز زالوها در طب سنتی و پزشکی مدرن و دامپزشکی و تولید محصولات آرایشی، بهداشتی و دارویی و نیز به عنوان جانور مدل در مطالعات علوم زیستی استفاده می‌شوند (Petrauskiene, 2008; Mumcuoglu, 2014). زالوهای شناخته شده در تجارت جهانی و پزشکی به جنس *Hirudo* تعلق داشته و شامل ۸ گونه از جمله مدیسینالیس (*Hirudo medicinalis*) و اورینتالیس (*Hirudo orientalis*) هستند (Utevsky *et al.*, 2010; Saglam, 2011; Kutschera and Shain, 2019; CITES, 2020; Ceylan *et al.*, 2021).

گونه‌های مختلف زالو از نظر ریخت‌شناسی (Trontelj and Utevsky, 2005; Phillips and Siddall, 2009)، توالی ژن هسته‌ای و میتوکندریایی (Trontelj and Utevsky, 2005) و توالی ژن میتوکندریایی به همراه ریزماهوره‌های هسته‌ای (Siddall *et al.*, 2007)، مارکرهای مولکولی چندشکلی قطعات DNA حاصل از تکثیر تصادفی (Trontelj *et al.*, 2004; Trontelj and Utevsky, 2005) ترکیب بیوشیمیایی بزاق (Baskova *et al.*, 2008)، در توزیع جغرافیایی و یکاریانس<sup>۲</sup> (Utevsky *et al.*, 2010) و تعداد کروموزوم (Utevsky *et al.*, 2010).

(2009) با یکدیگر تفاوت داشته و از یکدیگر قابل شناسایی هستند.

شناخت خصوصیات زیستی گونه‌های بومی کشور برای حفاظت از گونه و زیستگاه‌های طبیعی آن و کارایی و درستی عملیات مدیریت حفاظت پایدار در رابطه با موجود زنده بسیار مهم است (Maleki Sadabadi *et al.*, 2017). به طور مثال آگاهی از رفتارهای تولیدمثلی گونه می‌تواند به ارتقای پرورش، تکثیر و اقدامات تجاری مرتبط با جاندار هدف کمک کند (Ceylan, 2020). تا به امروز بیشتر پژوهش‌های صورت گرفته در رابطه با زالوهای طبی، بر گونه‌های *H. verbana* و *H. orientalis*، *H. medicinalis* تمرکز یافته است (Petrauskienė *et al.*, 2009; Malek *et al.*, 2019; Manav *et al.*, 2019) و تاکنون مطالعات زیست‌شناسی رشد و تولیدمثل اورینتالیس و مدیسینالیس، دو گونه ارزشمند بومی (جدیدفرد، ۱۳۹۳) و از مهمترین زالوهای طبی و تجاری جهان (Saglam, 2011; CITES, 2020) صورت نگرفته است.

هدف مطالعه حاضر، بررسی مقایسه‌ای رشد، بقا و تولیدمثل در بین دو گونه زالوی طبی بومی کشور، هیروودو مدیسینالیس و هیروودو اورینتالیس بود که برای اولین بار صورت گرفته است.

## مواد و روش‌ها

## زمان، مکان و برنامه مطالعه

مطالعه حاضر در کارگاه تکثیر و پرورش آبریان شرکت گیل برکه (ایران-رشت) طی سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ در سه دوره متوالی صورت گرفته است. در دوره اول زالوهای مولد از زیستگاه طبیعی آن‌ها جمع‌آوری و

<sup>۲</sup> vicariant geographical distribution

برای این تحقیق تکثیر شده و نوزادان حاصل از آن‌ها در طی دوره رشد (تا ۸ ماهگی) و تولیدمثل (۸ تا ۱۰ ماهگی) مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله دوم (تولد تا ۸ ماهگی) که با ۲۰۰ نوزاد از هر گونه (حاصل از تکثیر زالوهای مولد در مرحله اول تحقیق) شروع شد، خصوصیات رشد زالوها مورد بررسی قرار گرفت و در مرحله سوم (۸ تا ۱۰ ماهگی) خصوصیات باروری زالوها با ۵۰ عدد زالو از هر گونه (حاصل از نوزادان رشد یافته زالو در طی مرحله دوم تحقیق) که به سن بلوغ رسیده بودند مورد تحقیق قرار گرفت.

### تهیه زالوهای مولد

زالوهای مولد گونه‌های مدیسینالیس و اورینتالیس (هر گونه ۱۰۰ عدد) از پرورش دهندنده داخلی (زالوپروران، ایران، رشت) که زالوها را از صیادان محلی زالو در زیستگاه طبیعی گونه‌های فوق در استان گیلان دریافت کرده بودند تهیه شد. زالوهای تهیه شده به مدت یک ماه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، و دوره روشنایی-تاریکی ۱۲-۱۲ ساعت و تعویض آب یک روز در میان، دوره سازگاری را طی کردند.

زالوها بر اساس روش‌های متداول مورد استفاده محققین (Wilkin and Scofield, 1991; Davies and McLoughlin, 1996; Utevskaia, 1998; Petrauskienė et al., 2009; Sağlam, 2011) پرورش یافته و تکثیر شدند. زالوها توسط تغذیه به تولیدمثل تشویق شدند (Ceylan et al., 2021) و بعد از قرار گرفتن در مخزن جفت‌گیری به مدت یک ماه، زالوهای جفت‌گیری کرده از روی وضعیت کمربند تناسلی<sup>۳</sup>، شناسایی شده (Wilkin, 1989) و به صورت انفرادی در ظروف پت با خزه اسفاگونوم مرطوب

نگهداری شدند. پيله‌های تولیدی به مخزن نگهداری - پيله‌ها با خزه مشابه انتقال داده شده و به مدت یک ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رطوبت لازم توسط اسپری آب بر روی خزه و دستگاه بخارساز به‌طور مرتب و در فواصل زمانی منظم برای حفظ رطوبت خزه‌ها و پيله‌های نگهداری شده در سیستم نگهداری پيله‌ها فراهم شد زیرا از دست دادن رطوبت در خزه‌ها سبب مرگ جنین‌های داخل پيله‌ها می‌شود. پيله‌هایی که به‌طور طبیعی تخم‌گشایی نشده بودند، به‌طور دستی در پایان دوره نگهداری پيله‌ها باز شده و نوزادان زالو تخم‌گشایی شدند (Ceylan et al., 2021).

### تعیین خصوصیات رشد

خصوصیات رشد زالوها در طی ۱۰ ماه توسط ۲۰۰ عدد زالوی نوزاد از هر گونه که در این تحقیق تخم‌گشایی شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. زالوها هر ۳۰ روز یک بار با خون تازه گوساله با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در روده گوسفند تغذیه شدند. وزن اولیه و طول بدن فرزندان برای زالوی مدیسینالیس به ترتیب  $0.01 \pm 0.045$  گرم و  $0.4 \pm 1/6$  سانتی‌متر و برای زالوی اورینتالیس  $0.01 \pm 0.037$  گرم و  $0.4 \pm 1/6$  سانتی‌متر بود. فرزندان در ظروف ۱۰ لیتری با تراکم ۳۰ زالو در هر ظرف که نیمی از آن‌ها (۵ لیتر) با آب کلرزدایی شده پر شده بود و درب آن‌ها نیز برای جریان هوا دارای منفذهای ریزی شده بودند قرار داده شدند و تراکم نگهداری بسته به میزان رشد در طی دوره سه بار تقلیل یافت.

خون از گوساله‌هایی که از نظر بیماری کنترل شده بوده و در کشتارگاه صنعتی دام رشت ذبح شده بودند به

۱۰۰×[روزها/ ( لگاریتم طبیعی طول اولیه بدن - لگاریتم طبیعی طول نهایی بدن)] = (%). نرخ رشد ویژه در طول بدن

۱۰۰×[روزها/ ( لگاریتم طبیعی وزن اولیه بدن - لگاریتم طبیعی وزن نهایی بدن)] = (%). نرخ رشد ویژه در وزن بدن

فاکتور وضعیت (K) توسط فرمول زیر ( Ricker, 1975) محاسبه شد.

$100 \times (\text{طول بدن} / \text{وزن بدن}) = \text{فاکتور وضعیت}$

### تعیین خصوصیات تولیدمثل

خصوصیات تولیدمثلی در ۵۰ زالوی مولد از هر گونه که در ماه هشتم به بلوغ جنسی رسیده بودند مورد بررسی قرار گرفت. میانگین وزن بدن اولیه مولدین مورد استفاده در دوره تولیدمثل  $1/13 \pm 4/27$  گرم در زالوی مدیسینالیس و  $1/19 \pm 4/45$  گرم در زالوی اورینتالیس بود. مشاهده باروری توسط تورم موضعی و تغییرات رنگ در ناحیه کمر بند تناسلی زالوها مشخص شد (Wilkin, 1989). سن (ماه) و اندازه (طول بدن (سانتی متر) و وزن بدن (گرم)) زالوها در زمان شروع بارداری ثبت شد. زالوهای مولد به‌طور انفرادی در ظرف‌های ۱۰ لیتری که مخزنی به گنجایش ۲ لیتر در آن با خزه مرطوب پر شده بود قرار داده شدند. عملکرد تولیدمثلی به مدت دو ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت ( Davies and McLoughlin, 1996; Coyne and Orr, 2004; Utevsky et al., 2010; Ceylan et al., 2015; Manav et al., 2019; Xiong et al., 2020). برای فراهم کردن جریان هوای مورد نیاز و جلوگیری از فرار زالوهای مولد از توری مناسب برای پوشاندن درب ظروف استفاده شد.

ظروف نگهداری مولدین دو بار در هفته برای حضور پیل‌ها بررسی شدند. در طی دوره، وزن بدن

دست آمد. برای جلوگیری از انعقاد خون تازه از ۶ میلی‌لیتر هیپارین به ازای هر لیتر خون استفاده شد ( Zhang et al., 2008; Malek et al., 2019; Manav et al., 2019).

وزن بدن (گرم) با استفاده از ترازوی حساس (۰/۰۰۱ گرم)، قبل و بعد از تغذیه تعیین شد. زالوها در یک محلول با غلظت ۱/۵ تا ۳ گرم فنوکسی اتانول (۹۹/۹ درصد، شرکت پیشگامان شیمی، ایران) در هر لیتر آب به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه بیهوش شدند و وقتی کاملاً آرام و بی‌حس شدند با استفاده از یک کولیس (با دقت ۰/۱ سانتیمتر) طول زالوها اندازه‌گیری شد ( Ceylan and Çetinkaya, 2017; Ceylan et al., 2021).

در اثر محلول بیهوشی، رفلکس استفراغ در بعضی از زالوهای تغذیه شده دیده می‌شود ( Ceylan et al., 2021) لذا اندازه‌گیری طول قبل از تغذیه، (برای کاهش اثرات دستکاری) تنها در ۳۰ عدد از زالوها در هر گونه صورت گرفت.

شاخص‌های رشد با استفاده از شاخص رشد مطلق، شاخص رشد نسبی و نرخ رشد ویژه توسط فرمول‌های زیر ( Ceylan et al., 2021) اندازه‌گیری شد.

طول اولیه بدن - طول نهایی بدن = رشد مطلق در طول بدن (افزایش طول)

وزن اولیه بدن - وزن نهایی بدن = رشد مطلق در وزن بدن (افزایش وزن)

$100 \times [\text{طول اولیه بدن} / (\text{طول اولیه بدن} - \text{طول نهایی بدن})] = (\%)$  رشد نسبی در طول بدن

$100 \times [\text{وزن اولیه بدن} / (\text{وزن اولیه بدن} - \text{وزن نهایی بدن})] = (\%)$  رشد نسبی در وزن بدن

Wilkin and Scofield, 1991; Petrauskienė et al., 2011) مشخص شد.

$$= [100 \times (200 / \text{تعداد زالوها در پایان دوره})]$$

درصد بقا

### تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با برنامه SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. نرمال بودن با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف آنالیز شد. تفاوت رشد و تولیدمثل بین گونه‌های زالو با استفاده از آزمون T یا آزمون من-وینتی با توجه به تحلیل نرمالیتی انجام شد. تحلیل همبستگی برای ارزیابی اثرات رشد و تولیدمثل انجام شده و همبستگی بین متغیرها در داده‌های با توزیع نرمال با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون و در داده‌های با توزیع غیر نرمال با استفاده از ضریب همبستگی اسپیرمن ارزیابی شد. سطح معنی‌داری خطا  $\alpha = 0.05$  در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد ارائه شده‌اند.

### مجوزهای قانونی

گونه‌های مدیسینالیس و اورینتالیس از زالوهای بومی بوده و در زمره گونه‌های تحت حفاظت کنوانسیون بین‌المللی تجارت گونه‌های در معرض خطر جانوران وحشی و گیاهی<sup>۴</sup> است و باید مجوزهای قانونی لازم برای صید و استفاده از آن‌ها برای مطالعه حاضر به دست آمد باشد لذا زالوهای مورد نیاز از پرورش دهنده دارای صلاحیت و با مجوز قانونی (شرکت زالوپروران) و تحت نظر سازمان شیلات و حفاظت محیط‌زیست تهیه شد.

مولدین و وزن پيله‌ها توسط ترازوی حساس (۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد.

قطر و طول پيله‌ها با استفاده از کولیس دقیق (۰/۰۱ میلی‌متر) تعیین شد. پيله‌ها به مدت ۳۰ روز به‌طور جداگانه در ظروف ۳۵۰ میلی‌لیتری که تا نیمه با خزه مرطوب پر شده بود نگهداری شد و در پایان مدت نگهداری، پيله‌هایی که به‌طور طبیعی تخم‌گشایی نشده بودند، به‌طور دستی باز شده و تعداد فرزندان، وزن بدن (۰/۰۰۱ گرم)، طول (۰/۰۱ میلی‌متر) و فاکتور وضعیت فرزندان مشخص شدند. طول بدن فرزندان بعد از انکوباسیون در ۱/۵ میلی‌لیتر محلول فنوکسی اتانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد (Davies and McLoughlin, 1996; Petrauskienė et al., 2009; Ceylan et al., 2015; Ceylan and Çetinkaya, 2017). ضریب استحصال نوزاد از پيله از فرمول زیر محاسبه شد.

تعداد پيله / تعداد نوزاد به دست آمده از تخم گشایی پيله‌ها = ضریب استحصال نوزاد

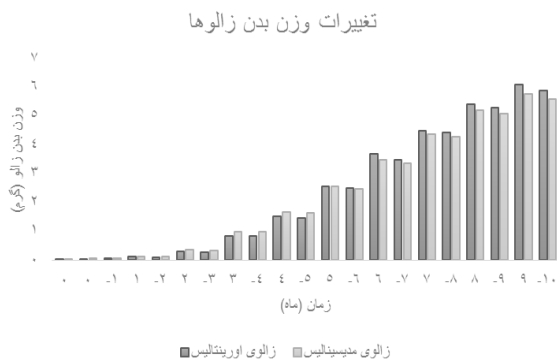
وزن مولد در ابتدای ماه هشتم - وزن مولد در پایان ماه دهم = کاهش وزن مولدین زالو

(۱۰۰ × (وزن مولد در ابتدای ماه هشتم / مقدار کاهش وزن مولدین زالو)) - ۱۰۰ = درصد کاهش وزن مولدین زالو

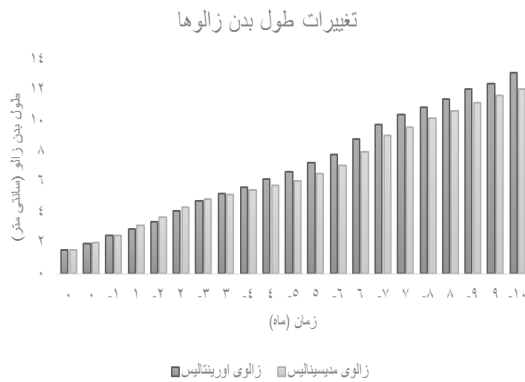
### شاخص بقا

مرگ‌ومیر مورد توجه و ثبت قرار گرفته و آمار تلفات به‌صورت هفتگی تعیین و درصد بازماندگی مربوطه برای تشخیص روند مرگ و میر زالوها برای هر دو دوره رشد و تولیدمثل با استفاده از فرمول زیر

وجود نداشت ( $p < 0/05$ ). به طور کلی فاکتور وضعیت (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در زالوی اوریتالیس کمتر بود. وزن‌های ماهانه بدن، طول‌های بدن و فاکتورهای وضعیت در جدول ۱ و شکل‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱: تغییر ماهانه وزن بدن زالوهای مدیسینالیس و اوریتالیس. مقادیر میانگین برای وضوح به استثنای مقادیر انحراف استاندارد رسم شده‌اند. نشانه '-' زمان قبل از تغذیه و '+' زمان بعد از تغذیه در محور X را نشان می‌دهد ( $p < 0/05$ ).



شکل ۲: تغییر ماهانه طول بدن زالوهای مدیسینالیس و اوریتالیس. مقادیر میانگین برای وضوح به استثنای مقادیر انحراف استاندارد رسم شده‌اند. نشانه '-' زمان قبل از تغذیه و '+' زمان بعد از تغذیه در محور X را نشان می‌دهد ( $p < 0/05$ ).

## بیانیه اخلاق

مطالعه حاضر تحت شرایط و مقررات آیین‌نامه اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی و با رعایت دستورالعمل‌های مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در امور علمی (مصوب وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، ۱۳۹۹) انجام شده است.

## نتایج

### پارامترهای رشد در زالو

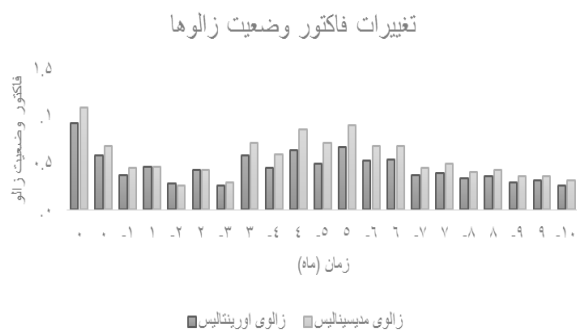
پس از ۱۰ ماه نگهداری، پرورش و تغذیه زالوها در شرایط آزمایشگاهی، میانگین وزن بدن زالوی مدیسینالیس  $5/57 \pm 1/48$  (حداقل ۲/۸۱، حداکثر ۸/۸۹) گرم و میانگین وزن بدن زالوی اوریتالیس  $5/92 \pm 1/58$  (حداقل ۳، حداکثر ۹/۵) گرم بود. در ابتدای دوره، میانگین وزن بدن زالوهای نوزاد در گونه اوریتالیس و گونه مدیسینالیس به ترتیب به  $0/01 \pm 0/01$  و  $0/045 \pm 0/01$  گرم رسید. تا ماه پنجم، نوزادان زالوی مدیسینالیس رشد سریعتری داشتند و پس از آن میانگین میزان رشد در زالوی اوریتالیس بیشتر بود. در پایان مرحله رشد (۴۰ هفتگی)، طول بدن و فاکتور وضعیت زالوی مدیسینالیس به ترتیب  $12/3 \pm 0/18$  (حداقل ۶/۱، حداکثر ۱۹/۲۷) سانتی‌متر و  $0/389 \pm 0/21$  (حداقل ۰/۱۲۴، حداکثر ۱/۲۳) بود، در زالوی اوریتالیس طول بدن و فاکتور وضعیت به ترتیب  $13/25 \pm 3/51$  (حداقل ۶/۷، حداکثر ۲۰/۶۳) سانتی‌متر و  $0/311 \pm 0/17$  (حداقل ۰/۱۰۸، حداکثر ۰/۹۹۳) بود. اگرچه در بعضی از ماه‌ها تفاوت وزن و طول بدن در بین دو گونه معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) بود، در پایان دوره رشد، تفاوت معنی‌داری در این دو عامل

جدول ۱: تغییرات ماهانه وزن بدن، طول بدن و فاکتور وضعیت زالوهای مدیسینالیس و اوریتالیس در دوره رشد (میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد)

ماهها	دوره تغذیه	وزن بدن (گرم)		طول بدن (سانتی‌متر)		فاکتور وضعیت	
		اوریتالیس	مدیسینالیس	اوریتالیس	مدیسینالیس	اوریتالیس	مدیسینالیس
۰	قبل از غذا	۰/۰±۰۳۷/۰۱ <sup>a</sup>	۰/۰±۰۴۵/۰۱۲ <sup>b</sup>	۱/۰±۰۴/۴۲۵	۱/۰±۰۴/۴۲۵	اوریتالیس	۱/۰±۱۱۶/۶۱۹
۰	دهی	۰/۰±۰۴۸/۰۱۳ <sup>a</sup>	۰/۰±۰۵۸/۰۱۵ <sup>b</sup>	۲/۰±۰۰۸/۵۳۲	۲/۰±۰۳۱/۵۴۱	اوریتالیس	۰/۰±۱۳۸/۴۱۲
۱	قبل از غذا	۰/۰±۰۵۹/۰۱۵ <sup>a</sup>	۰/۰±۰۷۰/۰۱۸ <sup>b</sup>	۲/۰±۰۱۳/۶۶۶	۲/۰±۰۳۵/۶۷۶	اوریتالیس	۰/۰±۴۵۷/۲۵۴
۱	دهی	۰/۰±۱۲۱/۰۳۲ <sup>a</sup>	۰/۰±۱۴۴/۰۳۸ <sup>b</sup>	۲/۰±۰۹۹/۷۹۲	۳/۰±۱۶۵/۸۴۴	اوریتالیس	۰/۰±۵۵۷/۳۱۱
۲	قبل از غذا	۰/۰±۱۱۰/۰۲۹ <sup>a</sup>	۰/۰±۱۳۱/۰۳۵ <sup>b</sup>	۳/۰±۳۷۵/۸۹۴	۳/۰±۰۷۰۹/۹۸۸	اوریتالیس	۰/۰±۳۵۲/۱۹۶
۲	دهی	۰/۰±۳۰۳/۰۸۱ <sup>a</sup>	۰/۰±۰۹۴ <sup>b</sup>	۴/۱±۱۱۳/۰۹۴	۴/۱±۴/۱۷۳	اوریتالیس	۰/۰±۵۲۸/۲۹۴
۳	قبل از غذا	۰/۰±۲۹۱/۰۷۷ <sup>a</sup>	۰/۰±۳۴۷/۰۹۲ <sup>b</sup>	۴/۱±۸۲۸/۲۷۹	۴/۱±۹۰۶/۳۰۸	اوریتالیس	۰/۰±۳۱۷/۱۷۶
۳	دهی	۰/۰±۵۱/۲۲۸ <sup>a</sup>	۱/۰±۰۲۶۶ <sup>b</sup>	۵/۱±۲۵۹/۳۹۴ <sup>a</sup>	۵/۱±۲۱۳/۳۹	اوریتالیس	۰/۰±۷۱۸/۳۹۹
۴	قبل از غذا	۰/۰±۸۴/۲۲۶ <sup>a</sup>	۱/۰±۰۰۶/۲۶۸ <sup>b</sup>	۵/۱±۵۴/۴۷۷	۵/۱±۵۴/۴۷۷	اوریتالیس	۰/۰±۵۷/۳۱۷ <sup>a</sup>
۴	دهی	۱/۰±۵۳/۴۱	۱/۰±۶۷/۴۴۷	۶/۱±۲۴/۶۵۴	۵/۱±۷۴۹/۵۳۳	اوریتالیس	۰/۰±۷۷۲/۴۲۹ <sup>a</sup>
۵	قبل از غذا	۱/۰±۴۸۵/۳۹۸ <sup>a</sup>	۱/۰±۶۵۳/۴۴ <sup>b</sup>	۶/۱±۶۷۷/۷۶۹	۶/۱±۱۱/۶۲۹	اوریتالیس	۰/۰±۶۱۲/۳۴ <sup>a</sup>
۵	دهی	۲/۰±۵۹/۶۹۴	۲/۰±۵۶۹/۶۸۵	۷/۱±۳۱۷/۹۳۹ <sup>a</sup>	۶/۱±۵۷۱/۷۵۲ <sup>b</sup>	اوریتالیس	۰/۰±۸۱۱/۴۵۱ <sup>a</sup>
۶	قبل از غذا	۲/۰±۵۱۸/۶۷۵	۲/۰±۵۰۲/۶۶۷	۷/۲±۷۸۲/۰۶۲	۷/۱±۰۶۶/۸۸۴	اوریتالیس	۰/۰±۴۵۷/۲۵۴ <sup>a</sup>
۶	دهی	۳/۰±۷۱۳/۹۹۵	۳/۰±۴۸۳/۹۲۸	۸/۲±۷۸۵/۳۲۸ <sup>a</sup>	۷/۲±۸۸/۱۰۱ <sup>b</sup>	اوریتالیس	۰/۰±۶۷۲/۳۷۳ <sup>a</sup>
۷	قبل از غذا	۳/۰±۵۱۳/۹۴۱	۳/۰±۴۲۵/۹۱۳	۹/۲±۸۰۱/۵۹۱ <sup>a</sup>	۸/۲±۵۶۹/۳۰۹ <sup>b</sup>	اوریتالیس	۰/۰±۴۵۷/۲۵۴ <sup>a</sup>

غذا						
دهی						
۷	بعد از	۴/۱±۳۶۸/۱۶۴	۴/۱±۵۳۶/۲۱۶	۹/۲±۵۸/۵۵۴	۱۰/۲±۳۵۹/۷۴۵	۰/۰±۵/۲۷۸
غذا						
دهی						
۸	قبل از	۴/۱±۲۶۸/۱۳۸	۴/۱±۴۵۶/۱۹۴	۱۰/۲±۱۴۸/۷۰۶	۱۰/۲±۹۵/۹۰۲	۰/۰±۴۱۶/۲۳۱
غذا						
دهی						
۸	بعد از	۵/۱±۲۰۳/۳۸۷	۵/۱±۴۵۸/۴۶۳	۱۰/۲±۶۲۸/۸۳۴	۱۱/۳±۵۰۴/۰۴۹	۰/۰±۴۳۹/۲۴۴
غذا						
دهی						
۹	قبل از	۵/۱±۰۸۴/۳۵۵	۵/۱±۳۱۹/۴۲۵	۱۱/۲±۱۳۱/۹۶۸	۱۲/۳±۱۲۳/۲۳۱	۰/۰±۳۶۶/۲۰۳
غذا						
دهی						
۹	بعد از	۵/۱±۷۶۱/۵۳۶	۶/۱±۱۲۲/۶۴۱	۱۱/۳±۶۵۷/۱۰۸	۱۲/۳±۵۰۴/۳۱۴	۰/۰±۳۸۴/۲۱۳
غذا						
دهی						
۱۰	قبل از	۵/۱±۵۷۲/۴۸۵	۵/۱±۹۲۲/۵۸۷	۱۲/۳±۰۷/۲۱۸	۱۳/۳±۲۵۷/۵۱۳	۰/۰±۳۱۱/۱۷۳ <sup>ab</sup>
غذا						
دهی						
						۰/۰±۳۸۹/۲۱۶ <sup>b</sup>

تفاوت‌های بین میانگین وزن بدن، طول بدن و فاکتور وضعیت که با حروف مختلف در یک خط نشان داده شدند از نظر آماری با توجه به آزمون T معنی دار هستند ( $p < 0.05$ ).



شکل ۳: تغییر ماهانه فاکتور وضعیت زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس.

مقادیر میانگین برای وضوح به استثنای مقادیر انحراف استاندارد رسم شده‌اند ( $p < 0.05$ ). علامت "-" زمان قبل از تغذیه و "+" زمان پس از تغذیه را در ردیف "ماه" نشان می‌دهد.

برای هر گونه از ۵۰ ظرف جهت نگهداری انفرادی زالوها استفاده شد، موارد استفراغ خون در ۵۷ ظرف در ۳۶ روز مختلف برای زالوی مدیسینالیس و ۴۳ ظرف در ۳۱ روز مختلف برای زالوی اورینتالیس در طی دوره رشد (تا سن ۱۰ ماهگی) اتفاق افتاده است. در حین غذادهی ماهانه، استفراغ خون در گونه مدیسینالیس تا ۱۳/۶±۱/۵ روز پس از تغذیه و در گونه اورینتالیس نیز تا ۱۲/۵±۵/۸ روز پس از تغذیه دوام آورد.

**نرخ رشد در زالو**

مقادیر نرخ رشد ویژه، رشد نسبی و رشد مطلق در زالوی اورینتالیس در مقایسه با زالوی مدیسینالیس بیشتر بود (جدول ۲).

**شکل‌گیری و روند بارداری**

در هر دو گونه، بارداری از ماه ششم آغاز شد و آخرین زالوی باردار در ماه ۱۱ مشاهده شد. بالاترین نرخ بارداری در ماه نهم با ۹۶ درصد در زالوی

مدیسینالیس و ۹۸ درصد در زالوی اورینتالیس دیده شد که نشان از رسیدن به اندازه بلوغ جنسی در اغلب زالوها است. کوچک‌ترین زالوی باردار دارای وزن بدن ۱/۷۳ گرم و طول بدن ۴/۳۷ سانتی‌متر در گونه مدیسینالیس و ۱/۷۸ گرم و ۴/۹۵ سانتی‌متر در گونه اورینتالیس بود. تغییر ماهانه بارداری در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲: شاخص‌های رشد در طول و وزن بدن زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس

نرخ‌های رشد	مدیسینالیس	اورینتالیس
رشد مطلق در طول بدن	۱۰/۴۶۵ ± ۲/۷۹۳ <sup>b</sup>	۱۱/۶۵۳ ± ۳/۰۸۷ <sup>a</sup>
رشد مطلق در وزن بدن	۵/۵۲۶ ± ۱/۴۷۳	۵/۸۸۴ ± ۱/۵۷۷
رشد نسبی در طول بدن	۶۵۱/۸۹۵ ± ۲/۸۲۶ <sup>b</sup>	۷۲۶/۰۸۴ ± ۰/۱۶ <sup>a</sup>
رشد نسبی در وزن بدن	۱۲۱۵۷/۱۴۵ ± ۷۵/۷۲۷ <sup>b</sup>	۱۵۶۵۴/۹۸۲ ± ۱۵۷/۷۴۷ <sup>a</sup>
نرخ رشد ویژه در طول بدن	۰/۷۲ ± ۰/۰۰۱ <sup>b</sup>	۰/۷۵۴ ± ۰/۰۰۱ <sup>a</sup>
نرخ رشد ویژه در وزن بدن	۱/۷۱۷ ± ۰/۰۰۲ <sup>b</sup>	۱/۸۰۷ ± ۰/۰۰۴ <sup>a</sup>

تفاوت‌های بین میانگین که با حروف مختلف در یک خط نشان داده شدند از نظر آماری با توجه به آزمون T معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ ).

جدول ۳: تغییرات ماهانه بارداری (درصد) در گله مولدین زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس.

ماه‌ها (سن زالو)	زالوی مدیسینالیس	زالوی اورینتالیس
۵	۰	۰
۶	۴	۶
۷	۶۲	۷۴
۸	۹۰	۹۲
۹	۹۶	۹۸
۱۰	۹۲	۹۴
۱۱	۶	۱۰
۱۲	۰	۰

به دلیل ممانعت از مشکلات تغذیه‌ای و پرهیز از تداخل در روند تولید مثلی زالوها، تغذیه زالوهای مولد در طی دوره تولید مثل (ماه‌های ۸ تا ۱۰) صورت نگرفت. در پایان دوره پيله‌گذاری که به مدت ۸ هفته به طول انجامید، کاهش وزن بدن (نسبت به هفته اول تولید مثل) زالوهای مولد به مقدار  $۲/۴۳ \pm ۰/۶۴۷$  گرم ( $۴۳/۰۴$  درصد) در گونه مدیسینالیس و  $۲/۵۳ \pm ۰/۶۸$  گرم ( $۴۳/۰۲$  درصد) در گونه اورینتالیس مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴: تغییرات هفتگی وزن بدن مولدین زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس در دوره پيله گذاري (۸ تا ۱۰ ماهگی).

هفته‌ها	مدیسینالیس	اورینتالیس
اولیه	۴/۲۶۸ ± ۱/۱۳۸	۴/۴۵۶ ± ۱/۱۹۴
۱	۳/۸۹۶ ± ۱/۰۳۹	۴/۰۶۸ ± ۱/۰۹
۲	۳/۴۷۱ ± ۰/۹۲۵	۳/۶۲۴ ± ۰/۹۷۱
۳	۳/۰۲ ± ۰/۸۰۵	۳/۱۵۳ ± ۰/۸۴۵
۴	۲/۶۴۸ ± ۰/۷۰۶	۲/۷۶۵ ± ۰/۷۴۱
۵	۲/۳۷۶ ± ۰/۶۳۳	۲/۴۸ ± ۰/۶۶۵
۶	۲/۱۵۷ ± ۰/۵۷۵	۲/۲۵۲ ± ۰/۶۰۳
۷	۱/۹۵۸ ± ۰/۵۲۲	۲/۰۴۴ ± ۰/۵۴۸
۸	۱/۸۳۸ ± ۰/۴۹	۱/۹۱۹ ± ۰/۵۱۴

تفاوت‌های بین میانگین که با حروف مختلف در یک خط نشان داده شدند از نظر آماری با توجه به آزمون T معنی دار هستند ( $p < 0.01$ ).

مولد ۴/۴ ± ۱/۸۲ (حداقل ۱، حداکثر ۹) در گونه مدیسینالیس و ۳/۴ ± ۱/۴۱ (حداقل ۱، حداکثر ۹) در گونه اورینتالیس بود. بین گونه‌های زالو تفاوت معنی‌داری از نظر عملکرد تولید پيله در بین زالوهای مولد وجود داشت ( $p < 0.01$ ).

پيله‌های زالوی مدیسینالیس بزرگتر از زالوی اورینتالیس بودند. تفاوت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) از نظر وزن پيله و کلیه پارامترهای مورفومتریک پيله بین دو گونه زالو وجود داشت (جدول ۵). اندازه پيله با گذشت زمان به تدریج کاهش یافت اگرچه در مراحل اولیه دوره تولید مثل در هر دو گونه، مقدار این کاهش بارزتر بود (در پيله‌های گذاشته شده توسط یک زالو، تفاوت وزن بیشتری بین پيله‌های اولیه نسبت به پيله‌های انتهایی دوره تولید مثلی وجود داشت). وزن پيله در زالوی مدیسینالیس در هفته اول ۰/۸۱ ± ۰/۱۲ گرم بود و به تدریج به ۰/۴۶ ± ۰/۱ گرم کاهش یافت، در حالی که در زالوی اورینتالیس وزن پيله از ۰/۴۳ ± ۰/۱۴ گرم در هفته اول به تدریج به ۰/۲۸ ± ۰/۱۶ گرم در هفته آخر کاهش یافت. بین وزن زالوی مولد و وزن پيله ( $r = 0.748$ ) و

### فرآیند پيله گذاري در زالوهای مولد

گرچه زالوهای مولد هر دو گونه در هفته اول دوره تولید مثل (ماه‌های هشتم تا دهم) شروع به پيله گذاري کردند، اولین پيله‌ها پس از ۱۱/۴ ± ۶/۰۵ روز در گونه مدیسینالیس و ۱۳/۷۷ ± ۸/۷۸ روز در گونه اورینتالیس گذارده شد. فاصله زمانی بین گذاشتن یک پيله تا پيله بعدی توسط یک زالو تعیین شد و ۱۰/۳ ± ۵/۰۵ روز در زالوی مدیسینالیس و ۱۱/۱۷ ± ۶/۴ روز در زالوی اورینتالیس بود. در گونه مدیسینالیس اولین زالویی که پيله گذاري را به اتمام رساند در هفته سوم ثبت شد و آخرین مشاهده از پيله گذاري در هفته هشتم صورت گرفت. اولین اتمام پيله گذاري در زالوهای اورینتالیس در هفته چهارم ثبت شد و آخرین پيله گذاشته شده در هفته هشتم مشاهده شد.

### مقدار تولید پيله

در مجموع ۲۲۰ پيله از زالوهای مولد مدیسینالیس به دست آمد، در حالیکه ۱۷۰ پيله از زالوهای مولد اورینتالیس حاصل شد. بازده تولید پيله در هر زالوی

طول پيله ( $r=0/54$ ) همبستگی مثبت وجود داشت ( $p<0/001$ ).

### نوزادان زالو

در مجموع ۱۷۰۲ نوزاد زالوی مدیسینالیس و ۱۵۴۸ نوزاد زالوی اورینتالیس از تخم‌گشایی پيله‌های به دست آمده از مولدین شمارش شد. با در نظر گرفتن پيله‌هایی که حداقل یک زالو از آن تخم‌گشایی شده باشد، متوسط هم‌آوری (پيله/فرزند) در زالوی مدیسینالیس  $10/6 \pm 1/82$  (حداقل ۱، حداکثر ۱۵) و در زالوی اورینتالیس  $12/9 \pm 1/41$  (حداقل ۱، حداکثر ۱۹)

بود. باین حال، و با توجه به همه پيله‌ها (پيله‌های دارای تخم، پيله‌های فاقد تخم و پيله‌های تغییر شکل یافته)، حتی پيله‌هایی که تخم‌گشایی نداشتند، متوسط هم‌آوری (پيله / فرزند) در زالوی مدیسینالیس ۷/۷ (حداقل صفر، حداکثر ۱۵) و در زالوی اورینتالیس ۹/۱ (حداقل صفر، حداکثر ۱۹) بود. تعداد نوزادان به ازای هر یک از زالوهای مولد پيله گذاشته در دو گونه با ۳۰/۹۶ عدد در زالوی اورینتالیس در مقایسه با ۳۴/۴۷ عدد در زالوی مدیسینالیس تفاوت معنی‌داری نداشتند ( $p<0/05$ ) (جدول ۵).

جدول ۵: تعداد، وضعیت سلامت و پارامترهای مورفومتریک پيله‌ها در بارداری و پيله‌گذاری زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس (۵۰ زالوی مولد از هر گونه).

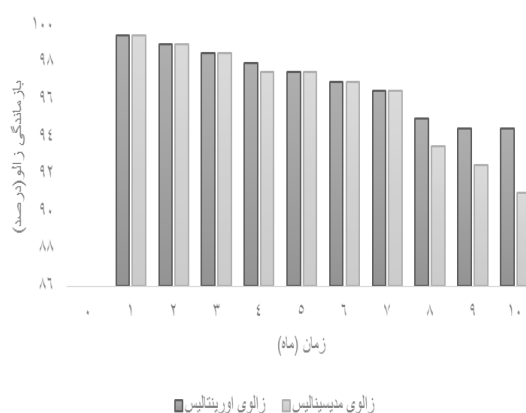
پارامترها	مدیسینالیس	اورینتالیس	t	f	d
درصد زالوهای مولد که پيله گذاشتند	۶۶/۹	۸۲/۵			
تعداد کل پيله‌ها	۲۲۰	۱۷۰			
تعداد پيله به ازای زالوهای پيله گذاشته	$4/1 \pm 4/829^b$	$3/1 \pm 4/413^a$	۳/۰۵	۸	۹
تعداد پيله به ازای همه زالوها	۲/۹۳	۲/۵۷			
تعداد نوزاد به ازای همه زالوها	۲۲/۶۷	۲۳/۴۶			
تعداد نوزاد به ازای زالوهای پيله گذاشته	$34/14 \pm 0/47/156$	$30/12 \pm 9/65/874$	۱/۱۳۹	۸	۹
ضریب استحصال نوزاد از پيله	۱۰/۶	۱۲/۹			
نرخ ناهنجاری و عدم تخم‌گشایی (درصد)	۲۷	۲۹/۴			
وزن پيله (گرم)	$0/0 \pm 81/46^b$	$0/0 \pm 43/28^a$	۴/۹۷	۸	۹
طول پيله (میلی‌متر)	$20/4 \pm 91/05^b$	$13/2 \pm 21/29^a$	۱۱/۶۹	۸	۹
قطر پيله (میلی‌متر)	$16/2 \pm 1/16^b$	$8/2 \pm 76/08^a$	۱۷/۲۷	۸	۹
نسبت طول بر قطر پيله	$1/0 \pm 3/18^b$	$1/0 \pm 54/24^a$	۵/۵۵	۸	۹

تفاوت‌های بین میانگین که با حروف مختلف در یک خط نشان داده شدند از نظر آماری با توجه به آزمون T معنی‌دار هستند ( $p<0/01$ ).

## میزان بقا در زالو

میزان بقا در هر دو دوره رشد (تا ۸ ماهگی) و تولیدمثل (۸ تا ۱۰ ماهگی) محاسبه شد. در دوره رشد فقط ۶/۵ درصد زالوی مدیسینالیس تلف شد (نرخ بازماندگی ۹۳/۵ درصد)، در حالی که تلفات دوره رشد در زالوی اورینتالیس ۵ درصد بود (نرخ بازماندگی ۹۵ درصد). میزان بقای زالوی اورینتالیس در دوره تولیدمثل از زالوی مدیسینالیس بیشتر بود به طوری که میزان تلفات زالوی اورینتالیس در پایان دوره دو ماهه تولیدمثل معادل ۰/۵ درصد (نرخ بازماندگی ۹۴/۵ درصد) و تلفات زالوی مدیسینالیس در این دوره ۲/۵ درصد بود (نرخ بازماندگی ۹۱ درصد).

تغییرات بازماندگی زالوها



شکل ۴: تغییر ماهانه بازماندگی زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس. مقادیر میانگین برای وضوح به استثنای مقادیر انحراف استاندارد رسم شده‌اند ( $p < 0.05$ ).

## بحث

### خصوصیات رشد زالوها

زالوی مدیسینالیس در ۵ ماه اول رشد سریعتری نسبت به زالوی اورینتالیس داشت. پس از آن و تا پایان

دوره، زالوهای اورینتالیس از نظر وزن بدن جلوتر بودند.

با توجه به یافته‌های مطالعات حاضر و قبلی (Petrauskienė et al., 2009, 2011; Malek et al., 2019; Manav et al., 2019) می‌توان دریافت که زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس خصوصیات و رفتارهای زیستی مشابهی را نشان داده و روابط خواهری با یکدیگر دارند که این قرابت‌ها در شرایط کنترل شده تکثیر و پرورش بیشتر نمایان می‌شود.

مطالعه حاضر بر زالوهای طبی بومی ایران، *H. medicinalis* و *H. orientalis* نشان می‌دهد که این زالوها نیز همانند زالوی طبی وارداتی (*H. verbana*) می‌توانند در شرایط کنترل شده تکثیر شوند و اگرچه امکان بهبود شرایط تکثیر و پرورش در محیط‌های کنترل شده برای انواع زالوی طبی وجود دارد با این وجود زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس به دلیل تطبیق زیستی درازمدت با شرایط اقلیمی ایران (به ویژه در شمال کشور) و داشتن مزیت‌های زیستی و پرورشی که از نتایج این تحقیق بدست آمده است به‌عنوان گزینه‌های مطرح برای پرورش زالوی طبی در کشور، مدنظر هستند.

نوع و مقدار تقاضای مصرف زالو در صنعت و تجارت متفاوت بوده اما مصارف پزشکی و درمانی به زالوی با وزن کمتر از ۱ تا ۱/۵ گرم بیشتر متمایل است (Ceylan and Cetinkaya, 2017) که این زالو باید یک دوره قرنطینه ۳ تا ۴ ماهه را قبل از استفاده طی کرده باشد تا اطمینان از گرسنگی زالو و تمایل به مکیدن خون در آن حاصل و نیز مهار عوامل بیماری‌زای احتمالی که ممکن است منجر به بیماری میزبان گردد مقدور شود. با توجه به اینکه الگوی رشد زالوهای طبی

نرخ رشد ویژه در وزن بدن زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس به ترتیب ۱/۷۱۷ و ۱/۸۰۷ گرم بود درحالی‌که در *Hirudinaria manillensis* و *Whitmania pigra* به ترتیب ۳/۹۲ و ۷/۲۴ گرم بود (Zhang et al., 2008). زالوهای طبی به محض شروع تغذیه اقدام به تغلیظ خون کرده و طی دو هفته بعد از تغذیه حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد افزایش وزن بدن حاصل از تغذیه را از دست داده و سپس به تعادل می‌رسند (Petrauskienė, 2001). صرف نظر از رشد جهش‌وار در چند ماه نخست زندگی (تا ماه چهارم)، میزان افزایش وزن ماهانه از حدود ۶۰ درصد در ماه پنجم به حدود ۱۰ درصد در ماه دهم کاهش یافت که مبین این مطلب است که با افزایش سن زالوهای طبی، میزان رشد به سرعت کاهش یافته است.

### خصوصیات تولیدمثل

بر اساس یافته‌های این تحقیق، وزن بدن زالوهای مولد در پایان دوره تولیدمثل دو ماهه (ماه دهم) نسبت به وزن ابتدای دوره پيله‌گذاری در ماه هشتم، ۴۳/۰۴ درصد در زالوی مدیسینالیس و ۴۳/۰۲ درصد در زالوی اورینتالیس کاهش یافت. این کاهش وزن از یک سو به دلیل عدم تغذیه زالوهای مولد در طی دو ماه پيله‌گذاری و از سوی دیگر ناشی از صرف انرژی برای حرکت و فعالیت بدنی زالو برای یافتن محل مناسب پيله‌گذاری و گذاشتن پيله در طی دوره تولید مثلی است.

مقدار کاهش وزن بدن *H. verbana* در مطالعات قبلی انجام شده ۹ ± ۶۶ درصد (Ceylan et al., 2015; Manav et al., 2019) گزارش شده است. این تفاوت می‌تواند ناشی از طول دوره تولید مثلی مورد

روندی با افت و خیز بوده است (Wilkin and Scofield, 1991) و بسته به سن و مرحله رشد می‌تواند کاهش ۱۷ تا ۴۶ درصد در وزن بدن را در طی یک ماه در بین دوره‌های تغذیه‌ای تجربه کند (Manav et al., 2019) لذا ضروری است که زالو در آخرین تغذیه قبل از دوره قرنطینه به وزن بدن ۱/۷-۳ گرم برسد به طوری که نهایتاً وزن بدن زالوها به ۱-۱/۵ گرم کاهش می‌یابد. با در نظر گرفتن تقاضای بخش برای اندازه زالو و مدل رشد زالوی طبی، رسیدن به وزن نهایی هدف تغذیه (۱/۷-۳ گرم) قبل از دوره قرنطینه، مزیت مهمی برای زالوهای طبی بومی ایران *H. medicinalis* و *H. orientalis* است که در سن هفت ماهگی به وزن قبل از تغذیه بالای ۳ گرم دست پیدا کردند.

استفراغ خون به طور کلی در ۱۰ روز اول پس از تغذیه رخ داده است، که این رفتار معمول در زالوی طبی است (Ceylan and Erbatu, 2012; Manav et al., 2019). تمایل به کاهش استفراغ خون به عنوان تابعی از زمان را می‌توان با بازتاب غالب روند آسیب‌شناختی ناشی از تعارض بین خون مصرف شده و محیط‌زیست خرد بافتی<sup>۵</sup> در مراحل اول پس از تغذیه توضیح داد. بروز استفراغ خون حتی پس از ۶۶ روز (Ceylan and Erbatu, 2012)، نشان می‌دهد که رفلکس استفراغ خون ممکن است حتی در مراحل پیشرفته فرآیند هضم نیز تحریک شود. زالوهای مدیسینالیس و اورینتالیس به ترتیب تا ۱۳/۱ و ۱۲/۵ روز بعد از تغذیه واکنش استفراغ خون را در این تحقیق از خود نشان دادند که در مقایسه با نتایج پژوهش‌های قبلی ذکر شده در این زمینه از حد قابل قبولی برخوردار بوده است.

<sup>۵</sup>tissue microenvironment

مطالعه، تفاوت گونه، تفاوت خصوصیات زیستی و تفاوت‌های شرایط محیطی پرورش باشد.

*H. verbana* به دلیل توانایی زنده ماندن در شرایط بی‌ثبات محیطی، رشد بالا و عملکرد تولیدمثل، به‌عنوان یک ارگانسیم استراتژیست با حداکثر ظرفیت تولیدمثل ارزیابی شده است (Utevsky et al., 2010; Petrauskienė et al., 2011; Ceylan et al., 2015). واقعیت این است که با بیش از ۴۰ درصد کاهش وزن بدن در زالوهای مولد مدیسینالیس و اورینتالیس در طول دوره تولیدمثل در این تحقیق، هنوز تلاش برای تولیدمثل توسط زالوهای مولد نشان داده می‌شود.

با توجه به نتایج پژوهش‌های انجام یافته مذکور بر *H. verbana* و در نظر گرفتن یافته‌های مطالعه حاضر، ما توصیه می‌کنیم زالوهای بومی مدیسینالیس و اورینتالیس به دلیل عملکرد باروری بالا با وجود اندازه نسبتاً کوچک آن در لیست ارگانسیم‌های استراتژیست I و با قابلیت تولیدمثل حداکثر در نظر گرفته شود.

هنگامی که دو گونه زالوی بومی ایرانی *H. medicinalis* و *H. orientalis* با یکدیگر مقایسه می‌شود، زالوی اورینتالیس به دلیل داشتن عملکرد باروری بالا به‌عنوان عاملی برای جبران مرگ‌ومیر در مرحله رشد، نرخ زادآوری بیشتر و رشد مطلوبتر در دوره رشد می‌تواند یک گونه استراتژیست با حداکثر ظرفیت تولیدمثل بهتر باشد.

بازده پيله در زالوی مدیسینالیس  $1/82 \pm 4/4$  پيله / زالو و در زالوی اورینتالیس  $1/43 \pm 3/43$  پيله / زالو بود. طبق مطالعات قبلی که در جنس *Hirudo* انجام شده است، کمترین کارایی پيله با  $1/71 \pm 0/29$  پيله / زالو در

گونه مدیسینالیس (Davies and McLoughlin, 1996) و  $2/53 \pm 0/35$  پيله / زالو در گونه اورینتالیس (Petrauskienė et al., 2011) و بیشترین کارایی پيله با  $4/39 \pm 0/59$  پيله / زالو در گونه مدیسینالیس و  $3/07 \pm 0/39$  پيله / زالو در گونه اورینتالیس بود. این تفاوت می‌تواند ناشی از شرایط پرورش و شرایط فیزیولوژیکی زالو (سن، نوبت تولید مثلی، کمیت و کیفیت تغذیه دریافتی) در هنگام پيله-گذاری باشد.

تعداد پيله تولیدی در زالوی اورینتالیس در مقایسه با زالوی مدیسینالیس به‌طور قابل توجهی کمتر بود اما تعداد زالوی تولید شده از هر پيله در زالوی اورینتالیس (۱۲/۹ عدد) در مقایسه با زالوی مدیسینالیس (۱۰/۶ عدد) بیشتر بود که ناشی از ضریب استحصال نوزاد بیشتر در زالوی اورینتالیس و داشتن نوزادان با وزن کمتر است. تعداد نوزادان به ازای زالوهای مولد پيله گذاشته در دو گونه با  $30/96$  عدد در گونه اورینتالیس در مقایسه با  $34/47$  عدد در گونه مدیسینالیس تفاوت معنی‌داری نداشتند.

تغییر شکل در پيله‌ها را می‌توان در زیستگاه‌های طبیعی زالوهای طبی نیز مشاهده کرد، در مطالعه حاضر، عدم تخم‌گشایی در  $29/4$  درصد از پيله‌های گونه اورینتالیس و  $27$  درصد از پيله‌های گونه مدیسینالیس دیده شد که شامل پيله‌هایی بودند که تغییر شکل یافته بوده و یا ظاهر سالمی داشته ولی فاقد تخم قابل تخم‌گشایی بودند.

لایه اسفنجی اطراف پيله عملکردهای حیاتی مختلفی مانند محافظت از پيله در برابر شکارچیان (Wilkin, 1989) و جلوگیری از اتلاف رطوبت را که می‌تواند منجر به مرگ جنینی در طی دوره تخم‌گشایی

<sup>1</sup>r-strategist species =R-selected species

بیشتر تلفات زالو را در ماه‌های نزدیک بلوغ یا در هنگام تولیدمثل و آغاز بارداری بیان کرده است (Petrauskienė et al., 2011; Malek et al., 2019; ) (Manav et al., 2019)، بقا در مرحله رشد در زالوهای اوریتتالیس و مدیسینالیس به ترتیب معادل ۹۳/۵ درصد و ۹۵ درصد بود درحالی‌که میزان تلفات در دوره تولیدمثل (ماه‌های هشتم تا دهم) در زالوهای اوریتتالیس و مدیسینالیس به ترتیب معادل ۰/۵ درصد و ۲/۵ درصد بود.

### نتیجه‌گیری

اگرچه زالوی اوریتتالیس در مقایسه با زالوی مدیسینالیس، نوزاد و پيله کوچکتری داشته و پيله بدون تخم‌گشایی بیشتری تولید می‌کند اما زودتر به اندازه مورد تقاضای بخش زالوی طبی رسیده و تقریباً همه زالوهای اوریتتالیس در سال اول به بلوغ جنسی می‌رسند و دوره تولید مثلی را با تلفات کمتر سپری کرده و نوزاد بیشتری از هر پيله حاصل کرده و ناهنجاری مورفولوژیکی کمتری در فرزندان دارد و گزینه مناسبتری برای استفاده در صنعت تکثیر و پرورش زالوی طبی کشور است. در راستای یافته‌های مطالعه حاضر با هدف بررسی و شناخت خصوصیات بیولوژیکی *H. orientalis* و *H. medicinalis*، ما مطالعات بیشتری را برای بهبود شرایط پرورش و تکثیر زالوهای بومی ایران توصیه می‌کنیم.

شود، انجام می‌دهد (Saidel et al., 2018)، بنابراین بررسی اثرات محیط‌های مختلف پيله‌گذاری و شرایط مختلف پرورش بر میزان تغییر شکل و تخم‌گشایی پيله در زالوهای بومی ایران *H. orientalis* و *H. medicinalis*، مشابه مطالعه انجام شده بر روی گونه *H. verbena* (Ugural and Serezli, 2020)، می‌تواند مفید باشد.

همبستگی بین وزن بدن زالوهای مولد با وزن پيله  $(r=0.748)$  و طول پيله  $(r=0.54)$ ، فرصتی را برای تخمین اندازه پيله از وزن بدن زالوهای مولد و توزیع وزن زالوی مولد از اندازه پيله در هر دو شرایط کنترل شده و در زیستگاه‌های طبیعی فراهم می‌کند.

از آنجا که تخم‌گشایی به‌طور کلی در پيله‌هایی که تغییر شکل مورفولوژیکی دارند اتفاق نمی‌افتد، بنابراین تصور می‌شود که موارد ناهنجاری مورفولوژیکی در فرزندان باید مستقل از پيله‌ها ارزیابی شود.

بر اساس مطالعات قبلی، نرخ غیرطبیعی در فرزندان ۵/۳ تا ۸ درصد (Ceylan, 2020) گزارش شده بود، با تأکید بر اینکه افزایش سن مولد باعث افزایش تعداد فرزندان مبتلا به ناهنجاری‌های مورفولوژیکی نیز می‌شود. در نتیجه ما استفاده از زالوهای مولد جوان را پیشنهاد می‌کنیم که باعث می‌شود ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در تعداد کم‌تری از فرزندان حاصل شده به نمایش گذاشته شود.

### بقا

یک یافته مهم مطالعه حاضر این است که بیشتر مرگ‌ومیرها در زالوهای اوریتتالیس و مدیسینالیس در طول دوره رشد و تا رسیدن به سن ۸ ماهگی رخ داده است، در مقایسه با مطالعات قبلی که

Invertebrate Reproduction and Development, 65, 57-68.

8. CITES., 2020. CITES Trade Database. <[https://trade.cites.org/en/cites\\_trade/CITES Dec 15 ed](https://trade.cites.org/en/cites_trade/CITES Dec 15 ed)>. Downloaded on 15 december 2020.
9. Coyne, J. A., Orr, H. A., 2004. Speciation. Sinauer Associates, Massachusetts, p. 533.
10. Davies, R., McLoughlin, N., 1996. The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Freshwater Biology*, 36, 563-568.
11. Malek, M., Jafarifar, F., Roohi Aminjan, A., Salehi, H., Parsa, H., 2019. Culture of a new medicinal leech: growth, survival and reproduction of *Hirudo orientalis* Utevsky and Trontelj, 2005 under laboratory conditions. *Journal of Natural History*, 53, 627-637.
12. Maleki Sadabadi, Z., Ejtehadi, H., Abrishamchi, P., Vaezi, J., Erfanian Taleii Noghani, M. B., 2017. Comparative study of autecological, morphological, anatomical and karyological characteristics of *Acanthophyllum ejtehadii* Mahmoudi and Vaezi (Caryophyllaceae): a rare endemic in Iran. *Taiwania*, 62, 321-330.
13. Manav, M., Ceylan, M., Buyukcapar, H. M., 2019. Investigation of reproductive efficiency, growth performance and survival of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820 fed with mammalian and poultry blood. *Animal Reproduction Science*, 206, 27-37.
14. Petrauskiene, L., 2008. The use of the medicinal leech (*Hirudo* sp.) in ecotoxicological and other scientific research-a short review. *Lauterbornia*, 65, 163-175.
15. Petrauskiene, L., Utevska, O., Utevsky, S., 2011. Reproductive biology and ecological strategies of three species of medicinal leeches (genus *Hirudo*). *Journal of Natural History*, 45, 737-747.

## سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

## منابع

۱. جدیدفرد، ع.، ۱۳۹۳. بررسی امکان پرورش آزمایشگاهی زالوی طبی (*Hirudo medicinalis*) با استفاده از جیره‌ها و افزودنی‌های غذایی مختلف. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ۱۲۸ ص.
2. Baskova, I., Kostrjukova, E., Vlasova, M., Kharitonova, O., Levitskiy, S., Zavalova, L., Moshkovskii, S., 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. Ceylan, M., Erbatur, İ., 2012. A study on nutrition of medicinal leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820): Cannibalism? *Su Urunleri Dergisi*, 29, 167-170.
4. Ceylan, M., Cetinkaya, O., Kucukkara, R., Akcimen, U., 2015. Reproduction efficiency of the medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 411-418.
5. Ceylan, M., Cetinkaya, O., 2017. Investigation on the Collection and Economy of Medicinal Leeches from Wetlands Around Lake Egirdir, Turkey. *Turkiye Parazitolojii Dergisi*, 41, 96-101.
6. Ceylan, M., 2020. Effects of maternal age on reproductive performance of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Animal Reproduction Science*, 218, 1-6.
7. Ceylan, M., Kucukkara, R., Erbatur, İ., Karatas, E., Tunc, M., Saglam, N., 2021. Growth, survival and reproduction of the Turkish medicinal leech, *Hirudo sulukii*.

25. Utevskaia, O., 1998. Analysis of reproductive ability. *Vestnik Zoologii*, 32, 119-122.
26. Utevsky, S., Kovalenko, N., Doroshenko, K., Petrauskiene, L., Klymenko, V., 2009. Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.). *Systematic parasitology*, 74, 95-102.
27. Utevsky, S., Zgajmajster, M., Atemasov, A., Zineko, O., Utevska, O., Utevsky, A., Trontelj, P., 2010. Distribution and status of medicinal leeches (genus *Hirudo*) in the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 20, 198-210.
28. Wilkin, P., 1989. The medicinal leech, *Hirudo medicinalis* (L.) (Hirudinea: Gnathobdellae), at Dungeness, Kent. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 101, 45-57.
29. Wilkin, P., Scofield, A., 1991. Growth of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, under natural and laboratory conditions. *Freshwater Biology*, 25, 547-553.
30. Xiong, L., Wang, S., Wang, Q., Wang, J., 2020. Reproduction efficiency of the leech *Whitmania pigra* and multiple paternity revealed by microsatellite analyses. *Invertebrate Reproduction and Development*, 64, 201-207.
31. Zhang, B., LIN, Q., LIN, J., CHU, X., LU, J., 2008. Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the leech, *Hirudinaria manillensis* Lesson, 1842. *Aquaculture*, 276, 198-204.
16. Phillips, A. J., Siddall, M. E., 2009. Poly-paraphyly of Hirudinidae: many lineages of medicinal leeches. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 1-11.
17. Ricker, W. E., 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*. 382p.
18. Saglam, N., 2011. Protection and sustainability, exportation of some species of medicinal leeches (*Hirudo medicinalis* L., 1758 and *Hirudo verbana* Carena, 1820). *Journal of Fisheries Sciences.Com*, 5, 1-15.
19. Saidel, W.M., Saglam, N., Salas-de la Cruz, D., Saunders, R., Shain, D.H., 2018. Elaborate ultrastructure of the *Hirudo* (Annelida: Hirudinae) cocoon surface. *Journal of Morphology*, 279, 545-553.
20. Siddall, M. E., Trontelj, P., Utevsky, S. Y., Nkamany, M., Macdonald III, K. S., 2007. Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 1481-1487.
21. Sket, B., Trontelj, P., 2007. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*. Springer, 595, 129-137.
22. Trontelj, P., Sotler, M., Verovnik, R., 2004. Genetic differentiation between two species of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* and the neglected *H. verbana*, based on random-amplified polymorphic DNA. *Parasitology Research*, 94, 118-124.
23. Trontelj, P., Utevsky, S. Y., 2005. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, 616-624.
24. Ugural, B., Serezli, R., 2020. Effects of various environments on number of cocoon and offspring in breeding of southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 207-211.