



مقاله مروری:

مروری بر تولیدمثل و کوکون گذاری در زالو

سپیده فیروزبخش^{*}، محمد سوداگر^۱

*Sepide.firouzbakhsh_s02@gau.ac.ir

۱-گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۲

چکیده

در دهه های اخیر، به علت اهمیت استفاده از زالوها در علوم پزشکی و درمان بسیاری از بیماری ها، این موجودات بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. زالوها همافروdit هستند، اما توانایی خودباروری ندارند. مطالعات ریخت شناسی بر گونه های مختلف زالو نشان می دهد که موقعیت منافذ تناسلی نر و ماده از اهمیت بالایی برخوردار است. این منافذ در ناحیه کلیتوم زالو قرار دارند. ناحیه کلیتوم، مسئول بروز رفتارهای تولیدمثلی در زالو است. این ناحیه معمولاً به صورت چند حلقه متورم در بخش قدامی بدن زالو قرار دارد که در زمان تولیدمثل قابل مشاهده است. جفت گیری در زالوها از طریق لقاح داخلی و تبادل اسپرم به اندام تناسلی زالوی ماده دیگر است. غدد موجود در ناحیه کلیتوم، مواد مغذی و پروتئین های لازم برای تشکیل کوکون را تولید می کنند. تخم های زالو از منفذ زالوی ماده به داخل کوکون منتقل شده و پس از گذشت حدود بیست روز لاروهای زالو، از کوکون خارج می گردند. در حال حاضر، به دلیل استفاده بیش از اندازه از زالوها، برداشت بی رویه و تحت تاثیر آلودگی های محیطی در زیستگاه های طبیعی، برخی از گونه های زالو در خطر انقراض قرار دارند. تکثیر و پرورش زالو، موجب حفظ بقا و جلوگیری از کاهش جمعیت زالوها می گردد. برای داشتن تکثیر و پرورش موفق، آگاهی از چگونگی عملکرد سیستم تولیدمثل زالو اهمیت دارد. در این مطالعه به عملکرد سیستم تولیدمثل زالو، اندام های نر و ماده، ناحیه کلیتوم، لقاح، کوکون گذاری و تولید لارو در زالو پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: زالو، کوکون، تولیدمثل، لقاح داخلی، ریخت شناسی

مقدمه

زالو از گذشته تاکنون در طب سنتی برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است. برخی گونه‌های زالو را می‌توان در خاک و اطراف دریاها و اقیانوس‌ها یافت، اما بیشتر زالوها در آب شیرین زندگی می‌کنند (Phillips et al., 2020). تقریباً ۷۰۰ گونه زالو در جهان شناسایی شده است که فقط ۱۵ گونه از آنها در زالدورمانی و علوم پزشکی کاربرد دارند (Kutschera and Elliott, 2014; Manav et al., 2019). در قرن نوزدهم میلادی، استفاده از زالو در پزشکی افزایش چشمگیری یافت (Ceylan, 2023). اولین بار در اوایل سال ۱۸۸۴ هایکرافت، داروشناس اتریشی دریافت که عصاره به‌دست آمده از *Hirudo medicinalis* دارای مواد ضد انعقاد خون است که این ماده هیرودین است (Mammen, 1983; Singah, 2010). در سال ۱۹۵۵، مارکوارد با موفقیت هیرودین را از غدد بزاقی *Hirudo medicinalis* جدا نمود که به طور گسترده‌ای راه‌گشای تحقیقات مهارکننده‌های ترومبین بود (Whitaker et al., 2004; Ceylan, 2023). اثبات وجود ترکیبات ضد انعقاد خون در بزاق زالو، موجب بهره‌گیری از زالو و انجام تحقیقات بیشتر بر اثرات درمانی این موجود گردید و مورد توجه شرکت‌های دارویی قرار گرفت (Kutschera, 2012; Marchiori et al., 2024). سازمان بهداشت جهانی و همکاران، (Kun et al., 2022; ۱۴۰۱). سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)، در سال ۲۰۰۴ میلادی، زالدورمانی را تایید نمود و این امر باعث رونق زالدورمانی در سراسر جهان گردید (Ceylan, 2023). فیروزبخش و سوداگر، (۱۴۰۳). در دهه‌های حاضر، کاربردهای جدید زالو و فرآورده‌های حاصل از آن، در بسیاری از زمینه‌های پزشکی مدرن از جمله: جراحی ترمیمی، بیماری‌های عروقی، میگرن و انواع بیماری‌های پوستی مورد توجه قرار گرفته است (Collier; Witwit et al., 2024). همچنین، تولید محصولات آرایشی و بهداشتی، مطالعات علوم زیستی و سم شناسی به عنوان جانور مدل، از زالو استفاده می‌گردد (Petrauskiene et al., 2011). زالوها از مهم‌ترین شاخص‌های کیفیت آب و تنوع زیستی در اکوسیستم هستند. حضور گونه‌های خاص از زالو نشان‌دهنده وجود برخی از جانوران در آن محیط است (Saglam, 2018). با وجود اهمیت این موجود ارزشمند، جمع‌آوری بیش از اندازه زالو از طبیعت، افزایش آلودگی‌های زیست محیطی، توسعه فعالیت‌های کشاورزی، گسترش شهرها،

تخریب زیستگاه‌ها و کاهش میزبانان زالو منجر به کاهش میزان تولیدمثل زالوها و در نتیجه کاهش تدریجی جمعیت آنها شده است (Chernaya et al., 2019; Firouzbakhsh and Sudagar, 2024). در نتیجه، برخی از گونه‌های زالوی پزشکی، در فهرست موجودات در معرض خطر انقراض وارد شده و تحت حفاظت کنوانسیون‌های بین‌المللی قرار گرفته‌اند (Utevsky and Trontelj, 2016; Collier et al., 2016; Ceylan, 2020). تعداد کمی از زالوها، در علوم پزشکی کاربرد دارند که معمولاً در آب شیرین برکه‌ها، دریاچه‌ها و نه‌رهای با جریان آرام آب زندگی می‌کنند (Torres-Carrera et al., 2024). این زالوها از شاخه Annelida، راسته Arhyinchobdellida و از خانواده Hirudinidae هستند (Marrone and Canale, 2019). سه گونه مهم زالوی پرورشی در ایران شامل *Hirudo medicinalis* و *Hirudo orientalis*، *verbana* هستند (Lemke and Vilcinskis, 2020; Ceylan et al., 2024). در شکل ۱ سه گونه زالوی پرورشی نشان داده شده است.



Hirudo (A: *Hirudo verbana* (B: *Hirudo Medicinalis* (C: *Hirudo orientalis* (Alaama et al., 2024)

علاوه بر عوامل زیست‌محیطی، تغذیه و بعضی از خصوصیات بیولوژیک (سن زالو)، بر عملکرد تولیدمثل زالوها تاثیرگذار هستند (Erdogan and Arslan, 2019; Ceylan, 2020).

متورم در بخش قدامی بدن زالو مشاهده می‌گردد. غدد موجود در ناحیه کلیتلوم، مواد مغذی و پروتئین‌های لازم برای تشکیل کوکون را تولید می‌نمایند (Sivachandran et al., 2015). همچنین کلیتلوم در زمان جفت‌گیری زالوها، به عنوان مکانی برای اتصال دو زالو به یکدیگر و انتقال اسپرم عمل می‌نماید (Ceylan et al., 2021). در شکل ۲، ناحیه کلیتلوم زالو و منافذ تناسلی نر و ماده در زالوی *Hirudo verbena* نشان داده شده است.

سلول‌های غدد کلیتلوم، در زمان‌های غیرتولیدمثلی، به‌سختی از سلول‌های اپیتلیال معمولی که از آنها به‌وجود آمده‌اند، قابل تشخیص هستند (Malecha and Prensier, 1974). در طول زمان تولیدمثل این غدد، به دلیل اندازه بزرگ‌تر و محتویات ترشحی، قابل تشخیص بوده (Malecha, 1979) تا حدی که کلیتلوم در سطح بدن زالو به‌راحتی قابل مشاهده است. از روش‌های معمول تشخیص بلوغ جنسی در زالوها، متمایز و مشخص بودن ناحیه کلیتلوم در بخش قدامی بدن زالو می‌باشد (Wagenaar et al., 2010). برای تشخیص زالوی باردار، مشاهده تغییر رنگ به صورت رنگ پریدگی، زرد یا نارنجی شدن واضح در ناحیه کلیتلوم زالو، مشاهده تورم و برجسته شدن خیلی اندک در ناحیه کلیتلوم است. با لمس و فشردن آرام این ناحیه در بین انگشتان دست، این تغییرات را می‌توان احساس نمود (حسینی و همکاران، ۱۳۹۹؛ Ceylan et al., 2015).

سیستم تولیدمثل زالو

زالوها به طور کلی، دارای سه مرحله: تخم، لارو و زالوی بالغ در زندگی هستند. بالغ شدن بیشتر زالوها ۱ تا ۲ سال زمان نیاز دارد. زالوها هرمافرودیت (دوجنسی) هستند و هر زالو دارای اندام جنسی نر و ماده است، اما زالوها توانایی خودباروری ندارند. آنها معمولاً با یک زالوی دیگر جفت‌گیری می‌نمایند. اندام‌های جنسی زالو از بیضه و تخمدان تشکیل شده است (Ceylan et al., 2023). به طور معمول، هر زالو دارای ۱۱ جفت بیضه است که این تعداد ثابت نیست و در گونه‌های مختلف زالو می‌تواند متفاوت باشد (Montinari and Minelli., 2022).

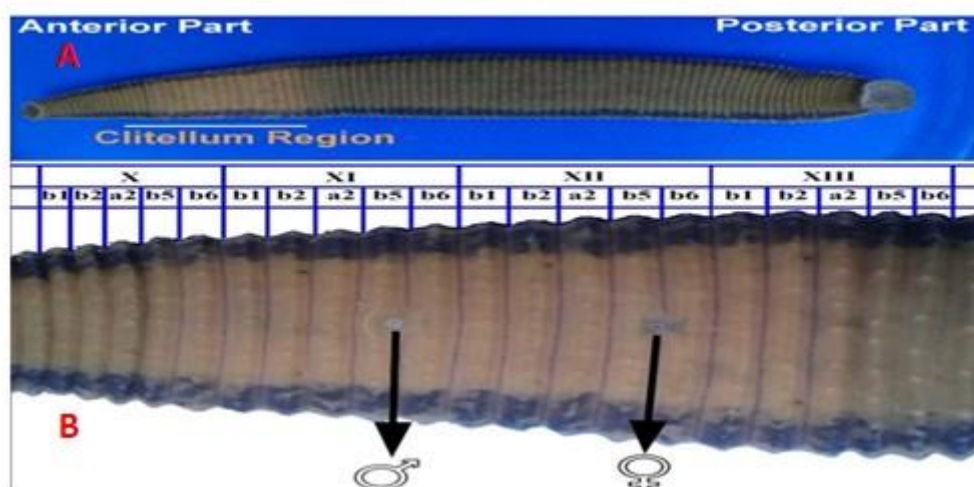
کاهش روز به روز ذخایر زالو در طبیعت، مستلزم اقداماتی برای کاهش فشار بیش از حد، در استفاده از ذخایر طبیعی این موجودات در کارهای درمانی و تحقیقات علمی است (Ceylan and Çetinkaya, 2017). همچنین، در صورتی که تکثیر و پرورش زالو، تحت شرایط کنترل شده و بهداشتی انجام گیرد، اطمینان حاصل می‌گردد که از نظر کاربردهای پزشکی، ایمن و موثر هستند (Grafkskaia et al., 2019). به دلیل افزایش تقاضای روزافزون زالو در جهان، تکثیر و پرورش زالو در محیط غیرطبیعی، رشد چشمگیری یافته است. بنابراین، آگاهی و برخورداری از دانش در مورد عملکرد سیستم تولیدمثل، اندام‌های تناسلی زالو، کوکون‌گذاری و تولید لارو زالو مورد نیاز است.

ریخت‌شناسی زالو

زالو دارای بدنی فاقد اسکلت است. بدن آنها از ۳۴ بند تشکیل شده است. در میان این بندها، حلقه‌هایی قرار دارند که تعداد آنها به ۱۰۵ حلقه در کل بدن زالو می‌رسد. مطالعات مورفولوژیک بر گونه‌های مختلف زالو نشان می‌دهد که موقعیت منافذ تناسلی نر و ماده در زالو از اهمیت بالایی برخوردار است. در فصل تولیدمثل، کلیتلوم برجسته و متورم در حلقه‌های ۴۰-۲۶ پدیدار می‌گردد (Utevsky and Trontelj, 2005). در این مطالعات مشخص شده است که منفذ نر در حلقه ۳۲ و منفذ ماده در حلقه ۳۷ واقع شده‌اند. منفذ تناسلی زالوی ماده تقریباً پنج حلقه، پایین‌تر از منفذ تناسلی نر قرار دارد. این اعداد به محققان کمک می‌کنند تا موقعیت اندام‌های تناسلی زالو را شناسایی نمایند (Kuo and Lai, 2019). کلیتلوم^۱ ناحیه‌ای برجسته و متمایز در بدن زالوهاست که در فصل تولیدمثل نقش بسیار مهمی ایفاء می‌کند (Petrauskiene et al., 2011). شروع رفتارهای تولیدمثلی زالو، تحت تاثیر عوامل متفاوتی مانند: اثرات هورمونی، سن زالو، دما و عوامل محیطی قرار دارند. ناحیه فعال در بروز رفتارهای تولیدمثلی، در ناحیه کلیتلوم زالو قرار دارد (Ceylan et al., 2015). کونوپروسین^۲ G و دو هورمون از خانواده اکسی توسین و وازوپرسین در رفتارهای تولیدمثلی زالو دارای نقش اصلی هستند (Wagenaar et al., 2010؛ حسینی و همکاران، ۱۳۹۹). این ناحیه معمولاً به صورت چند حلقه

¹ Clitellum

² Conopressin G



شکل ۲: نمای شکمی از زالو در مرحله تولیدمثل (شکل A)، منفذ نر و ماده در زالو (شکل B). خصوصیات ظاهری ناحیه کلیتلوم در زالوی *Hirudo verbena*. رنگ پریدگی و برجسته شدن ناحیه کلیتلوم در ۱۵ حلقه قابل مشاهده است (Ceylan et al., 2015).

یک جفت کیسه کروی و توخالی به نام تخمدان^۶ است که در موقعیت شکمی، نزدیک طناب عصبی قرار گرفته است. داخل تخمدان‌ها با مایع سلومیک پر شده است. در انتهای هر تخمدان، یک لوله کوتاه به نام مجرای تخم‌بر^۷ قرار دارد. این مجرا، در انتها به یک کیسه گلابی شکل به نام کیسه رحمی^۸ ختم می‌گردد. کیسه رحمی، محل ذخیره تخم‌های مترشحه از تخمدان است (حسینی و همکاران، ۱۳۹۹؛ Petrauskiene et al., 2011). در شکل ۳ قسمت‌های مختلف اندام تناسلی زالوی ماده و نر نشان داده شده است.

زالوهای رده Clitellata، همافروdit‌های پروتاندریک هستند که گامتوژن آنها تحت کنترل ترشح عصبی هورمون‌های بازدارنده و گنادوتروف از ناحیه پیشین مغز است (Malecha, 1975). فعالیت بیضه‌ها و تخمدان به صورت هم‌زمان اتفاق می‌افتد، البته اووژن نسبت به اسپرم‌زایی با اندکی تأخیر اتفاق می‌افتد (Sawyer, 2020). اسپرماتوگونیوم (اووگونیوم) به ترتیب از اپی‌تلیوم لایه زاینده کیسه بیضه و کیسه تخمدان^۹، ایجاد می‌شود.

کیسه‌های بیضه، محل تکامل اسپرماتوزوئیدها هستند، به هر کیسه بیضه، مجرای به نام مجرای آوران^۱ متصل می‌باشد که در نهایت، مجرای آوران متصل به کیسه‌های بیضه، مجرای واحدی به نام مجران و ابران^۲ را تشکیل می‌دهند (Kutschera, 2017). مجرای و ابران در بخش انتهایی دارای پیچ‌خوردگی می‌شود و اپیدیدیم^۳ را به وجود می‌آورد که محل ذخیره اسپرم است. اپیدیدیم یا کیسه اسپرمی، توده‌ای از مجاری است که در دو سمت آتریوم قرار دارد (Saglam et al., 2016). در قسمت انتهایی اپیدیدیم، مجرای قرار دارد که به آتریوم^۴ ختم می‌گردد. آتریوم از دو قسمت تشکیل شده است: یک قسمت آتریوم با اندازه بزرگ و حبابی شکل بوده و قسمت دیگر غلاف نرینگی^۵ است. اسپرم از این قسمت در زمان جفت‌گیری، وارد کیسه رحمی زالوی ماده دیگر می‌گردد. غلاف نرینگی در قسمت شکمی زالو قابل مشاهده است. آتریوم، دوکی شکل و از اپیدیدیم کوچک‌تر است. نسبت اندازه اپیدیدیم به آتریوم، در *Hirudo verbena* نسبتاً کوچک است، در زالوی *Hirudo orientalis* با اندازه متوسط و در *Hirudo medicinalis* بزرگ‌تر است (Utevsky and Trontelj, 2005). کیسه بیضه، یک و نیم برابر تخمدان و بیضوی شکل است. سیستم تولیدمثلی زالوی ماده،

¹ Vas efferens

² Vas deferens

³ Epididyme

⁴ Atrium

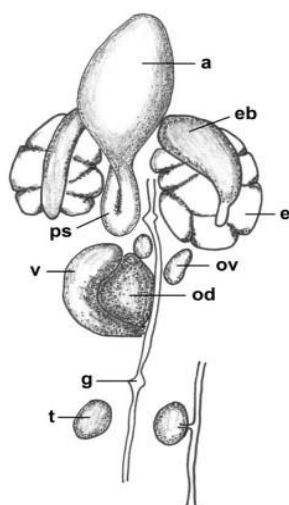
⁵ penis sac

⁶ Ovary

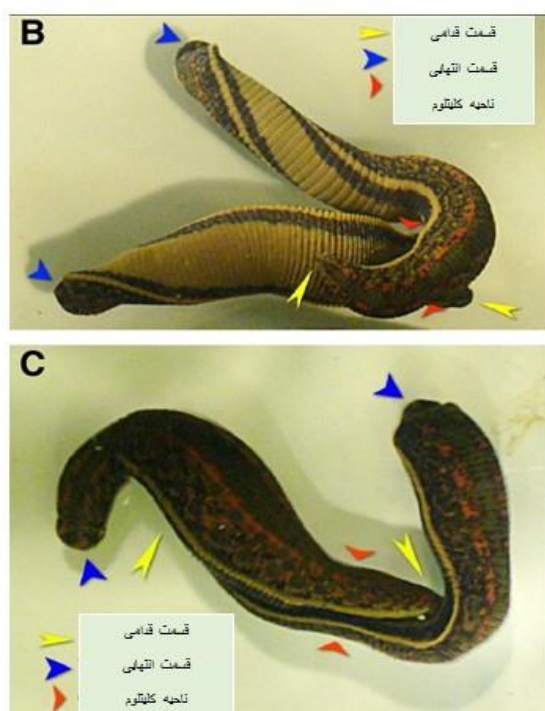
⁷ Oviduct

⁸ Vagina

⁹ Ovisac



شکل ۳: تصویر سیستم تولیدمثل زالوی *Hirudo sulukii*. a: آتریوم (سیستم تولیدمثلی نر)، eb: حباب بیرون دهنده اسپرم، ps: غلاف نرینگی، e: اپیدیدیم، g: گانگلیون (غده عصبی)، ov: تخمدان، v: کیسه رحمی، od: لوله تخم بر، t: کیسه بیضه (Saglam et al., 2016).



شکل ۴: لقاح و انتقال اسپرم در زالوی *Hirudo Verbana*. قسمت قدامی (سر زالو)، قسمت انتهایی (دم زالو) و ناحیه کلیتوم با فلش‌های زرد، آبی و قرمز نشان داده شده‌اند (Wagennar et al., 2010).

زالوها متناسب با دفعات تغذیه و کیفیت غذایی که دریافت می‌کنند، دما، شرایط محیطی و برخی عوامل دیگر، در سنین ۴-۲ سالگی به بلوغ می‌رسند و قادر به جفتگیری هستند (Ceylan et al., 2023). در شرایط پرورشی، زالوها بعد از حدود ۲۰ ماه ۵۷

مراحل اولیه گامتوزن نر و ماده از یک الگوی مشترک در زالوها پیروی می‌کند. اسپرماتوگونیوم (اووگونیوم) از اپیتلیوم لایه زاینده آزاد می‌شود و در لومن پر از مایع کیسه سلومیک تکامل و تحت یک سری تقسیمات میتوزی قرار می‌گیرد که منجر به ایجاد خوشه‌ای از گامت‌ها می‌شود که به وسیله یک توده سیتوپلاسمی به نام سیتوفور^۱ به هم متصل شده‌اند (Kuo and Lai, 2019). طی اسپرماتوزن، تمام سلول‌های متصل به سیتوفور، به اسپرم تمایز می‌یابند. در زالوها، یکی از سلول‌ها به تخمک بالغ تبدیل می‌گردد. در اسپرماتوسیت و تخمک، تقسیم میوز انجام می‌گیرد، البته، رسیدگی تخمک معمولاً در مرحله‌ای متوقف می‌گردد تا زمان تخم گذاری فرا رسد (Sawyer, 1986).

لقاح در زالوها

بیشتر زالوها در اواخر زمستان جفت گیری کرده و در فصل بهار کوکون گذاری می‌کنند. پس از آن، زالوهای تازه متولد شده از کوکون بیرون می‌آیند. بین دمای محیط و شروع تولیدمثل در زالو، ارتباط مستقیم وجود دارد. جفتگیری در زالوها از طریق لقاح داخلی صورت می‌گیرد به این صورت که تبادل اسپرم با استفاده از هدایت اسپرماتوزوا به اندام تناسلی زالوی ماده دیگر است (Kutschera, 2017). در شکل ۴ جفتگیری و انتقال اسپرم در زالوی *Hirudo verbana* نشان داده شده است.

¹ Cytophore

کیتوزنوس^۱ پوشش خارجی کوکون را ترشح می کنند و در بین ماهیچه های حلقوی قرار دارند. همچنین غدد ترشح کننده آلبومین در عمق بیشتر پوست و در میان ماهیچه های طولی واقع شده اند (حسینی و همکاران، ۱۳۹۹).

Malecha (۱۹۷۹) در زالوی *Piscicola geometra* چهار نوع غده مرتبط با تشکیل کوکون، در کلیتوم این زالو، شناسایی نمود. هر نوع غده با محتویات ترشحاتی متفاوت خود شناخته می شود. غده نوع اول، موکوپلی ساکارید^۲ تولید می کند که ترشح آن نشان دهنده مرحله اولیه تشکیل کوکون است (Malecha and Prensier 1974; Malecha, 1979). این ترشحات یک پوشش عاری از آلودگی را تولید می کنند که روی بستر قرار می گیرند و یک کیسه قابل انعطاف به وجود می آورند. در نهایت، سایر غدد، محتویات خود را در این کیسه ترشح می کنند. نوع دوم، از دو زیرمجموعه تشکیل شده است که با یکدیگر دیواره جامد و مستحکم کوکون را تشکیل می دهند. ترشحات یکی از آنها قسمت فیبریلار دیواره کوکون را ساخته و ترشحات زیرمجموعه دوم، اپرکولوم را می سازد (Sivachandran et al., 2015). نوع سوم، توده متراکم دیواره کوکون را می سازد. نوع چهارم، ذخایر آلبومینی را تولید کرده که جنین زالو از آن تغذیه می کنند. همچنین در مطالعات نوع پنجم غدد یافت شد که به نظر نمی رسد که این غدد ترشحاتی واقع در ناحیه کلیتوم زالو، در تشکیل کوکون نقش داشته باشند. نقش ترشح آنها، به عنوان یک فرمون، برای جذب جنسی مطرح شده است (Malecha, 1979). در بافت شناسی این غدد در زالوهای مختلف، با تفاوت جزئی قابل مشاهده است (Montinari and Minelli, 2022).

کوکون گذاری در زالو

وزن کوکون و وزن آلبومین داخل کوکون، ارتباط مستقیم با وزن زالوی مولد دارد. با گذاشتن هر کوکون بیش از ۲۰ درصد از وزن زالوی مولد کاهش می یابد که بخش اصلی این کاهش وزن مربوط به حجم آلبومین موجود در کوکون است (Ceylan et al., 2015؛ حسینی و همکاران، ۱۳۹۹).

در شکل ۵ مراحل تولید تا رهاسازی کوکون از کلیتوم زالو نشان داده شده است. زالوی بزرگ تر، کوکون های بزرگ تر تولید کرده و آلبومین بیشتری را وارد کوکون می کند. در زالوی آماده تکثیر، فرآیند تولید کوکون، با ترشح یک لایه مخاطی از ناحیه کلیتوم آغاز می گردد (Kutschera, 2017).

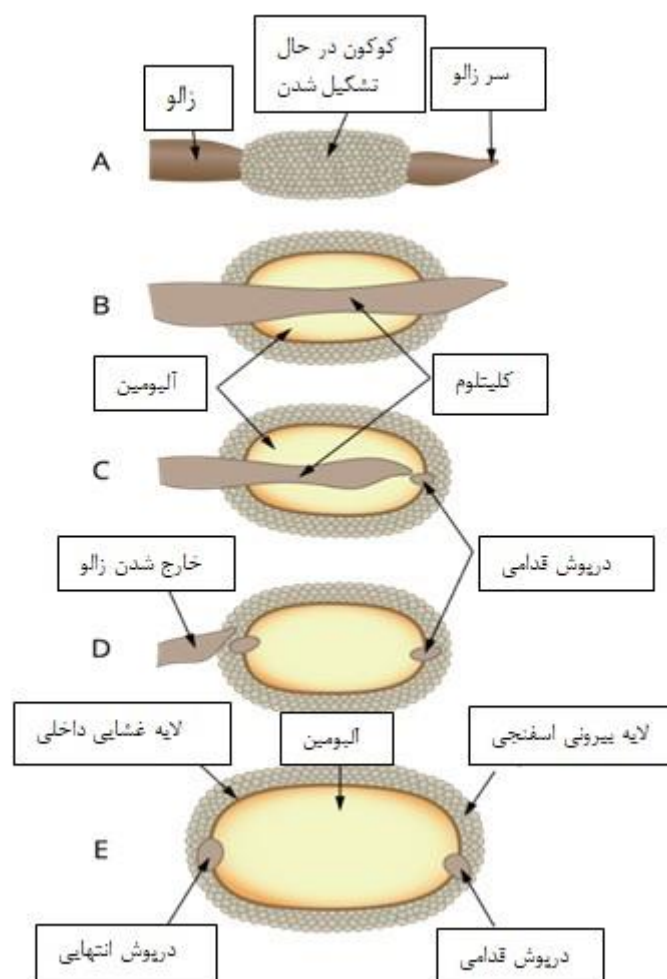
آماده جفتگیری می گردند. با توجه به این که زالوها می توانند اسپرم را در تخمدان ذخیره نمایند، فاصله زمانی بین جفتگیری و تخم گذاری از یک لغایت نه ماه می تواند متغیر باشد (Elliott and Kutschera, 2011). پس از آزاد شدن اسپرم در بدن زالوی ماده، تخمک ها بارور می گردند. هنگامی که تخم ها تولید شدند، در کوکون ها رها می گردند. کوکون ها ممکن است نازک یا ضخیم بوده و می توانند ظاهری متفاوت از یکدیگر داشته باشند (Ceylan et al., 2019). کوکون ها برای حمایت و حفاظت از تخم ها و لاروهای تازه از تخم درآمده مناسب هستند. تخم های زالو در برابر خشکی آسیب پذیر بوده، بنابراین به محیط مرطوب نیازمندند (Uğural and Serezli, 2020). در این زمینه غشاء و ساختارهای محافظ کوکون زالو از اهمیت بسیاری برخوردار است. کوکون مانع از دهیدراسیون تخم ها می گردد (Kutschera, 2017). بیشتر زالوها بعد از کوکون گذاری، آنها را ترک می کنند اما قبل از آن یک مایع مغذی به نام آلبومین، داخل کوکون ها قرار می دهند که تخم ها و لارو زالوها می توانند از آن تغذیه نمایند (Ceylan et al., 2023). کوکون، محیط مناسب برای رشد جنین زالو را فراهم کرده و از خشک شدن یا دهیدراسیون، شکار و تهاجم میکروبی جلوگیری می کند (Phillips et al., 2020).

غدد تولیدکننده کوکون

لایه بیرونی بدن زالو از سلول های اپیدرمی پوشیده شده است که به طور مداوم جایگزین می شوند و پدیده پوست اندازی را ایجاد می کنند. این سلول ها با آرایش منظم و فشرده، یک پوشش محافظتی ایجاد می کنند (Lizarraga et al., 2024). سلول های اپیدرم میله ای شکل هستند که در قسمت بیرون سطح بدن پهن شده و به شکل پنج ضلعی درآمده اند و در کنار یکدیگر قرار دارند. پایانه های داخلی این سلول ها میله ای هستند. بین این سلول ها، فضاهای خالی وجود دارد که شبکه مویرگی خون، انتهای اعصاب، فیبرهای پوستی و سلول های رنگ دانه ای قرار می گیرند. غدد تک سلولی مختلفی از اپیدرم منشأ می گیرند که از آن جمله غدد موکوسی گلابی شکل و غدد لوله ای شکل هستند (Montinari and Minelli., 2022؛ حسینی و همکاران، ۱۳۹۹). در ناحیه کلیتوم زالو، همراه غدد موکوسی مذکور، دو نوع غده دیگر، در ارتباط با تشکیل کوکون وجود دارد. غدد

¹ Chitogenous

² Acid mucopolysaccharide

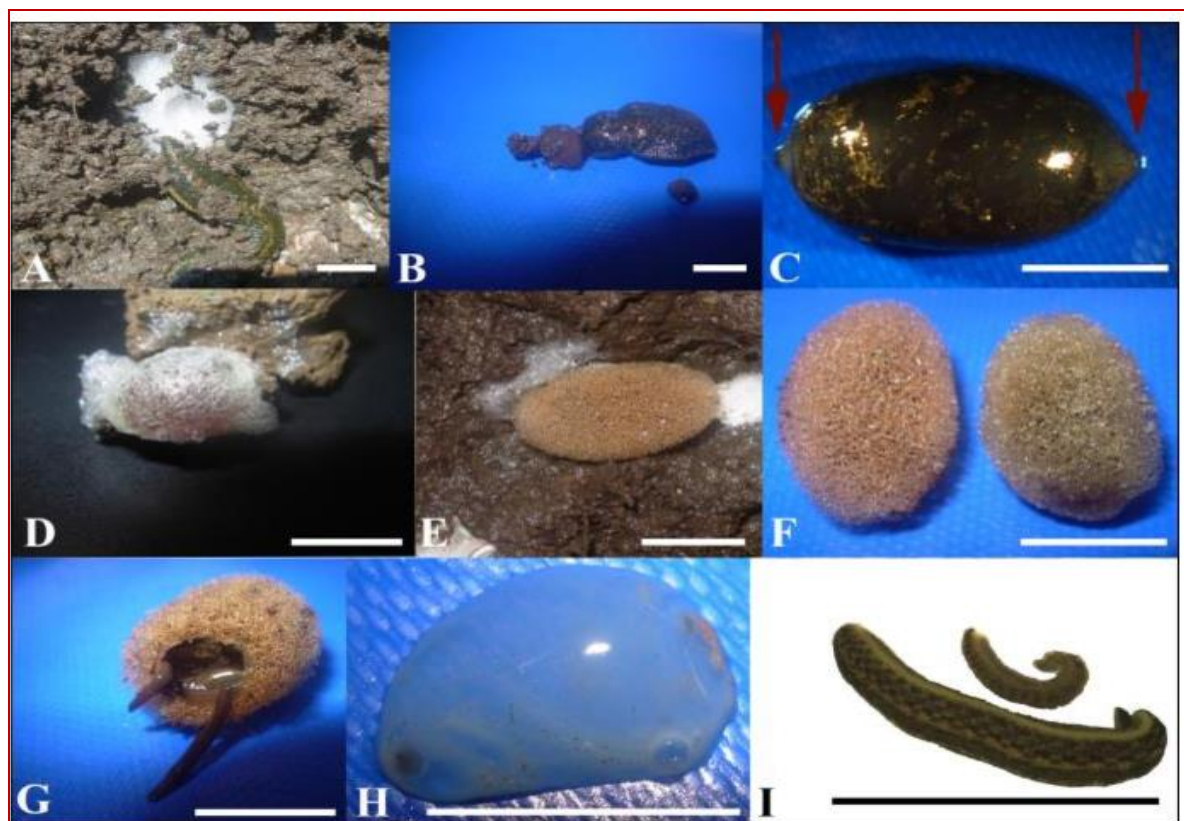


شکل ۵: مراحل تشکیل کوکون در ناحیه کلیتلوم زالو. A و B: تشکیل کمر بند کف آلود در ناحیه کلیتلوم زالو. C: تشکیل درپوش قدامی. D: تشکیل درپوش خلفی. E: تولید نهایی کوکون و رهاسازی آن

روز، اپرکولوم^۱ شروع به باز شدن می کند (حسینی و همکاران، ۱۳۹۹). هر زالو می تواند از ۱۰-۱ کوکون تولید نماید. در هر کوکون ۱-۲۵ تخم می تواند وجود داشته باشد (Kutschera and Elliott, 2014). یک کوکون به خوبی شکل گرفته، دارای ساختار شبکه ای به رنگ زرد روشن است که طول آن حدود ۳۰-۲۵ میلی متر و قطر آن حدود ۱۵-۱۲ میلی متر است. وزن نوزاد زالو با افزایش تعداد آنها در هر کوکون کم می گردد. پس از بیرون آمدن لارو زالوها از کوکون ها، لاروها دارای توانایی مراقبت از خود هستند (Lizarraga et al., 2024). در شکل ۶ از مرحله لقاح زالوی *Hirudo verbena* تا خروج لارو از کوکون نشان داده شده است.

یک شبکه فیبری و پروتئینی تولید شده و کوکون اطراف ناحیه کلیتلوم را احاطه می کند (Sivachandran et al., 2015). این مایع سفید کف مانند، در نهایت سفت شده و تبدیل به یک پوشش اسفنجی در اطراف کوکون می گردد. بعد از رها شدن تخم های زالو از منفذ زالوی ماده، کوکون و محتویات داخل آن از قسمت قدامی زالو عبور می کند و در نهایت در دو انتها با ماده چسب مانند تولیدی از ناحیه کلیتلوم به نام اپرکولوم چسبانده می شوند (Uğural and Serezli, 2020). در مدت زمان یک تا دو روز رنگ کوکون از سفید به کرم تغییر می یابد. کوکون در سه الی چهار روز ابتدایی انعطاف پذیر است (Lizarraga et al., 2024). به تدریج منافذ هوا درون کوکون براساس رشد جنین و مصرف آلبومین ایجاد می گردد و تقریباً پس از حدود ۳۰-۲۰

¹ Operculum



شکل ۶: مراحل کوکون گذاری زالوی *Hirudo verbena*. A و B: مرحله اولیه ترشح کوکون در ناحیه کلیتوم. C: کوکون تازه تولیدی (فلش ها نشان دهنده اوپر کولوم هستند). D: کف های سفید در اطراف کوکون وجود دارد، کوکون کمی سخت می گردد. E: کوکون تازه تولید شده با باقیمانده کف ها در اطراف. F: کوکون تولیدی. G: بیرون آمدن لارو زالو از کوکون. H: آلبومین داخل کوکون. I: لاروهای خارج شده از کوکون (Ceylan et al., 2015)

منابع

نتیجه گیری

Alaama, M., Kucuk, O., Bilir, B., Merzouk, A., Ghawi, A. M., Yerer, M.B. and Helaluddin, A.B.M., 2024. Development of Leech extract as a therapeutic agent: A chronological review. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 10, 100355. DOI:10.1016/j.prmcm.2023.100355.

Bidmal H, Shakouri M, and Sudagar M. (2022). Effect of camel and frog blood on sexual maturity, survival and production rate of cocoon and larvae in eastern leeches. (*Hirudo orientalis*) Journal: Aquaculture Development (Life Sciences). Period 16. Number one. 42-33.

از زالو در علوم پزشکی برای پیشگیری و درمان بیماری ها، در مطالعات نوروفیزیولوژیک و ژنتیک تکاملی به عنوان یکی از بهترین موجودات آزمایشگاهی، برای مطالعات سم شناسی، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و بافت شناسی استفاده می گردد. به علت جمع آوری بیش از حد زالوی طبی از طبیعت، توسعه فعالیت های کشاورزی، از بین رفتن زیستگاه های طبیعی زالوها و استفاده از سموم شیمیایی، خطر انقراض بسیاری از زالوها به ویژه زالوهای طبی در طبیعت افزایش یافته است. تکثیر و پرورش مصنوعی زالو یکی از روش های حفظ بقاء زالوها و جلوگیری از کاهش جمعیت آنهاست. بنابراین، نیاز به تکثیر و پرورش زالو به کمک متخصصان در محیط غیرطبیعی وجود دارد. این امر نیازمند داشتن اطلاعات در مورد چگونگی تکثیر و پرورش، اندام های تولید مثل و کوکون گذاری در زالو هست.

- Ceylan, M. and Çetinkaya, O., 2017.** Investigation on the Collection and Economy of Medicinal Leeches from Wetlands Around Lake Eğirdir, Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 41(2), 96-101. DOI:org/10.5152/tpd.2017.5150.
- Ceylan, M., 2020.** Effects of maternal age on reproductive performance of the southern medicinal leech, *Hirudo verbena* Carena, 1820. *Animal reproduction science*, 218, 106507. DOI:org/10.1016/j.anireprosci.2020.106507.
- Ceylan, M., 2023.** Hirudinea Fauna of Lake Karagöl (Sındırgı-Balıkesir) and Lake Gölcük (Bigadiç-Balıkesir): A New Record for Türkiye. *Acta Aquatica Turcica*, 19(3), 209-217. DOI:org/10.22392/actaquatr.1068061.
- Ceylan, M., Çetinkaya, O., Küçükkara, R. and Akçimen, U., 2015.** Reproduction efficiency of the medicinal leech *Hirudo verbena* Carena, 1820. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15(3), 411-418. DOI:10.4194/1303-2712-v15_2_27.
- Ceylan, M., Küçükkara, R. and Akçimen, U., 2019.** Effects of broodstock density on reproduction efficiency and survival of southern medicinal leech, *Hirudo verbena* Carena, 1820. *Aquaculture*, 498, 279-284. DOI:org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.016.
- Ceylan, M., Küçükkara, R. and Karataş, E., 2023.** Effects of cocoon incubation angle on hatching success of medicinal leeches (*Hirudo* spp.). *Invertebrate Reproduction and Development*, 67(3-4), 121-128. DOI:org/10.1080/07924259.2023.2241418.
- Ceylan, M., Küçükkara, R., Erbatur, İ., Karataş, E., Tunç, M. and Sağlam, N., 2021.** Growth, survival, and reproduction of the Turkish medicinal leech, *Hirudo sulukii*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 65(1), 57-68. DOI:org/10.1080/07924259.2021.1885506.
- Ceylan, M., Özdoğan, H.B.E. and Tunay, M., 2024.** Effects of light on reproduction of the Mediterranean medicinal leech, *Hirudo verbena* Carena, 1820: do circadian rhythm disruptions positively affect reproductive performance of leeches? *Invertebrate Reproduction & Development*, 1-6. DOI:org/10.1080/07924259.2024.2375069.
- Chernay, L.V., Kovalchuk, L.A. and Mikshevich, N.V., 2019.** Geographical variability of heavy metal concentrations in tissues of medical leeches (*Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbena*) and bottom deposit. *Nature Conservation Research*, 4(3):67-77. DOI:org/10.24189/ncr.2019.051.
- Collier, K. J., Probert, P. K., and Jeffries, M. (2016).** Conservation of aquatic invertebrates: concerns, challenges, and conundrums. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26 (5), 817-837. DOI:org/10.1002/aqc.2710.
- Elliott, J.M. and Kutschera, U., 2011.** Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation. *Freshwater Reviews*, 4(1), 21-41. DOI:org/10.1608/FRJ-4.1.417.
- Erdogan, M., and Arslan, T., 2019.** Effects of vitamin E on growth and reproductive performance of pindani (*Pseudotropheus soclofi* Johnson, 1974). *Aquaculture*, 509, 59-66. DOI:org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.019.
- Firouzbakhsh, S. and Sudagar, M., 2024.** A review of the importance of leeches and the enzymes derived from their saliva. *Journal of Aquaculture and Exploitation*. (in print).

- Firouzbakhsh, S. and Sudagar, M., 2024.** Factors affecting cannibalism in leeches. In "1" international conference of innovative aquaculture. ICIA 2024- 50. Gorgan. Iran.
- Grafskaia, E.N., Nadezhdin, K.D., Talyzina, I.A., Polina, N.F., Podgorny, O.V., Pavlova, E.R. and Lazarev, V.N., 2019.** Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 180, 143-153. DOI:org/10.1016/j.ejmech.2019.06.080
- Hosseini, J. Safavipour, S., S., Seyedinia, A. and Beigi, A., 2020.** Scientific Foundations of Leech Therapy and Leech Breeding. Tehran, Iranian Medicine.
- Kun, W., Jieqin, M., Liangke, C., Fujuan, S., Chaojie, Y., Mijiti, M. and Yaojun, Y., 2022.** Comparative de novo transcriptomics reveals the effect of lead on Leech in aquaculture environments. *Aquaculture Reports*, 23, 101019. DOI:org/10.1016/j.aqrep.2022.101019.
- Kuo, D.H. and Lai, Y.T., 2019.** On the origin of leeches by the evolution of development. *Development, Growth and Differentiation*, 61(1), 43-57. DOI:org/10.1111/dgd.12573.
- Kutschera, U. and Elliott, J., 2014.** The European medicinal leech *Hirudo medicinalis* L.: Morphology and occurrence of an endangered species. *Zoosystematics and Evolution*, 90(2), 271-280. DOI:10.3897/zse.90.8715.
- Kutschera, U., 2012.** The *Hirudo medicinalis* species complex. *Naturwissenschaften*, 99, 433-434. DOI:10.1007/s00114-012-0906-4.
- Kutschera, U., 2017.** Sex-gender-conflicts in aquatic hermaphrodites: Are genes immortal J. *Marine Science. Research of Development*, 7, 1-4. DOI:10.4172/2155-9910.1000225.
- Lemke, S. and Vilcinskas, A., 2020.** European medicinal leeches—new roles in modern . Medicine. *Biomedicines*, 8(5),99. DOI:org/10.3390/biomedicines8050099.
- Lizarraga, A., Appy, R. and Goffredi, S.K., 2024.** Life cycle and development of the marine leech *Branchellion lobata* (Hirudinea: Piscicolidae), from round stingrays, *Urobatis halleri*, from southern California. *Scientific Reports*, 14(1), 18108. DOI:org/10.1038/s41598-024-69078-z.
- Malecha, J. and Prensier, G., 1974.** Clitellar Glands of *Piscicola-Geometral* structure and annual Cycle. *Bulletin De La societe zoologique De France evolution Et Zoologie*, 99(3), 433.
- Malecha, J., 1975.** Etude ultrastructurale de la spermiogenèse de *Piscicola geometra* L. (Hirudinee Rhynchobdelle). *Journal of Ultrastructure Research*, 51(2), 188-203.
- Malecha, J., 1979.** Evidence of a central nervous system action on water exchanges in the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*.
- Mammen, E., 1983.** Fibrinogen abnormalities. *Semin. Thrombosis and Hemostasis*, 9, 1-9. DOI:10.1055/s-2007-1004999.
- Manav, M., Ceylan, M. and Büyükçapar, 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. DOI:org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.004.
- Marchiori, C.H., de Oliveira Santana, M.V. and de Paula Malheiros, K., 2024.** Leeches and Their Use in Medicine (Anellida: Hirudinea: Rhynchobdelliformes). DOI:10.36348/merjbs.2024.v04i03.003. DOI:10.36348/merjbs.2024.v04i03.003.

- Marrone, F. and Canale, D.E., 2019.** Occurrence, distribution, and bibliography of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea, Hirudinidae) in Sicily (Italy). *Biogeographia—The Journal of Integrative Biogeography*, 34. DOI:org/10.21426/B634143807.
- Montinari, M.R. and Minelli, S., 2022.** From ancient leech to direct thrombin inhibitors and beyond New from old. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 149, 112878. DOI:org/10.1016/j.biopha.2022.112878.
- Petrauskiene, L., Utevska O. and Utevsky, S., 2011.** Reproductive biology and ecological strategies of three species of medicinal leeches (genus *Hirudo*). *Journal of Natural History*, 45(11-12):737–747. DOI:org/10.1080/00222933.2010.535918.
- Phillips, A.J., Govedich, F.R. and Moser, W.E., 2020.** Leeches in the extreme: Morphological, physiological, and behavioral adaptations to inhospitable habitats. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 12, 318–325. DOI:org/10.1016/j.ijppaw.2020.09.003.
- Saglam, N., 2018.** The effects of environmental factors on leeches. *Advances in Agriculture and Environmental*. 1(1), 00001. DOI:10.30881/aaeoa.00001.
- Saglam, N., Saunders, R., Lang, S.A. and Shain, D.H., 2016.** A new species of *Hirudo* (Annelida: Hirudinidae): historical biogeography of *Eurasian medicinal*. DOI:10.1186/s40850-016-0002-x.
- Sawyer, R.T., 1986.** *Leech Biology and Behavior*. Oxford University. Vol. 1. 192P.
- Sawyer, R.T., 2020.** Reproduction without cross-fertilization in the invasive Asian leech *Barbronia weberi* (Blanchard, 1897). (Hirudinea: Arhynchobdellida). *Aquatic Invasions*, 15(2), 271–281.
- Singh, A.P., 2010.** Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complementary therapies in Clinical Practice*, 16(4), 213–215. DOI:org/10.1016/j.ctcp.2009.11.005.
- Sivachandran, P., Heera, R., Lalitha, P., Ravichandran, M., Sivadasan, S. and Marimuthu, K., 2015.** An overview of leech and its therapeutic applications. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(5), 405–413. DOI:10.12980/JCLM.3.201514J96.
- Sudagar, M., and Kalateh Jari, P. (2018).** A Review of the Optimal Conditions for Propagation and Breeding of Medical Leeches (. *Hirudo* spp). *Caspian Sea Journal of Aquaculture*, 3(Summer 2018), 45–54.
- Torres-Carrera, G., Velázquez-Urrieta, Y. and Santacruz, A., 2024.** Not that many leech species after all: *Myzobdella lugubris* and *Myzobdella patzcuarensis* (Annelida: Hirudinida) are the same species. *Systematic Parasitology*, 101(3), 38. DOI:org/10.1007/s11230-024-10160-5.
- Uğural, B. and Serezli, R., 2020.** Effects of various environments on a number of cocoons and offspring in the breeding of southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(3), 207–211. DOI:10.12714/egejfas.37.3.01.
- Utevsky, S.Y. and Trontelj, P., 2005.** A new species of the medicinal leech (Oligochaeta, Hirudinida, *Hirudo*) from Transcaucasia and an identification key for the genus *Hirudo*. *Parasitology Research*, 98, 61–66. DOI:org/10.1007/s00436-005-0017-7.

- Utevsky, S. and Trontelj, P., 2016.** Phylogeography of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana*: a response to Živić (2015). *Aquatic Ecology*, 50, 97-100. DOI:org/10.1007/s10452-015-9553-0.
- Wagenaar, D.A., Hamilton, M.S., Huang, T., Kristan, W.B. and French, K.A., 2010.** A hormone-activated central pattern generator for courtship. *Current Biology*, 20(6), 487-495. DOI:10.1016/j.cub.2010.02.027.
- Whitaker, I.S., Rao, J., Izadi, D. and Butler, P.E., 2004.** Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42(2), 133-137. DOI:org/10.1016/S0266-4356(03)00242-0.
- Witwit, L.J., Ali, L.O. and Abbas, A.M., 2024.** A Critical Review of *Hirudo Medicinalis* and Historical Aspects of Leech Therapy. *Medical Journal of Ahl al-Bayt University*, 3(1), 154-170.

A review of reproduction and cocooning in leech

Firouzbakhsh S.^{1*}; Sudagar M.¹

*Sepide.firouzbakhsh_s02@gau.ac.ir

1- Aquaculture Department, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

Abstract

In recent decades, due to the importance of using leeches in medical sciences and the treatment of many diseases, these creatures have been receiving a lot of attention. Leeches are hermaphrodites, but they do not have the ability to self-fertilize. Morphological studies on different leech species show that the position of male and female genital pores is of great importance. These pores are located in the leech's clitellum region. The clitellum region is responsible for reproductive behavior in leeches. This area is usually in the form of several swollen rings in the anterior part of the leech's body, which can be seen during reproduction. Mating in leeches is through internal fertilization and the exchange of sperm into the reproductive organs of another female leech. The glands in the clitellum region produce nutrients and proteins necessary for the formation of the cocoon. The leech eggs are transferred into the cocoon from the pore of the female leech, and after about twenty days, the leech larvae come out of the cocoon. Currently, some leech species are in danger of extinction due to excessive use of leeches and indiscriminate harvesting, as well as due to environmental pollution in natural habitats. Reproduction and cultivation of leech help to maintain survival and prevent a decrease in the leech population. In order to have successful reproduction and breeding, it is important to know how the leech reproductive system works. This study discusses the function of the leech reproductive system, male and female organs, clitellum region, fertilization, cocooning, and larval production in leeches.

Keywords: The leech, Cocoon, Reproduction, internal fertilization, morphology.