E-ISSN: 2538-2187 | P-ISSN: 2251-7901

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology

https://jab.alzahra.ac.ir/

Vol. 36, No. 3 (2023), 30-39.

Paper Type: Original Article

# Effect of Blood of Different Vertebrates on Reproductive Parameters of *Hirudo orientalis*

**Dariush Bozorgi[1], Hossein Rahmani[1,*], Sohrab KohestanEskandari[1], Khosrow Jani Khalili[1]**

[1] *MSc Student, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran; dariushbozorgi61@gmail.com.*

[1]*Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran; (**Corresponding author:** shemaya1975@yahoo.com).*

[1] *Instructor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran; s.e.kohestan@gmail.com.*

[1]*PhD, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran; janikhalili1@yahoo.com.*

***Citation:***

Bozorgi, D., Rahmani, H., KohestanEskandari, S., & Jani Khalili, Kh. (2023). Effect of blood of different vertebrates on reproductive parameters of Hirudo orientalis. *The quarterly scientific journal of applied biology, 36* (3), 30-39.

Received: 15/10/2022 Accepted: 17/09/2023

## Abstract

**Introduction:** Among freshwater invertebrates, leeches are one of the main groups of the world's most widely distributed water resource communities, found in almost all types of freshwater habitats. This study aimed to investigate the effect of different blood treatments (Horse, cow, sheep, and chicken) on the reproduction parameters of Caspian leeches, and it was done with three repetitions in 2019.

**Methods:** In each replication, 10 progenitors were bred over 5 months once fed with blood treatments. At the end of the period, the number of cocoons and larvae were counted, and the cocoons' length, weight and diameter characteristics were measured.

**Results:** The results showed that in the growth parameters, including the final weight of the generators, the percentage of body weight gain and the specific growth coefficient in chicken (3.06, 461.5, 0.086) and horse (5.22, 857.2, 0.113) treatments were the lowest and highest, respectively ($p<0.05$). The results of the parameters of reproduction, including weight, diameter and length of cocoons in different treatments, showed that in chicken (0.205, 0.6, 0.6) and horse (0.785, 1.16, 1.5) treatments were the lowest and highest values, respectively ($p<0.05$). The amount of protein that can be absorbed has also been shown to be almost standard in cow and horse blood.

**Conclusion:** Based on the results of this experiment and according to the studied parameters, horse and cow blood had the best performance and sheep and chicken treatments are not suitable for the reproduction of Caspian leeches.

**Keywords:** Growth, Reproduction, Cocoon opening, Blood sources.

Corresponding Author: shemaya1975@yahoo.com

https://doi.org/10.22051/JAB.2023.41713.1512

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۶، شماره (۳)، (۱۴۰۲)، ۳۹-۳۰
https://jab.alzahra.ac.ir

نوع مقاله: پژوهشی

# تاثیر خون مهره‌داران مختلف روی پارامترهای تولیدمثلی زالوی شرقی *Hirudo orientalis*

داریوش بزرگی[۱]، حسین رحمانی[۱*]، کوهستان اسکندری[۱]، خسرو جانی‌خلیلی[۱]
[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
[۱]دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
[۱]مربی، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
[۱] دکترا، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
**نویسنده مسئول: *shemaya1975@yahoo.com***

دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۳ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶

## چکیده

**مقدمه:** در بین بی‌مهرگان آب شیرین، زالوها یکی از گروه‌های اصلی موجودات زنده منابع آبی با توزیع جهانی است که تقریبا در همه نوع زیستگاه‌های آب شیرین یافت می‌شوند. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر گروه‌های آزمایشی خونی شامل اسب، گاو، گوسفند و مرغ روی پارامترهای تولید مثلی زالوی شرقی با سه تکرار در سال ۱۳۹۸ صورت گرفته است.

**روش‌ها:** در هر تکرار تعداد ۱۰ پیش مولد در یک دوره ۵ ماهه پرورش داده شد و در طی این مدت یک‌بار تغذیه شدند. در پایان دوره، تعداد پیله‌ها و لاروهای خارج شده شمارش شده و خصوصیات طول، وزن و قطر پیله‌ها اندازه‌گیری شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که در پارامترهای رشد کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار وزن نهایی مولدین پس از تغذیه، درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه به ترتیب در گروه آزمایشی خون مرغ (۳/۰۶، ۴۶۱/۵، ۰/۰۸۶) و خون اسب (۵/۲۲، ۸۵۷/۲، ۰/۱۱۳) بوده است ($p<0.05$). بررسی پارامترهای تولیدمثلی نشان داده که کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار وزن، قطر و طول پیله‌ها به ترتیب در گروه آزمایشی خون مرغ (۰/۲۰۵، ۰/۶ و ۰/۶) و خون اسب (۰/۷۸۵، ۱/۱۶ و ۱/۵) بوده است ($p<0.05$). بررسی میزان پروتئین کل در خون گاو و اسب نیز نشان داده که تقریبا در محدوده مقدار استاندارد قرار دارد.

**نتیجه‌گیری:** براساس نتیجه این آزمایش و با توجه به پارامترهای مورد بررسی، خون اسب و گاو دارای بهترین عملکرد تولید مثلی بوده و خون گوسفند و مرغ به دلیل عدم تولد نوزاد از پیله‌های تولید شده، منابع غذایی مناسبی برای تکثیر و پرورش زالوی شرقی نمی‌باشند.

**کلیدواژه‌ها:** پارامترهای رشد، تفریخ پیله، منابع خونی.

## ۱- مقدمه

زالوها از شاخه *Annelida* و رده *Clitellata* هستند که به طور گسترده در سراسر جهان در زیستگاه‌های مختلف مانند آب‌های شیرین، دریاها و مناطق بیابانی یافت می‌شوند [1]. در اکوسیستم‌های آبی، گونه‌های مختلف زالو می‌توانند به عنوان شکارچی، انگل گونه‌های آبزی دیگر و حتی به عنوان منبع غذایی سایر جانوران آبزی نقش داشته باشند [2]. در سال‌های اخیر جمعیت برخی از زالوها به خصوص در اروپا و آسیا به دلیل بهره‌برداری بیش از حد برای طعمه ماهی‌ها، یا اهداف پزشکی [3] و یا به دلیل آلودگی شدید زیستگاه‌های آبی [4] به‌طور چشمگیری کاهش یافته است. امروزه، محصولات زیادی با اهداف پزشکی و دارویی از برخی گونه‌های جنس *Hirudo spp.* در دنیا استحصال می‌شود و به همین منظور برای استفاده

بالینی و طب سنتی، مطالعات علمی در زمینه تکثیر و پرورش این گونه‌ها در بسیاری از کشورها در حال افزایش است [1]. به‌طور کلی، از زالوها به‌عنوان یک گونه مدل و شاخص در مطالعات سم‌شناسی، فیزیولوژی، زیست‌شناسی عصبی[1]، بیوشیمیایی، بافت‌شناسی و بسیاری از مطالعات دیگر در سطح گسترده‌ای استفاده می‌شوند [5].

خون‌خواری در زالوهایی مثل زالوی شرقی که از خون موجودات زنده مهره‌دار و همولنف بی‌مهرگان تغذیه می‌کنند به صورت پیوسته نیست، ولی در هر بار تغذیه مقدار زیادی خون مصرف می‌کنند [6]. هضم خون طی چندین هفته و به طور عمده در روده انجام می‌شود. گلبول‌های خونی بلع شده در چینه‌دان ذخیره شده و علی‌رغم توانایی باکتری‌ها در همولیز کردن آن‌ها، برای مدت طولانی تا ۶ ماه دست نخورده باقی می‌مانند [7]. در دستگاه گوارش تمامی زالوهای طبی مانند *Hirudo orientalis*، *Hirudo medicinalis*، *Hirudo verbena* باکتری‌های *Aeromonas* و *Bacteroidetes* جمعیت غالب را تشکیل می‌دهند که ارتباط تنگاتنگی با گونه‌های مختلف زالو دارند. این باکتری‌ها بخصوص باکتری‌های *Aeromonas* می‌توانند به راحتی در طیف وسیعی از محیط‌ها شامل دستگاه گوارش برخی ماهیان یا حتی در برخی محیط‌های آبی به صورت آزاد زندگی کنند. زمان ورود این باکتری‌ها به بدن زالو، زمان پیله‌گذاری می‌باشد [8]. بررسی‌ها نشان داده که ارتباط بین زالو و باکتری‌های هم‌زیست فراتر از رابطه هم‌زیستی بوده و برقراری تعادل بین آن‌ها، کنترل‌کننده بسیاری از فعالیت‌های آن‌ها است.

زالو توانایی بسیار زیادی در تولید بزاق دارد، به‌طوری‌که، در زمان تغذیه، وقتی به میزبان می‌چسبد بزاق مترشحه از زیر بدن زالو سرازیر می‌شود. بزاق حاوی یک ماده ضد انعقاد به نام هیرودین[2] است که توانایی زیادی در جلوگیری از انعقاد خون دارد. چند قطره بزاق زالو قادر است مقدار زیادی خون را به صورت مایع نگه دارد و مانع انعقاد آن شود [9].

خون منبع غنی از پروتئین به ویژه آلبومین است و کاتابولیسم خون تغلیظ شده در چینه‌دان زالو بوسیله باکتری‌های هم‌زیست انجام شده و پروتئین موجود در خون، اصلی‌ترین ماده غذایی این باکتری‌ها می‌باشد. علاوه بر آن، همولیز شدن سلول‌های خونی موجب فراهم شدن مقادیر قابل توجهی از منابع لیپیدی در دستگاه گوارش زالو خواهد شد. باکتری *A. veronii*، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر از قبیل استات و ترکیبات حاصل از بتااکسیداسیون اسیدهای چرب را مصرف و جمعیت غالب می‌شود [10]. با وجود سرشار بودن خون از مواد غذایی پرانرژی، اما از لحاظ ویتامین‌های گروه B فقیر است ولی باکتری‌ها قادرند این ویتامین‌ها را تولید و در اختیار زالو قرار دهند [11].

علی‌رغم پیشینه تاریخی و جایگاه ویژه زالودرمانی در طب سنتی ایران، تکثیر و پرورش زالو به عنوان یک صنعت نوظهور شناخته شده و با ورود علاقمندان زیاد به این صنعت، هم‌چنان مشکلات عدیدی در بخش‌های مختلف آن مشاهده می‌شود. منشاء این مشکلات، ضعف دانش پایه به دلیل نوپدید بودن این صنعت و اتکا تولیدکنندگان به دستاوردهای تجربی بوده است. با وجود اهمیت این دستاوردها و حیاتی بودن آن در شکل‌گیری صنعت زالو در کشور، ارائه آمارهای متفاوت و از طرفی حصول نتایج متناقض در بخش‌های مختلف تکثیر، پرورش، بهداشت و بیماری و مدیریت به دلیل فقدان پشتیبانی علمی و تحقیقاتی موجب سردرگمی و گمراهی تولیدکنندگان شده است [3]، [4]، [12–19]. تاکنون ۲۲ گونه متعلق به ۱۴ جنس و ۶ خانواده از زالوها در ایران شناسایی شده است [20]. در ایران، اطلاعات کمی از گونه زالوی شرقی *H. orientalis* که پراکنش نسبتا وسیعی در استان‌های شمالی دارد، وجود دارد، اما به‌دلیل تقاضای بالا برای مصارف دارویی، از محیط‌های طبیعی به میزان زیاد جمع‌آوری می‌شود که ممکن است جمعیت این گونه را در معرض خطر قرار دهد. اگر چه تاکنون منبع موثقی ادعای فوق را تایید نکرده است، اما شواهد عینی نشان از کاهش آن‌ها در اکوسیستم‌های آبی می‌دهد که استفاده بیش از حد سموم کشاورزی نیز در این امر دخیل است. لذا پرورش این گونه می‌تواند راه‌حل مناسبی برای جلوگیری از کاهش اندازه جمعیت‌های طبیعی یا خطر انقراض آن‌ها باشد [4]. با توجه به این نکته که یکی از عوامل تاثیرگذار بر رشد و تولیدمثل زالوها، تغذیه می‌باشد، به همین منظور در این پژوهش، تاثیر خون مهره‌داران مختلف (مرغ، گاو، گوسفند و اسب) به‌عنوان منبع غذایی روی رشد و کارایی تولیدمثلی زالوی شرقی بررسی شد.

[1] Neurobiologic

[2] Hirudin

## ۲- مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، تعداد ۱۲۰ قطعه زالوی شرقی پیش مولد از مرکز تکثیر و پرورش زالو در منطقه جویبار خریداری و به سالن آکواریوم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد. برای سازگاری با شرایط جدید قبل از انجام آزمایش، به مدت دو هفته نگهداری شدند. در این آزمایش ۴ گروه آزمایشی مختلف خون شامل اسب، گاو، گوسفند و مرغ در ۳ تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شده و در هر تکرار ۱۰ قطعه زالوی شرقی پیش‌مولد قرار داده شد. دمای سالن آزمایش حدود ۲۵ درجه سانتیگراد ثابت بوده و در شرایط تاریکی زالوها پرورش داده شدند و فقط زمان غذادهی در شرایط نور انجام شد. میزان حجم آب به ازای هر قطعه زالو حدود ۲ لیتر بوده که هر ۵ تا ۷ روز یک‌بار به‌طور کامل تعویض شد. میزان غذادهی به ازای هر زالو، ۱۰ سی‌سی از گروه‌های آزمایشی بوده است که کل حجم خونی مورد نیاز بسته به تعداد زالو در هر تکرار درون دستکش‌های لاتکس ریخته و درون آکواریوم‌ها قرار داده شد. بعد از تغذیه پیش‌مولدین، بسترهای مصنوعی متشکل از خزه‌ها درون هر اکواریوم با همان تراکم اولیه زالوها آماده شد (**شکل ۱**). خزه‌های جمع‌آوری شده از روی درختان جنگلی را با حجم پوششی کاملا یکسان درون آکواریوم‌ها قرار داده شد.

**شکل ۱- پیله‌گذاری زالوها در بسترهای مصنوعی استفاده شده.**
**Figure 1- Cocooning of leeches in artificial substrates.**

در انتهای دوره آزمایش (پس از ۵ ماه)، تعداد پیله‌های گذاشته شده توسط مولدین در هر تکرار (آکواریوم) و در نهایت تعداد کل نوزادان خارج شده از پیله‌ها نیز جمع‌آوری و شمارش شدند. طول و قطر پیله‌ها به‌کمک کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر و وزن اولیه و نهایی (بعد از اتمام تغذیه و قبل از پیله‌گذاری) آن‌ها بوسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند. برای بررسی پارامترهای رشد از شاخص‌های زیر استفاده گردید.

نسبت تعداد نوزادان به ازای کل پیله براساس **رابطه (۱)** محاسبه شد [21].

$$Avrage\ hatching\ number = \frac{number\ of\ juveniles}{cocoon\ deposited}. \qquad (۱)$$

درصد افزایش وزن بدن زالوی شرقی تغذیه شده با گروه‌های خونی مختلف براساس **رابطه (۲)** محاسبه شد [22].

$$WGP = \frac{BW_f - BW_i}{BW_i} \times 100. \qquad (۲)$$

WGP: درصد افزایش وزن بدن.

$BW_f$: وزن نهایی بر حسب گرم.

$BW_i$: وزن اولیه بر حسب گرم می‌باشد.

ضریب رشد ویژه زالو براساس رابطه زیر محاسبه شد [22].

$$SGR = \frac{ln\ W_f - ln\ W_i}{t}. \quad (۳)$$

$lnW_f$: لگاریتم طبیعی وزن نهایی بر حسب گرم.

$lnW_i$: لگاریتم طبیعی وزن اولیه بر حسب گرم.

t: طول دوره پرورش بر حسب روز (از زمان معرفی زالوها به واحدهای آزمایشی تا انتها زمان تغذیه) می‌باشد.

درصد ماندگاری زالوها نیز از نسبت بین تعداد زالوهای زنده در پایان آزمایش به تعداد زالوها در ابتدای آزمایش محاسبه شد [22].

میزان پروتئین کل (گرم بر دسی‌لیتر) در نمونه‌های خونی مختلف با روش بیورت[1] با کیت پارس آزمون (تهران، ایران) به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO, UV/Vis 2150 USA) اندازه‌گیری شد. در محیط قلیایی، پروتئین موجود در سرم با یون‌های مس تشکیل یک کمپلکس آبی مایل به بنفش می‌دهد. شدت رنگ حاصل متناسب با مقدار پروتئین در نمونه است که در طول موج ۵۴۶ نانومتر (۵۶۰-۵۲۰ نانومتر) اندازه‌گیری می‌شود [23].

میزان آلبومین (گرم بر دسی‌لیتر) در نمونه‌های خونی مختلف با روش (Bromocresol Green Method) با کیت پارس آزمون (تهران، ایران) به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO, UV/Vis 2150 USA) اندازه‌گیری شد. در محیط اسیدی، آلبومین موجود در سرم با Bromocresol Green یک کمپلکس رنگی سبز-آبی ایجاد می‌کند. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار پروتئین در نمونه است که در طول موج ۵۴۶ نانومتر (۶۰۰ - ۵۴۰ نانومتر) اندازه‌گیری می‌شود [24].

نرمال بودن داده‌ها براساس روش Shapiro-Wilk بررسی شد. در صورت نرمال‌بودن داده‌ها برای مقایسه صفات مورد مطالعه در گروه‌های آزمایشی مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شده و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده می‌شود. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و برای رسم نمودار از برنامه Excel استفاده شد.

## ۳- نتایج

نتایج حاصل از تست نرمالیته Shapiro-Wilk نشان داد که تمامی صفات مورد بررسی در سطح خطای ۵% نرمال بودند ($p>0.05$). نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس صفات مورد بررسی نشان داد که به جز قطر پیله‌ها، در بقیه صفات مورد بررسی بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$). براساس جدول آنالیز-واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌دار در بین طول پیله‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف مشاهده شد ($p<0.05$). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن هم نشان داد که میانگین طول پیله‌ها در گروه‌های آزمایشی تغذیه شده با خون گوسفند و مرغ با گروه‌های آزمایشی تغذیه شده با خون اسب و گاو اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0.05$) (**جدول ۱**).

**جدول ۱- میانگین طول (سانتی‌متر) پیله‌های بدست آمده از زالوی شرقی (*H. orientalis*) در گروه‌های آزمایشی مختلف.**

**Table 1. The average length (cm) of cocoons obtained from the *H. orientalis* in different treatments.**

| Treatments | Average | Standard Deviation | Min | Max |
|---|---|---|---|---|
| Cow | 1.43[b] | 0.21 | 1.2 | 1.6 |
| Sheep | 0.9[a] | 0.1 | 0.8 | 1 |
| Chicken | 0.6[a] | 0.36 | 0.4 | 1 |
| Horse | 1.5[b] | 0.1 | 1.4 | 1.6 |

Non-identical letters indicate significant differences between treatments.

[1] Biuret Method

بررسی میانگین قطر پیله‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف براساس جدول آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p>0.05$). اما مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که بیش‌ترین مقدار قطر پیله‌ها در گروه آزمایشی تغذیه شده با خون اسب مشاهده شد ($p<0.05$) ولی در بقیه گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.05$) (**جدول ۲**).

**جدول ۲- میانگین قطر (سانتی‌متر) پیله‌های بدست آمده از زالوی شرقی (*H. orientalis*) در گروه‌های آزمایشی مختلف.**

**Table 2- The average diameter (cm) of cocoons obtained from the *H. orientalis* in different treatments.**

| Treatments | Average | Standard Deviation | Min | Max |
|---|---|---|---|---|
| Cow | $0.97^{ab}$ | 0.21 | 0.92 | 1 |
| Sheep | $0.8^{ab}$ | 0.1 | 0.7 | 0.9 |
| Chicken | $0.6^{a}$ | 0.36 | 0.3 | 1 |
| Horse | $1.16^{b}$ | 0.29 | 0.98 | 1.56 |

Non-identical letters indicate significant differences between treatments.

بررسی وزن پیله‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف براساس جدول آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($p<0.05$). میانگین وزن پیله‌ها براساس آزمون دانکن، در زالوهای تغذیه شده با خون اسب و مرغ به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار را در بین گروه‌های آزمایشی نشان دادند ($p<0.05$) (**جدول ۳**).

**جدول ۳- میانگین وزن (گرم) پیله‌های بدست آمده از زالوی شرقی (*H. orientalis*) در گروه‌های آزمایشی مختلف.**

**Table 3- The average weight (g) of cocoons obtained from the *H. orientalis* in different treatments.**

| Treatments | Average | Standard Deviation | Min | Max |
|---|---|---|---|---|
| Cow | $0.387^{c}$ | 0.009 | 0.378 | 0.397 |
| Sheep | $0.333^{b}$ | 0.004 | 0.329 | 0.338 |
| Chicken | $0.205^{a}$ | 0.006 | 0.199 | 0.211 |
| Horse | $0.785^{d}$ | 0.02 | 0.745 | 0.785 |

Non-identical letters indicate significant differences between treatments.

بررسی وزن نهایی زالوهای تغذیه شده با خون‌هایی مختلف براساس جدول آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0.05$). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که میزان وزن نهایی زالوهای تغذیه شده با خون‌های گوسفند و مرغ تفاوت معنی‌داری با خون‌های گاو و اسب دارد ($p<0.05$). بررسی درصد افزایش وزن زالوهای تغذیه شده با خون‌های مختلف براساس جدول آنالیز واریانس، اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های آزمایشی مختلف نشان داد ($p<0.05$). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که میزان درصد افزایش وزن زالوهای تغذیه شده با خون‌های گوسفند و مرغ تفاوت معنی‌داری با خون‌های گاو و اسب دارد ($p<0.05$) (**جدول ۴**).

**جدول ۴- میانگین وزن نهایی (گرم) و درصد افزایش وزن بدن زالوهای تغذیه شده با خون‌های مختلف.**

**Table 4- The average final weight (g) and body weight gain percentage of leeches fed with different bloods.**

| Treatments | Average Final Weight | Standard Deviation | Min | Max | Percentage of Weight Gain |
|---|---|---|---|---|---|
| Cow | $4.92^{b}$ | 0.1 | 4.82 | 5.02 | $7.803^{b}$ |
| Sheep | $3.4^{a}$ | 0.37 | 3.12 | 3.82 | $2.523^{a}$ |
| Chicken | $3.06^{a}$ | 0.14 | 2.95 | 3.22 | $3.06^{a}$ |
| Horse | $5.22^{b}$ | 0.15 | 5.05 | 5.35 | $2.857^{b}$ |

Non-identical letters indicate significant differences between treatments.

بررسی شاخص ضریب رشد ویژه زالوهای تغذیه شده با گروه‌های آزمایشی مختلف براساس جدول آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0.05$). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ضریب رشد ویژه زالوهای تغذیه شده را به ترتیب در خون مرغ و اسب نشان داد ($p<0.05$) (**جدول ۵**).

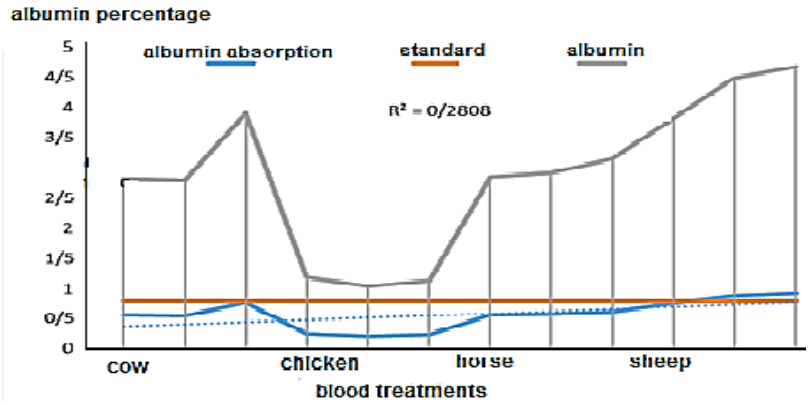
جدول ۵- ضریب رشد ویژه زالوهای تغذیه شده با خون‌های مختلف.

Table 5- Specific growth rate of leeches fed with different blood treatments.

| Treatments | Average | Standard deviation | Min | Max |
|---|---|---|---|---|
| Cow | 0.11 | 0.001 | 0.109 | 0.111 |
| Sheep | 0.091 | 0.005 | 0.087 | 0.097 |
| Chicken | 0.086 | 0.002 | 0.089 | 0.084 |
| Horse | 0.113 | 0.001 | 0.1113 | 0.1142 |

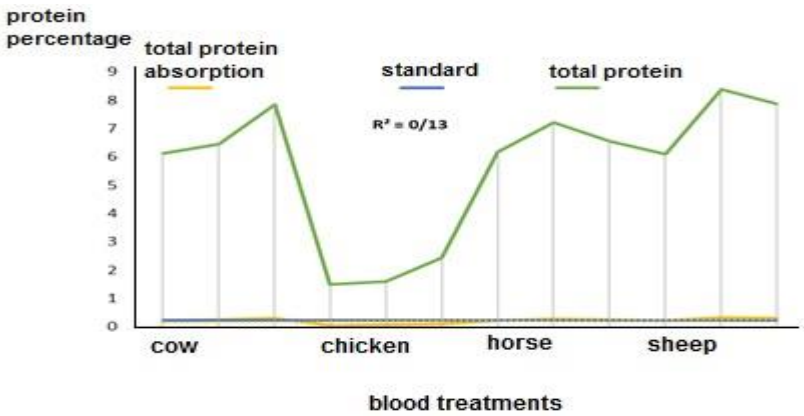
در میزان زنده‌مانی زالوهای پیش‌مولد تغذیه شده با خون‌های مختلف تفاوت چندانی مشاهده نشده است. میزان زنده‌مانی زالوهای تغذیه شده با خون‌های گاو، گوسفند و اسب ۹۳% و تغذیه شده با خون مرغ ۹۰% بوده است. بررسی میزان نوزادهای خارج شده از پیله‌ها در هر گروه آزمایشی نشان داد که در گروه‌های آزمایشی تغذیه شده با خون گوسفند و مرغ، پیله‌های تولید شده همگی مرده بوده و در این گروه‌های آزمایشی، هیچ بچه زالویی از پیله خارج نشده ولی در زالوهای تغذیه شده با خون اسب و گاو به ترتیب ۲۱ و ۸ بچه زالو از پیله‌ها خارج شده، که میزان تفریخ پیله برای این دو گروه آزمایشی به ترتیب ۲/۳۳ و ۱ می‌باشد.

نتایج بررسی مقدار آلبومین و پروتئین تام یا پروتئین کامل در گروه‌های خونی مختلف نشان داد که آلبومین موجود در خون گوسفند در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی بیش‌ترین مقدار طول موج جذب شده را دارد. کم‌ترین مقدار آلبومین براساس طول موج جذبی برای گروه آزمایشی مرغ در مقایسه با مقدار استاندارد است. ضریب تعیین برای مقدار آلبومین جذب شده ۰/۲۸ بدست آمد (**شکل ۲**). درصد مقدار پروتئین تام براساس طول موج قابل جذب در خون گاو و اسب تقریبا در سطح مقدار استاندارد است. میزان پروتئین تام براساس طول موج جذب شده در خون گوسفند بیش‌تر از بقیه گروه‌های آزمایشی است و ضریب تعیین برای مقدار پروتئین تام ۰/۱۳ است. مقدار پروتئین تام براساس طول موج جذب شده در خون مرغ نیز کم‌ترین مقدار را نشان داد (**شکل ۳**). براین اساس می‌توان گفت که خون مرغ دارای کم‌ترین مقدار پروتئین تام و آلبومین جهت رشد زالو است.




شکل ۲- مقادیر درصد آلبومین براساس طول موج ۵۴۶ نانومتر در چهار گروه خونی مختلف.

Figure 2- Albumin percentage values based on 546 nm wavelength in four different blood groups.




شکل ۳- مقادیر درصد پروتئین کل براساس طول موج ۵۴۶ نانومتر در چهار گروه خونی مختلف.

Figure 3- Total protein percentage values based on 546 nm wavelengths in four different blood groups.

## ۴- بحث

پرورش زالو در ایران به عنوان یک صنعت نوپا در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته و بسیاری از مسائل مربوط به تکثیر و پرورش آن در موضوعات مختلف تغذیه، نگهداری، تعداد پیله‌های تولید شده، تعداد بچه‌زالوهای خارج شده از پیله‌ها و غیره ناشناخته بوده و در بسیاری از موارد، اطلاعات ناکافی می‌باشد. البته یکی از مهم‌ترین دلایل آن، اهمیت اقتصادی آن‌هاست که مانع از انتشار دستاوردهای علمی و تجربی می‌گردد [25]. در ضمن، مطالعات کمی در مورد ویژگی‌های تولیدمثلی برخی گونه‌های زالوی جنس *Hirudo* انجام شده و به دلیل کاربرد پزشکی آن‌ها، اکثر مطالعات انجام شده روی گونه *H. medicinalis*، متمرکز شده است [15]. البته روند این مطالعات از سال ۲۰۱۵ تاکنون افزایش یافته است.

در این آزمایش، منابع خونی مورد استفاده در گروه‌های آزمایشی مختلف، خون تازه مهره‌داران بوده است، زیرا پرورش‌دهندگان سنتی زالو معتقدند که خون برخی مهره‌داران بهترین خون در تغذیه زالوها در پارامترهای رشد و تولیدمثل می‌باشد، اما هیچ گزارش مکتوبی در این خصوص مشاهده نشد. ولی نکته قابل تامل این است که زالوهایی که با خون تازه تغذیه شده‌اند، بیش‌ترین تعداد پیله‌ها را تولید می‌کنند [3].

تعیین شرایط بهینه یک عامل کلیدی در پرورش موفق زالو و تولیدمثل می‌باشد [3]. در گونه‌های مختلف زالو که از خون مهره‌داران تغذیه می‌کنند، نوع خون تغذیه شده بر بسیاری از شاخص‌های رشد و تولیدمثل زالوها موثر می‌باشد اما تاثیر نوع خون تغذیه شده بر شاخص‌های فراوانی نسبی زالوهای تولیدکننده پیله، تعداد پیله‌ها، تعداد بچه زالوهای خارج شده از پیله‌ها و میزان زنده‌مانی در گونه‌های مختلف زالوها، متفاوت بوده است [25]؛ به‌طوری‌که در مطالعه پتراوسکین و همکاران [25]، روی سه گونه *H. verbana*، *H. orientalis*، *H. medicinalis* بیش‌ترین باروری در گونه *H. verbena* و کم‌ترین باروری در گونه *H. medicinalis* مشاهده شده است. همچنین گونه *H. orientalis* دارای باروری و تفریخ پیله متوسط بوده که الگوی تولیدمثلی متفاوتی را نشان می‌دهد. این دو الگوی متفاوت تولیدمثل و رشد تا حدود زیادی به نوع استراتژی تولیدمثل گونه‌های مختلف مرتبط می‌باشد [25]، [26]. به‌طوری‌که استراتژی تولیدمثل در گونه *H. verbana* از نوع r و در گونه *H. medicinalis* از نوع k می‌باشد و گونه زالوی شرقی *H. orientalis* دارای استراتژی بینابینی است [25].

در این مطالعه، تعداد پیله‌های تولید شده در زالوهای تغذیه شده با خون اسب و گاو نسبت به گروه‌های آزمایشی دیگر بیش‌ترین بوده است، به‌طوری‌که در زالوهای تغذیه شده با خون اسب یک پیله به ازای هر تکرار تولید شد؛ در حالی‌که در مطالعه عبدالکاری و همکاران [3] تعداد پیله‌های تولید شده در زالوهای جنس *Hirudinea* تغذیه شده با خون مارماهی، ۶ پیله در هر تکرار بوده ولی اندازه نسبتا کوچک‌تری دارند، که افزایش چند برابری تعداد پیله های تولیدشده در این مطالعه، به شرایط آزمایش، نوع خون تغذیه شده و استفاده از پارامترهای محیطی مثل میزان نور و دما بستگی دارد [3]. ژانگ و همکاران [27] معتقدند کوچک بودن پیله‌های تولید شده در گونه‌های مختلف زالو به رقابت غذایی و مکان مناسب تولیدمثل ارتباط دارد [27].

در این مطالعه نسبت طول به قطر پیله‌ها بسیار متغیر بوده است و از ۰/۳۳ در زالوهای تغذیه شده با خون مرغ تا ۱/۷۴ در زالوهای تغذیه شده با خون گاو در نوسان بوده است که نسبت به نتایج کیلن و همکاران [15] روی پیله‌های گونه *H. verbana* مطابقت دارد، اما مقدار عددی این نسبت در مطالعه حاضر کمتر است. رابطه همبستگی بین این نسبت و طول پیله‌ها معنی‌دار و مثبت بوده که نشان می‌دهد پیله‌های دارای طول بزرگ‌تر، استوانه‌ای شکل هستند. مقایسه این نسبت بین گونه‌های مختلف زالو نشان داده که میزان استوانه‌ای شکل بودن پیله‌ها به ترتیب در گونه‌های *H. verbana*، *H. orientalis*، *H. medicinalis* مشاهده شده است [15]، [28]. تعیین رابطه معنی‌داری بین وزن زالوی مولد با وزن، طول و قطر پیله به پیش‌بینی‌های این صفات در زالوهای خارج شده از پیله‌های جمع‌آوری شده از طبیعت کمک می‌کند [15].

میانگین وزن زالوی شرقی (*H. orientalis*) بالغ قبل از پیله‌گذاری در گروه‌های آزمایشی مختلف (مرغ، گاو، گوسفند و اسب) با نتایج دیویس و مک لافلین [29] بر روی گونه *H. medicinalis* و پتراوسکین و همکاران [25] بر روی گونه *H. orientalis* تفاوت نسبتا زیادی داشته است. مقایسه تعداد پیله‌ها به ازای هر زالو در مطالعه حاضر با نتایج سایر محققین بر روی گونه زالوی شرقی و حتی سایر گونه‌ها تفاوت قابل توجه‌ای دارد؛ همچنین این تفاوت‌ها در تعداد بچه‌زالوهای خارج شده از پیله‌ها و زالوهای مولد نیز با نتایج سایر محققین تفاوت بسیار زیادی داشته است. علت این تفاوت می‌تواند کوچک بودن مولدین در این تحقیق نسبت به مطالعات دیگر [15]، تفاوت شرایط تغذیه‌ای و شرایط محیط پرورش نسبت داد. الیوت و ساویر [30] معتقد است این تغییرات احتمالا ناشی از اختلاف اندازه جنین و رقابت در مصرف آلبومین در درون پیله‌ها است. علاوه بر این، بعد از

دوره تفریخ پیله، علی‌رغم این‌که پیله‌ها باز شد و آلبومین کاملا مصرف شد، اما اکثر بچه‌زالوها، پیله‌ها را ترک نکرده و احتمالا در تعداد بچه‌زالوها محاسبه نشدند.

**جدول ۶- مقایسه پارامترهای مختلف رشد و تولیدمثل در مطالعه حاضر با تحقیقات گذشته.**

**Table 6- Comparison of different growth and reproduction parameters of the present study with past researches.**

| Parameters | The Present Study with Different Blood Groups | | | Ceylan et al. [15] | Davies and McLoughlin [29] | | Utevskaya and Atramentova [32] | Petrauskienė [25] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Species | *H. orientalis* | | | *H. verbana* | *H. medicinalis* | | *H. medicinalis* | *H. orientalis* |
| Blood | chicken | cow | sheep | horse | - | - | - | - |
| Wal (g) | 3.06 | 4.29 | 3.4 | 5.22 | 5.7 | 8.14 | - | 3.8 |
| | 2.95-3.22 | 4.28-5.02 | 3.12-3.82 | 5.05-5.35 | 1.85-15.11 | 3-13.8 | | |
| Ncpl | 0.07 | 0.28 | 0.25 | 0.32 | 3.2(1-7) | 3.1 | 4.3(1-9) | 3.07 |
| Cw (g) | 0.205 | 0.387 | 0.334 | 0.765 | 0.93 | | | |
| Cl (mm) | 7.7 | 14.3 | 9 | 15 | 21.44 | | | |
| Cd (mm) | 6 | 9.7 | 8 | 11.6 | 13.81 | | | |
| Rcld | 1.28 | 1.47 | 1.12 | 1.3 | 1.55 | | | |
| Nlpc | 0.0 | 1 | 0.0 | 2.33 | 12.29(1-23) | 3.9(0-14) | 10.9(2-26) | 8.55 |
| Nlpl | 0.0 | 0.28 | 0.0 | 0.75 | 37.92(5-103) | 11.2 | - | 26.29 |

Wal: Weight of adult leeches, Ncpl: Number of cocoons per leech, Cw: Cocoon weight, Cl: Cocoon length, Cd: Cocoon diameter, Rcld: Ratio of cocoon length to diameter, Nlpc: Number of larvae per cocoon, Nlpl: Number of larvae per leech.

بازده تولیدمثل گونه‌های مختلف زالو با وزن آن‌ها کاملا مرتبط است. فراوانی پیله‌گذاری، تعداد پیله‌ها، وزن و طول پیله‌ها، تعداد پیله های تفریخ شده، وزن بچه زالوها به طور مستقیم یا غیرمستقیم با وزن زالوی مولد و بالغ مرتبط است. براساس داده‌های به دست آمده و تجزیه و تحلیل آماری آن‌ها، تصور می‌شود که این داده‌ها می‌تواند در بهبود روش‌های تولیدمثل مصنوعی گونه‌های مختلف زالو از جمله زالوی شرقی *H. orientalis* استفاده شود. گونه‌های مختلف زالو، در میزان رشد و مرگ و میر نیز متفاوت هستند. براساس مطالعات پتراوسکین و همکاران [25] گونه *H. verbana* بیش‌ترین تفریخ پیله و کم‌ترین زنده‌مانی را داشته، اما سرعت رشد آن در بین سه گونه زالوی طبی، بالاترین مقدار بوده است. در مطالعه حاضر مقدار پیله‌گذاری گونه *H. orientalis* نسبت به سایر مطالعات انجام شده روی این گونه یا سایر گونه‌های طبی، کم‌ترین مقدار بوده است. اما در مطالعه حاضر، میزان زنده‌مانی این گونه در بین گروه‌های تغذیه شده با خون‌های مختلف و همچنین نسبت به برخی مطالعات انجام شده در مورد گونه‌های مختلف طبی تفاوت چندانی مشاهده نشد.

## ۵- نتیجه‌گیری

با توجه به اطلاعات علمی منتشر شده کمی که در مورد زالوی شرقی *H. orientalis* وجود دارد و دیدگاه پرورش‌دهندگان که معتقدند خون پستانداران مختلف اثرات متفاوتی روی پارامترهای رشد و تولیدمثل زالوها دارد. لذا در این مطالعه از خون مرغ، گاو، گوسفند و اسب برای تغذیه پیش‌مولدین این گونه استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد پارامترهای رشد و تولیدمثل در زالوهای تغذیه شده با خون مرغ کم‌ترین مقدار بوده و برای تکثیر و پرورش زالوی شرقی مناسب نمی‌باشد. گروه‌های آزمایشی خون اسب و گاو در بسیاری از پارامترهای مربوط به رشد زالوها بهترین عملکرد را داشتند، اما در مورد پارامترهای تولیدمثلی خون اسب بهتر از خون گاو بوده است.

## سپاسگزاری

مقاله حاضر، برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری می‌باشد. به‌این وسیله، نویسندگان مقاله از مسئولان دانشگاه و تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌نماید.

## عدم تعارض منافع

به این وسیله کلیه نویسندگان مقاله عدم تعارض منافع در رابطه با انتشار مقاله فوق را اعلام می‌دارند.

## منابع

[1] Gouda, H. A. (2006). The effect of peritrich ciliates on some freshwater leeches from Assiut, Egypt. *Journal of invertebrate pathology*, *93*(3), 143–149. DOI:10.1016/j.jip.2006.06.005

[2] Keim, A. (1993). Studies on the host specificity of the medicinal blood leech Hirudo medicinalis L. *Parasitology research*, *79*(3), 251–255. DOI:10.1007/BF00931901

[3] Kari, Z. A., Jamaludin, M. H., Wei, L. S., Andu, Y., Ibrahim, W., Izuddin, W. A., & Shazani, S. (2015). Effect of broodstock density on reproduction and juvenile culture of green buffalo leech, Hirudinea manillensis. *Songklanakarin journal of science & technology*, *37*(5), 581-585.

[4] Darabi-Darestani, K., & Malek, M. (2011). Seasonal variation in the occurrence of the medicinal leech Hirudo orientalis in Guilan Province, Iran. *Aquatic biology*, *11*(3), 289–294. DOI:10.3354/ab00310

[5] Petrauskiene, L. (2004). The medicinal leech as a convenient tool for water toxicity assessment. *Environmental toxicology*, *19*(4), 336–341. DOI:10.1002/tox.20039

[6] Mory, R. N., Mindell, D., & Bloom, D. A. (2000). The leech and the physician: biology, etymology, and medical practice with Hirudinea medicinalis. *World journal of surgery*, *24*(7), 878–883. DOI:10.1007/s002680010141

[7] Wenning, A., & Cahill, M. A. (1989). Structural and ultrastructural features of the inlet and outlet regions of the urinary bladders of the leech, Hirudo medicinalis L. *Journal of morphology*, *201*(3), 285–291. DOI:10.1002/jmor.1052010307

[8] Whitaker, I. S., Maltz, M., Siddall, M. E., & Graf, J. (2014). Characterization of the digestive tract microbiota of hirudo orientalis (Medicinal Leech) and antibiotic resistance profile. *Plastic and reconstructive surgery*, *133*(3), 408e--418e. DOI:10.1097/01.prs.0000438461.06217.bb

[9] Asadi Samani, H., Fatima, Q., Farmer, O., & Poria, R. (2017). Investigating the effect of leech therapy on cardiovascular diseases. *National student conference of medicinal plants and complementary medicine*. Civilica. (**In Persian**). https://civilica.com/doc/921139/

[10] Bomar, L., Maltz, M., Colston, S., & Graf, J. (2011). Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. *MBio*, *2*(2), 10–1128. DOI:10.1128/mBio.00012-11

[11] Manzano-Marín, A., Oceguera-Figueroa, A., Latorre, A., Jiménez-García, L. F., & Moya, A. (2015). Solving a bloody mess: B-vitamin independentmetabolic convergence among gammaproteobacterial obligate endosymbionts from blood-feeding arthropods and the Leech haementeria officinalis. *Genome biology and evolution*, *7*(10), 2871–2884. DOI:10.1093/gbe/evv188

[12] Zulhisyam, A. K., Ismail, A. A., & Omar, I. C. (2011). Optimization of growth conditions of Hirudinea sp. *Australian journal of basic and applied sciences*, *5*(3), 268–275.

[13] Ceylan, M., & Erbatur, İ. (2013). A study on the nutrition of medicinal leech (Hirudo verbana Carena, 1820): cannibalism? Journal of fisheries and aquatic sciences, *29*(4), 167–170. DOI:10.12714/egejfas.2012.29.4.03

[14] Darabi-Darestani, K., Sari, A., Utevska, O., & Utevsky, S. Y. (2016). Coloration pattern in populations of the eastern medicinal leech, Hirudo orientalis Utevsky & Trontelj, 2005 (Clitellata, Hirudinida): geographical distribution and life history. *Zoomorphology*, *135*(3), 291–303. DOI:10.1007/s00435-016-0316-9

[15] Ceylan, M., Çetinkaya, O., Küçükkara, R., & Akçimen, U. (2015). Reproduction efficiency of the medicinal leech Hirudo verbana Carena, 1820. *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*, *15*(3), 411–418. DOI:10.4194/1303-2712-v15_2_27

[16] Ceylan, M., Küçükkara, R., Akçimen, U., & Yener, O. (2017). Reproduction efficiency of the horse leech, haemopis sanguisuga. *Invertebrate reproduction and development*, *61*(3), 182–188. DOI:10.1080/07924259.2017.1318096

[17] Ceylan, M., Küçükkara, R., & Akçimen, U. (2019). Effects of broodstock density on reproduction efficiency and survival of southern medicinal leech, Hirudo verbana Carena, 1820. *Aquaculture*, *498*, 279–284. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.08.016

[18] 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*(11–12), 627–637. DOI:10.1080/00222933.2019.1597200

[19] Manav, M., Ceylan, M., & 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:10.1016/j.anireprosci.2019.05.004

[20] Darabi-Darestani, K., Sari, A., & Sarafrazi, A. (2016). Five new records and an annotated checklist of the leeches (Annelida: Hirudinida) of Iran. *Zootaxa*, *4170*(1), 41–70. DOI:10.11646/zootaxa.4170.1.2

[21] Yasumaru, F., & Lemos, D. (2014). Species specific in vitro protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), cobia (Rachycentron canadum), and Nile tilapia (Oreochromis niloticus). *Aquaculture*, *426–427*, 74–84. DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.01.012

[22] Helland, S. J., Grisdale-Helland, B., & Nerland, S. (1996). A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture*, *139*(1–2), 157–163. DOI:10.1016/0044-8486(95)01145-5

[23] Garg, V. K., Chand, S., Chhillar, A., & Yadav, A. (2005). Growth and reproduction of Eisenia foetida in various animal wastes during vermicomposting. *Applied ecology and environmental research*, *3*(2), 51–59. DOI:10.15666/aeer/0302_051059

[24] Bilton, H. T., & Robins, G. L. (1973). The effects of starvation and subsequent feeding on survival and growth of Fulton channel sockeye salmon fry (Oncorhynchus nerka). *Journal of the fisheries board of canada*, *30*(1), 1–5.

[25] Chahardehi, M. Y., Nikishov, A. A., & Abtahi, B. (2016). Effects of different maintenance systems and density on behavioral responces of young european medicinal leeches, Hirudo medicinalis. *Journal of plasma and biomarkers*, *9*(2), 33-38. (*In Persian*). https://www.magiran.com/paper/1564108

[26] 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*(11–12), 737–747. DOI:10.1080/00222933.2010.535918

[27] Utevsky, S., Zagmajster, M., & Trontelj, P. (2014). Hirudo medicinalis. *The iucn red list of threatened species*, *2014*, 2011–2014. https://www.gbif.org/species/176727238

[28] 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*(1–4), 198–204.

[29] Maitland, P. S., Phillips, D. S., & Gaywood, M. J. (2000). Notes on distinguishing the cocoons and the juveniles of hirudo medicinalis and haemopis sanguisuga (hirudinea). *Journal of natural history*, *34*(5), 685–692. DOI:10.1080/002229300299354

[30] Davies, R. W., & McLoughlin, N. J. (1996). The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech Hirudo medicinalis. *Freshwater biology*, *36*(3), 563–568. DOI:10.1046/j.1365-2427.1996.00121.x

[31] Elliott, J. M., & Sawyer, R. T. (1987). Leech Biology and Behaviour. *The journal of animal ecology*, *56*(2), 720. DOI:10.2307/5083

[32] Utevskaya, O. M., & Atramentova, L. A. (2003). ANOVA designs for estimating heritability of reproductive traits in medicinal leech Hirudo medicinalis L. *Russian journal of genetics*, *39*(10), 1208–1213. DOI:10.1023/A:1026191314507