Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ٤، زمستان ١٣٩٢، ٤٣٤-٤٢٥

مطالعه ارتباط بین ساختار کیسه بیضه با طول، قطر و وزن بدن در زالوی طبی *Hirudo orientalis* بر اساس مطالعات ریخت سنجی و بافت شناختی

محمد کاظم گنجوی . M.Sc[1*]، ناصر مهدوی شهری .Ph.D [1]، فرشته قاسم زاده .Ph.D [1]،
محمدعلی شریعت زاده .Ph.D [2]، امید میرشمسی کاخکی .Ph.D [1]

١- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی
٢- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ٨٣٤٩-٨-٣٨١٥٦
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: k_ganjavi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ١٣٩٢/٢/١١ تاریخ پذیرش: ١٣٩٢/٥/٢٩

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه یافتن ارتباطی بین خصوصیات بدن زالوی طبی (*Hirudo orientals*)، با ساختار کیسه بیضه و خوشه‌های اسپرمی آن است تا بتوان ارتباطی بین این مشخصات و بلوغ جنسی به منظور اهداف پرورشی برقرار کرد.

مواد و روش ها: ٣٠ نمونه از افراد جمعیت زالوی طبی از سه آب بند در شهرستان گنبدکاووس در ماه‌های اردیبهشت، تیر و آبان جمع آوری شدند. طول، عرض و وزن بدن، قطر کیسه بیضه، نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن و تعداد خوشه‌های اسپرمی برای هر نمونه به دست آمد. ٢٠ نمونه از زالوها برای مطالعه اثر گرسنگی بر کیسه بیضه، به مدت ١٢٠ روز گرسنه ماندند. داده‌ها توسط آنالیز واریانس (ANOVA) و نرم افزار SPSS16 تحلیل شدند.

نتایج: در اردیبهشت، طول، عرض و وزن بدن، قطر کیسه بیضه، نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن و تعداد خوشه‌های اسپرمی کاهش معنی‌داری در مقایسه با نمونه‌های تیر و آبان نشان دادند ($P<0.05$). خوشه‌های اسپرمی بالغ در تیر و آبان، در نمونه‌های با وزن بیش از سه گرم، طول بیش از ١٠/٣ و قطر بیش از ٠/٧٩ سانتی‌متر مشاهده شد. در زالوهای گرسنه مانده تمامی صفات، به جز طول و نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن، به صورت معنی‌داری کاهش یافتند ($P<0.05$).

نتیجه گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که ساختار کیسه بیضه و خوشه‌های اسپرمی آن می‌تواند در زالوی طبی با وزن و قطر و نه طول بدن ارتباط مستقیمی داشته باشد.

واژگان کلیدی: زالوی طبی، تولید مثل، بلوغ اسپرمی، بیضه

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زالوها یک گروه منوفیلیتیک نسبتا کوچک از کرم‌های حلقوی هستند که ممکن است نقش مهمی به‌عنوان شکارچیان بی‌مهرگان بازی کنند. برخی زالوها به‌دلیل اینکه جزء انگل های خارجی خون خوار هستند معروف می‌باشند. (۱). در زالوها اسپرماتوگونیوم(Spermatogonium) پس از جوانه زدن از دیواره کیسه بیضه به حفره بیضه‌ای که سرشار از مایع است منتقل می‌شوند. سلول‌های جنسی در حال تکوین در این حالت، توسط اتصال سرهای خود به‌یکدیگر در اطراف یک توده به‌هم پیوسته سیتوپلاسم مرکزی به نام سیتوفور(Cytophore) ظاهر خوشه مانندی را به‌وجود می‌آورند که تقسیمات میتوزی و میوزی که منجر به بلوغ جنسی می‌شود در این حالت صورت می‌گیرد. (۲). خوشه‌های اسپرمی موجود در بیضه زالوی طبی *Hirudo medicinalis* بر طبق اندازه خوشه و تعداد تقریبی سلول‌ها در هر خوشه به چهار مرحله قابل تقسیم بندی است که در طی دوره فعالیت جنسی تمام مراحل خوشه‌ای ممکن است در حفره بیضه‌ای یافت شود. مرحله اول، شامل خوشه‌های کوچکی از سلول‌های جنسی به‌هم چسبیده به تعداد ۱ تا ۶۴ عدد می‌باشد. مرحله دوم، شامل خوشه‌های بزرگتری به تعداد تقریبی ۶۴ تا ۱۲۸ سلول و یا بیشتر می باشد. در این مرحله سلول های جنسی در حال تکوین، بزرگ و حلقوی بوده، سیتوپلاسم نسبتا زیادی دارند و سیتوفور بزرگ نیست. مرحله سوم، شامل خوشه‌های بزرگی است که سلول‌های جنسی در حال تکوین در این مرحله کوچک و بیضوی بوده و سیتوپلاسم کمی دارند. در این مرحله سیتوفور بزرگ است و اولین علائم تکوین دم اسپرم آشکار می شود. در مرحله چهارم (بلوغ)، خوشه‌های اسپرمی بزرگ و با سیتوفور برجسته است که دم اسپرم به‌طور کامل تکوین یافته است (۳). بیشتر مطالعات انجام گرفته در زمینه اسپرماتوژنز در زالوهای طبی مربوط به فعالیت های Hagadorn (۳) در دهه ۱۹۶۰ بر روی گونه *Hirudo medicinalis* و همچنین Webb and Omar (۴) بر روی زالوی طبی آمریکا با نام علمی *Macrobdella decora* است. Hagadorn (۳) اسپرماتوژنز را از نظر پیشرفت در *H. medicinalis* به چهار مرحله تقسیم بندی کرد، اما Omar Webb and (۴) اسپرماتوژنز را از نظر پیشرفت در زالوی طبی *M. decora* به پنج مرحله تقسیم بندی کردند. با توجه به اهمیت نقش ترشحات سلول‌های عصبی در اسپرماتوژنز زالوها، مطالعات انجام گرفته در این زمینه فراوان است. Hagadorn (۳) ترشح عصبی را در در زالوها و نقش احتمالی آن را در تولید مثل بررسی کرد. او مشاهده کرد که دو نوع سلول ترشحی عصبی آلفا و بتا در مغز Hirudo و Theromyzon وجود دارد. سلول‌های آلفا که با پاراآلدئید فوشین رنگ می‌گیرند دارای مقادیر فراوانی سیستئین بوده و دارای چرخه سالانه‌ای از فعالیت هستند، به‌طوری‌که در فصل بهار و تابستان مقادیر زیادی از ترشح در اجسام سلولی و آکسون‌ها نشان می‌دهند. در مطالعه دیگری Hagadorn (۵) اثر برداشتن مغز در طی فاز بلوغ بیضه‌ای را در *H. medicinalis* بررسی کرد و مشاهده کرد که پس از برداشتن مغز کاهش آشکاری در مراحل ۲ و۳ خوشه‌های اسپرمی و همچنین یک کاهش کلی در تعداد کل خوشه ها مشاهده می شود. او نقش ترشحات عصبی را در پیشبرد اسپرماتوژنز نشان داد. Oka and Takeda (۲) نشان دادند که سیستم عصب مرکزی زالوی *Erpobdella lineata* شامل ۲۱ بخش سلولی است. سلول های آلفای آلدئید فوشین مثبت در گانگلیون دهانی در بخش سلولی هشت یا نه و همچنین گانگلیون زیر مری در بخش سلولی ۱۱ مشاهده می‌شوند. سیتوپلاسم سلول‌های آلفا در بخش سلولی ۱۱ به خوبی با آلدئید فوشین در طی فصل زمستان رنگ گرفتند. اما این سلول‌ها از فصل بهار تا پاییز رنگ کمی به خود گرفتند. سلول‌های جنسی در کیسه بیضه نیز از بهار تا اوایل پاییز به‌طور فعال ایجاد شدند، اما در زمستان تکوین اندکی داشتند. آن‌ها پیشنهاد کردند که مواد عصبی ترشحی که در سیتوپلاسم سلول‌های آلفا در طی زمستان جمع می‌شوند و سپس برای پیشرفت اسپرماتوژنز از بهار تا اوایل پاییز، از سلول‌ها رها شده و بر بیضه‌ها اثر می‌گذارند. در فصل تولید مثل زالوها اندامی به نام کمربند تناسلی (Clitellum) در بندهای تناسلی این جانور ظاهر می‌شود که این اندام پیله‌ای را برای تخمک‌گذاری فراهم می‌کند . با این‌که کمربند تناسلی از مشخصات شاخه کرم‌های حلقوی می‌باشد اما عدم مشاهده آن در زالوها نمی‌تواند به‌معنی عدم بلوغ اسپرماتوژنیک باشد (۶). Biernacka and Davies (۷) در مطالعه خود بر روی زالوی Erpobdella، وجود کمربند تناسلی را شاخصی غیر قابل اعتماد از بلوغ جنسی یافتند. مهمترین رفتار شناخته شده در زالوی طبی *H. medicinalis* رفتار تغذیه است (۸). در روی لب پشتی زالو های خون‌خوار ساختارهای حسی شیمیایی وجود دارد که تمام رفتارهای غذایی و هضمی را کنترل می‌کند (۹). در زالوهای خون‌خوار چرخه زندگی ارتباط مستقیمی با تغذیه دارد (۱۰) و افزایش وزن به‌شدت تحت تاثیر تغذیه از طریق خون‌خواری قرار

www.SID.ir

Archive of SID

می‌گیرد، به‌طوری‌که پس از یک وعده خون‌خواری تا زمان اشباع، وزن آن‌ها به ۴ تا ۵ برابر وزن اولیه افزایش می‌یابد (۱۱). گاهی از مواقع در بین زالوهای خون‌خوار رفتار هم‌نوع خواری هم مشاهده می‌شود (۱۲). در زالوهای خون‌خوار گرسنگی طولانی مدت نیز وزن بدن را تا حدود ۴۰ درصد وزن اولیه کاهش می‌دهد (۱۳). Zhang و همکاران (۱۴) مشاهده کردند که رژیم غذایی و همچنین تراکم زالوها در شرایط آزمایشگاهی بر تعداد کوکون‌ها و تعداد زالوهای خارج شده از آن‌ها موثر است. همچنین در مطالعه آن‌ها مشخص شد که خون گاو اثر بیشتری بر زاد آوری زالوها در مقایسه با خون قورباغه دارد. زالوی طبی شناخته شده در سطح جهان که در اروپا و آسیای جنوب شرقی کاربرد درمانی دارد با نام علمی *H. medicinalis* از نظر ظاهری بسیار شبیه زالوی طبی موجود در ایران می‌باشد که تفاوت های آنها در نحوه توزیع رنگدانه‌های سطح پشتی و شکمی می‌باشد (۱۵). زالوی طبی‌ای که در ایران زندگی می‌کند با نام علمی *Hirudo orientalis* اولین بار توسط Utevsky and Trontelj شناسایی شد (۱۵). Grosser and pesic (۱۶) نیز یک گونه زالو را از شمال ایران و شهرستان نوشهر به‌عنوان گونه جدیدی برای ایران به‌نام *Hirudo sp* گزارش کردند که پیشتر توسط Utevsky and Trontelj شناسایی شده و همان *Hirudo orientalis* است. Darabi and Malek (۱۷) مطالعه تقریبا دقیقی در زمینه نقش تغییرات فصلی در مشاهده زالوی طبی *H. orientalis* در شمال ایران انجام دادند. زیستگاه این گونه در ایران در حاشیه دریای خزر می‌باشد. جمعیت آن‌ها در آبگیرهای شهرستان رشت و سنگر در فصول اردیبهشت و خرداد زیاد می‌باشد. در تیر و مرداد جمعیت آن‌ها رو به کاهش گذاشته و از دی تا فروردین به‌خواب زمستانی می‌روند. تراکم آن‌ها در محیط زندگی خود مرتبط با تراکم دوزیستان منطقه است. دما و تراکم گیاهان آبزی نیز به‌طور مستقیم بر تعداد افراد جمعیت آن‌ها موثر است. در این محیط ها افراد با وزن کمتر از یک گرم بیشتر پس از خروج از تخم در فروردین و اردیبهشت مشاهده می‌شوند، درحالی‌که افرادی که وزن بالای پنج گرم دارند بیشتر در شهریور ماه مشاهده می‌شوند (۱۷). با توجه به اینکه مطالعات انجام گرفته در زمینه اسپرماتوژنز *H. orientalis* بسیار ناچیز می‌باشد و اکثر آن‌ها مربوط به زالوی طبی *H. medicinalis* است، هدف از مطالعه اخیر توسعه اطلاعات مربوط به دانش پایه در زمینه‌های تولید مثل و اندام‌های تولید مثلی این جانور با توجه به چشم انداز مباحث زالو تراپی و لزوم راه اندازی مزارع مربوط به پرورش زالوهای طبی است.

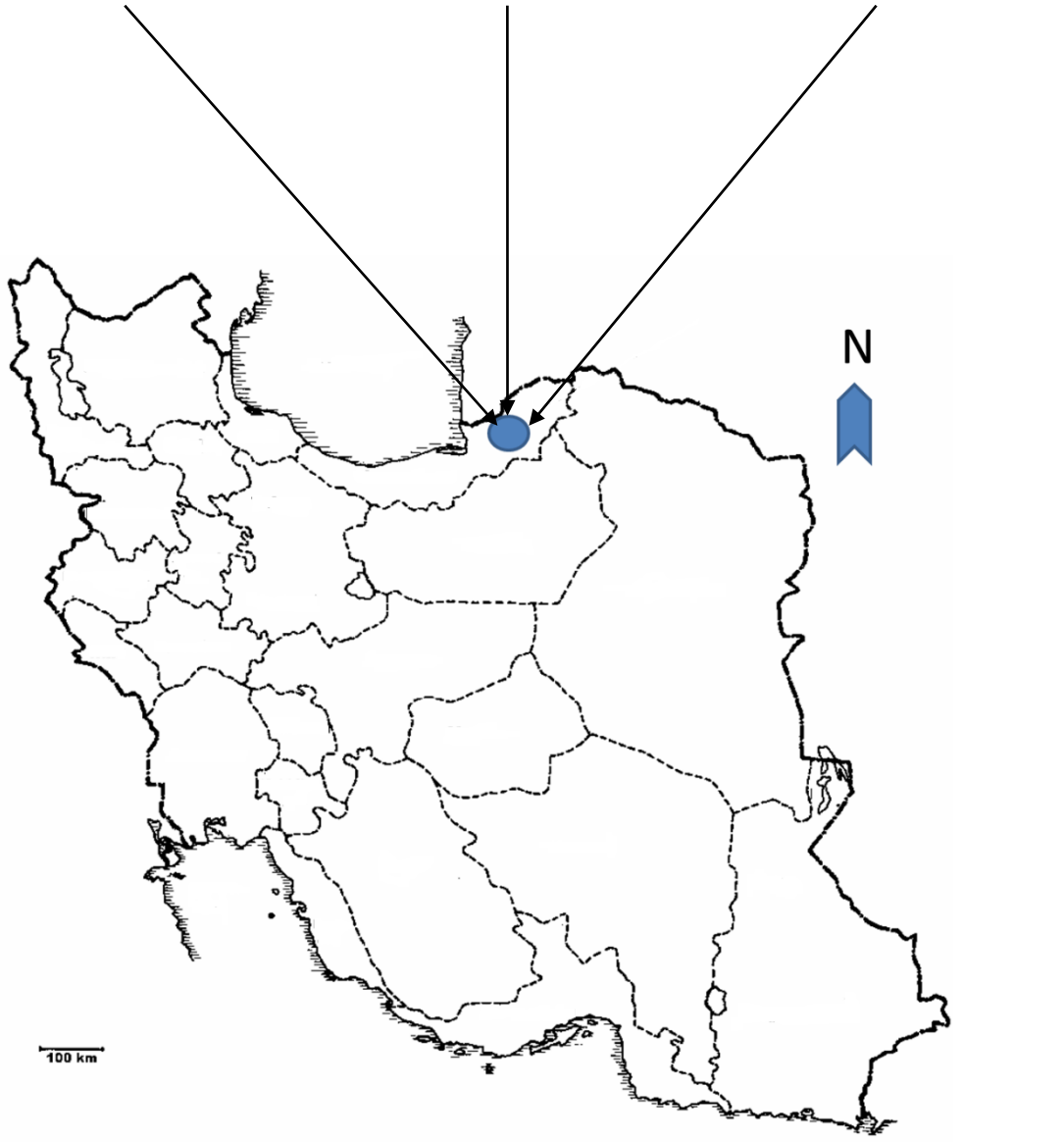
مواد و روش‌ها

این پژوهش، مطالعه‌ای میدانی بوده و عمل نمونه برداری از سطح سه آب بند موجود در منطقه روستای ایمر شهرستان گنبد کاووس واقع در استان گلستان در ماه‌های اردیبهشت، تیر و آبان انجام و در هر نوبت تعداد ۳۰ نمونه جمع آوری گردید. طول و عرض جغرافیایی و همچنین ارتفاع از سطح دریا به کمک GPS محاسبه شد. شکل ۱ نشان دهنده موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه برداری می‌باشد. نمونه‌ها پس از جمع آوری به ظروف ۲۰ لیتری وارد و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه آب آن‌ها هفته‌ای سه بار تعویض شد. حداکثر زمان نگه‌داری زالوها تا زمان تشریح ۲۰ روز بود. مطالعات ریخت سنجی شامل اندازه گیری وزن، طول و قطر بدن، قطر کیسه بیضه، نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن و اندازه گیری تعداد خوشه‌های اسپرمی بود. اندازه گیری وزن به کمک ترازوی دیجیتال Sartorius ، با دقت ۰/۰۱ گرم و اندازه گیری طول و قطر هم به کمک کولیس دستی با دقت ۰/۱ میلی‌متر انجام گرفت. با توجه به این‌که در فصل زمستان هیچ‌گونه زالویی به‌دلیل زمستان خوابی در محیط مشاهده نمی‌شود، تعداد ۲۰ نمونه از زالوهای جمع آوری شده در تیر ماه برای مشاهده اثر زمستان خوابی بر تکوین خوشه های اسپرمی و ساختار کیسه بیضه، به‌مدت ۱۲۰ روز بی غذا ماندند و اثر گرسنگی بر طول، قطر و وزن بدن و ساختار کیسه بیضه در آن‌ها بررسی شد. برای انجام مطالعات بافت شناختی، ابتدا زالوها به‌کمک اتانول ۱۰ درصد بی‌هوش شدند. این عمل علاوه بر این‌که مانع منقبض شدن بدن زالو پس از انتقال به فیکساتور می‌شود به‌دلیل رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی نیز می‌باشد. پس از تشریح از سمت پشت بدن و شستشوی دستگاه گوارش به‌کمک سرم فیزیولوژیک، مشاهده دستگاه تناسلی که حاوی نه عدد کیسه بیضه بود ممکن شد. به‌منظور جلوگیری از تا خوردن نمونه‌ها در داخل فیکساتور بلافاصله پس از تشریح، نمونه به‌وسیله فرمالین ۱۰ درصد در کوتاه مدت تثبیت شده سه نمونه که هر کدام دارای سه جفت کیسه بیضه به‌همراه دیواره بدن بود آماده شد. نمونه‌ها سپس به فیکساتور کارنو برای زمان ۴ ساعت منتقل شدند. پس از تثبیت، عملیات آب‌گیری در درجات افزایشی الکل (۷۰،۷۰،۸۰،۹۰،۱۰۰) انجام گرفت. سپس عملیات شفاف‌سازی نمونه ها به مدت ۲ ساعت در بوتانل انجام شد. پس از شفاف‌سازی، نمونه‌ها به مدت

www.SID.ir

Archive of SID

۲۴ ساعت در انکوباتور (Memert) در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد آغشته به پارافین شده و سپس قالب‌گیری انجام شد. برش گیری به‌کمک میکروتوم (Leitz) ، با ضخامت ۵ میکرومتر انجام شد و نمونه ها به کمک هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. اطلاعات مربوط به صفات مختلف به‌کمک نرم افزار SPSS 16 تحلیل و میزان معنی‌داری به کمک آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون Tukey محاسبه گردید. آزمون Kolmogorov-Smirnov نشان داد که تمامی داده‌ها نرمال می‌باشند.



شکل۱: موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه برداری واقع در شهرستان گنبد کاووس

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

زالوهای جمع آوری شده از نظر ظاهری دارای زمینه سبز چمنی در سطح پشتی و تیره در ناحیه شکمی بودند. در ناحیه پشتی سطح بدن، دو جفت خطوط طولی موازی نارنجی رنگ وجود دارد که یک جفت میانی و جفت دیگر به‌صورت جانبی قرار گرفته است. خطوط نارنجی رنگ جانبی لکه‌های تیره ای را احاطه می‌کنند. در ناحیه کناره دو طرف بدن نیز دو خط طولی زرد رنگ وجود دارد که لکه‌های تیره‌ای را احاطه می‌کنند. سطح شکمی زمینه تیره‌ای دارد و حاوی لکه‌های سبز روشن به‌صورت بند بند می‌باشد. ویژگی‌های نمونه‌های جمع آوری شده با کلید ارائه شده توسط Utevsky and Trontelj (۱۵) برای گونه*Hirudo orientalis* هم‌خوانی داشت.

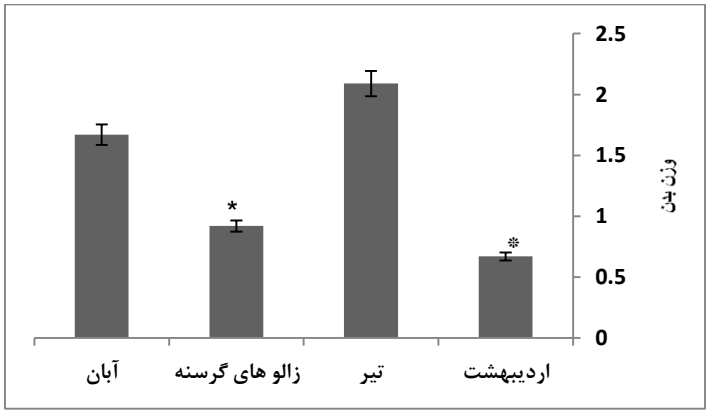
در این مطالعه حضور خوشه‌های اسپرمی مرحله چهار که حاوی اسپرم‌های بالغ تکوین یافته است، به‌عنوان شاخص بلوغ جنسی در نظر گرفته شد. همچنین تعداد خوشه‌های اسپرمی نیز برای مشخص کردن پیشرفت اسپرماتوژنز شمرده شدند.

در اردیبهشت ماه از تعداد ۳۰ نمونه جمع آوری شده، میانگین طول، وزن و قطر بدن به‌ترتیب ۶/۳۲ سانتی‌متر، ۰/۶۷۱ گرم و ۰/۴۲۶ سانتی‌متر بود. همچنین متوسط قطر کیسه بیضه، متوسط نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن و متوسط تعداد خوشه‌ها به ترتیب ۰/۰۴۸۲ سانتی‌متر، ۰/۱۱۲ و ۵۰ عدد بود. تمامی صفات بررسی شده در نمونه‌های اردیبهشت ماه به‌صورت معنی‌داری ($P<0/05$) کمتر از نمونه‌های تیر و آبان بودند (نمودار های ۱تا ۶).

در تیر ماه از ۳۰ نمونه جمع آوری شده ۱۰ نمونه در ابتدا مورد مطالعه قرار گرفتند و ۲۰ نمونه برای مدت ۱۲۰ روز گرسنه باقی ماندند. در این ۱۰ نمونه که به‌صورت تصادفی انتخاب شده بودند متوسط طول، وزن و قطر بدن به‌ترتیب ۹/۱۳ سانتی‌متر، ۲/۰۹۷ گرم و۰/۶۲۴ سانتی‌متر بود. همچنین متوسط قطر کیسه بیضه، متوسط نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن و متوسط تعداد خوشه ها به ترتیب ۰/۱۱۸سانتی‌متر، ۰/۱۹۵ سانتی‌متر و ۱۸۰ عدد بود (نمودار های ۱ تا ۶).

در نمونه‌های گرسنه باقی مانده برای ۱۲۰ روز، میانگین طول، وزن و قطر بدن به ترتیب۷/۸۱ سانتی‌متر، ۰/۹۲۴ گرم و ۰/۴۱۲سانتی‌متر بود. میانگین وزن به‌طور متوسط ۴۱ درصد کاهش یافت. متوسط قطر کیسه بیضه، متوسط نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن و متوسط تعداد خوشها به‌ترتیب به ۰/۰۴۷۰سانتی‌متر، ۰/۱۱۵ و ۴۰ عدد کاهش یافت. تمام صفات بررسی شده به‌جز صفت طول نسبت به‌نمونه های تیر ماه به طور معنی‌داری ($P<0/05$)کاهش یافت (نمودار های ۱تا ۶).

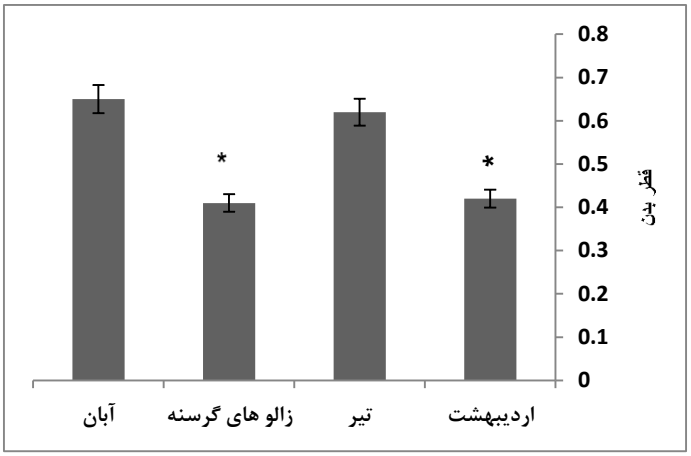
در آبان ماه متوسط طول، وزن و قطر بدن به ترتیب ۸/۷۵ سانتی‌متر، ۱/۶۸ گرم و ۰/۶۵ سانتی‌متر بود. همچنین متوسط قطر کیسه بیضه، متوسط نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن و متوسط تعداد خوشه‌ها به ترتیب ۰/۰۸۷۹سانتی‌متر، ۰/۱۳۴ و ۱۴۱ عدد بود. تنها صفات قطر کیسه بیضه و نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن در آبان ماه به صورت معنی داری کمتر از نمونههای تیر ماه بود و بقیه صفات اختلاف معنی داری با نمونههای تیر ماه نداشتند (نمودار های ۱تا ۶).



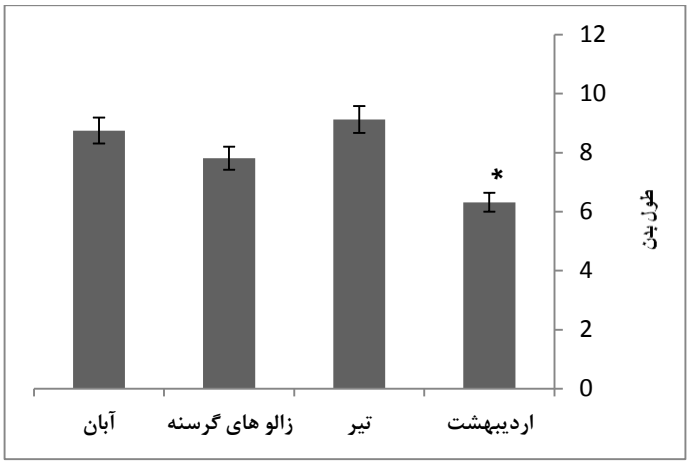
نمودار۱: نمونه‌های اردیبهشت و گرسنه باقی مانده، به صورت معنی داری وزن کمتری نسبت به نمونه های تیر ماه و آبان ماه داشتند (وزن بر حسب گرم).($P<0.05$)

www.SID.ir

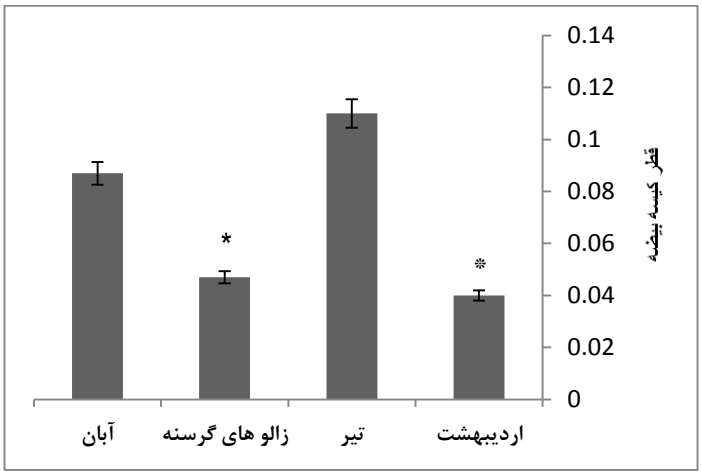
Archive of SID



نمودار۲: درنمونه‌های اردیبهشت ماه و گرسنه باقی مانده، قطر بدن اختلاف معنی داری نسبت به نمونه های تیر ماه و آبان ماه داشت (قطر بدن بر حسب سانتیمتر).($P<0.05$)



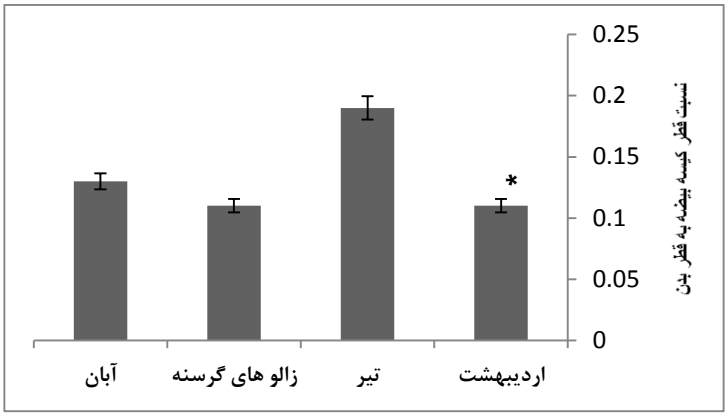
نمودار۳: نمونه های اردیبهشت ماه از نظر طول بدن اختلاف معنی داری با نمونه های دیگر داشتند (طول بدن بر حسب سانتیمتر). ($P<0.05$)



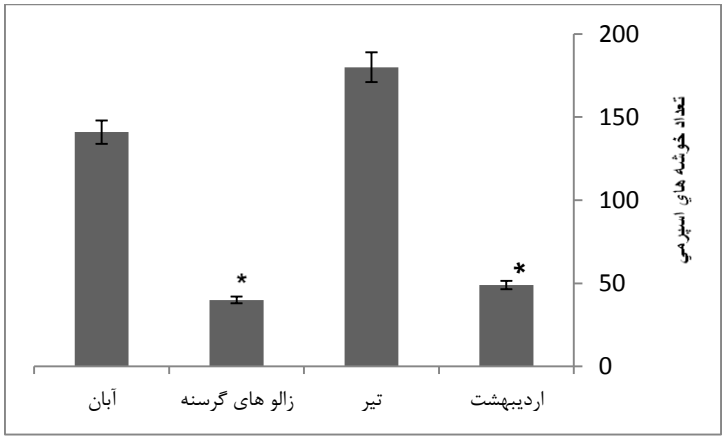
نمودار۴: در نمونه‌های اردیبهشت ماه و گرسنه باقی مانده قطر کیسه بیضه تفاوت معنی داری با نمونه های دیگر داشت (قطر کیسه بیضه بر حسب سانتیمتر). ($P<0.05$)

www.SID.ir

Archive of SID



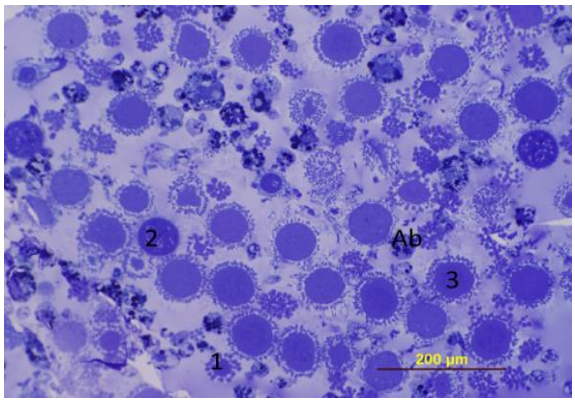
نمودار۵: نسبت قطر کیسه بیضه به قطر بدن درنمونه های اردیبهشت اختلاف معنی داری با نمونه‌های دیگر داشت.($P<0.05$)



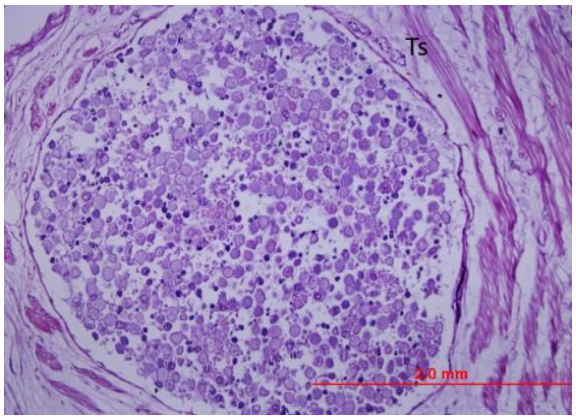
نمودار۶: در نمونه‌های اردیبهشت ماه و گرسنه باقی مانده تعداد خوشه های اسپرمی به صورت معنی داری نسبت به نمونه های دیگر تفاوت داشت. ($P<0.05$)

در اردیبهشت ماه از ۳۰ نمونه جمع آوری شده، نمونه‌ای که دارای خوشه‌های اسپرمی مرحله چهار باشد یافت نشد و همگی نمونه‌ها نابالغ بوده و دارای خوشه‌های اسپرمی مراحل یک تا سه بودند (شکل ۲).

در تیر ماه از ۳۰ نمونه جمع آوری شده، تعداد ۱۰ نمونه در ابتدا مورد بررسی قرار گرفتند که تنها دو نمونه که دارای وزن‌های ۵/۲ و ۳/۴۲ گرم بودند، بالغ و دارای خوشه‌های اسپرمی مرحله چهار بودند (شکل ۳ و ۴).



شکل۲: خوشه‌های اسپرمی مراحل ابتدایی. AB (آمیبوسیت)، 3 (خوشه های اسپرمی مرحله ۳)،2 (خوشه های اسپرمی مرحله ۲) در مقطع بیضه نمونه‌های اردیبهشت‌ماه. رنگ آمیزی آبی تولوئیدن. ×۲۰۰



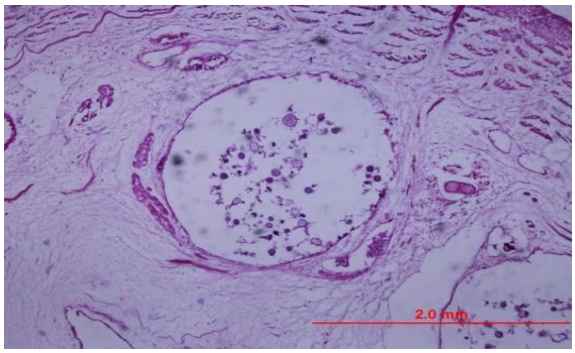
شکل۳ : افزایش خوشه‌های اسپرمی در بیضه زالوی طبی ۵/۲ گرمی در تیر ماه. TS (Tesis sac). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. ×۴۰

www.SID.ir

Archive of SID

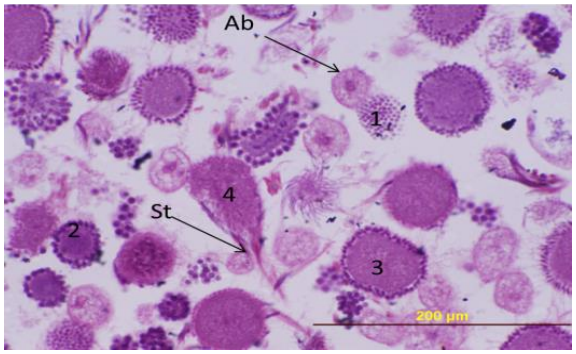
شکل۴: دمهای اسپرمی (St) و خوشه‌های اسپرمی مراحل متفاوت در مقطع بیضه زالوی طبی۳/۴۲ گرمی در تیر ماه . 4 (خوشه‌های اسپرمی مرحله ۴)، 3 (خوشه‌های اسپرمی مرحله ۳)،2 (خوشه های اسپرمی مرحله ۲). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. ×۱۰۰۰

از تعداد ۳۰ نمونه جمع آوری شده در تیر ماه تعداد ۲۰ نمونه برای مدت ۱۲۰ روز بی غذا ماندند که پس از این زمان تعداد خوشه‌های اسپرمی به‌صورت معنی‌داری ($P<0.05$) کاهش یافت و خوشه های اسپرمی مرحله چهار نیز در هیچ نمونه‌ای یافت نشد (شکل ۵). در آبان ماه از تعداد ۳۰ نمونه بررسی شده تنها دو نمونه با وزن‌های ۳/۴۶ و ۳/۳۰ گرم، دارای خوشه‌های اسپرمی مرحله چهار بودند و بقیه نمونه‌ها که وزن کمتری داشتند، نابالغ بودند (شکل ۶ و ۷).



شکل۵: کاهش خوشه‌های اسپرمی در بیضه زالوی طبی گرسنه. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین. ×۴۰

شکل۶: مقطع کیسه بیضه در زالوی ۳/۴۶ گرمی در زالوی طبی در آبان‌ماه. Ts (کیسه بیضه) VNC (طناب عصبی شکمی). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. ×۴۰



شکل۷: دمهای اسپرمی در بیضه زالوی طبی۳/۳۰ گرمی در آبان‌ماه. St(دمهای اسپرمی)، Ab(آمیبوسیت). 4 (خوشه های اسپرمی مرحله ۴)، 3 (خوشه های اسپرمی مرحله ۳)،2 (خوشه های اسپرمی مرحله ۱)،1 (خوشه های اسپرمی مرحله ۱).رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. ×۴۰۰

بحث

در این مطالعه ارتباط بین ساختار بیضه با طول، قطر و وزن بدن در زالوی طبی *Hirudo orientalis* مورد مطالعه قرار گرفت. Darabi and Malek (۱۷)، در مطالعه خود از زالوی *H. orientalis* در استان گیلان، آن‌ها را به سه گروه زیر یک گرم، بین یک تا پنج گرم و بالای پنج گرم تحت عنوان نوزادان، افراد جوان و بالغین تقسیم بندی کردند که زالوهای نوزاد با وزن کمتر از یک گرم بیشتر پس از خروج از تخم در فروردین و اردیبهشت یافت شدند، درحالی‌که آنهایی که وزن بالای پنج گرم داشتند بیشتر در شهریور ماه یافت شدند. با توجه به اینکه جفت‌گیری بسیاری از زالوها معمولا با شروع فصل بهار انجام می‌گیرد و بسیاری از زالوها بلافاصله بعد از این جفت‌گیری می‌میرند (۱۸)، بنابراین احتمالا کوچک بودن زالوهای جمع آوری شده در این مطالعه در اردیبهشت ماه به‌دلیل سن کم آن‌ها در نتیجه تولد می‌باشد. Hagadorn (۳) اسپرماتوژنز را در زالوی طبی *Hirudo medicinalis* به چهار مرحله از نظر پیشرفت تقسیم بندی کرد، اما Webb and Omar (1981) اسپرماتوژنز را در زالوی طبی *Macrobdella decora* به پنج مرحله از نظر پیشرفت اسپرماتوژنز تقسیم بندی کردند (۴). به نظر می‌رسد که این محققین مرحله سه در خوشه‌های اسپرمی که Hagadorn برای گونه *H. medicinalis* در نظر گرفته بود را به دو مرحله تقسیم کرده و اولین مشاهدات دم های اسپرمی را تحت عنوان مرحله ۴ در نظر گرفته بودند، در حالی‌که در مطالعه Hagadorn این مرحله نیز جزء مرحله ۳ در نظر گرفته شد. در این مطالعه مانند مطالعه Hagadorn (۳) اسپرماتوژنز به چهار مرحله تقسیم بندی

www.SID.ir

Archive of SID

شد. در این مطالعه در تیر و آبان وزن زالوهای جمع آوری شده به‌صورت معنی‌داری بیشتر از اردیبهشت ماه بود که دلیل این افزایش وزن، احتمالا تغذیه از طریق خون‌خواری، به‌عنوان تنها رژیم غذایی برای آن‌ها می‌باشد. از آنجا که چرخه زندگی در زالوها با تغذیه ارتباط مستقیمی دارد (۱۰)، به‌نظر می‌رسد که خون‌خواری ارتباط مستقیمی با بلوغ جنسی در زالوی طبی *H. orientalis* داشته باشد. Mcloughlin and Davies (۱۹)، در مطالعه خود مشاهده کردند که افراد جمعیت *H. medicinalis* پس از تولد بعد از ۸ تا ۹ بار خون‌خواری تا زمان اشباع و به‌فاصله ماهی یکبار، پس از ۲۸۹ روز در شرایط آزمایشگاهی و با وزن کمی بیش از ۸ گرم به بلوغ جنسی رسیدند، در حالی‌که در این مطالعه زالوهای با وزن بیش از سه گرم از نظر جنسی بالغ بودند. به‌نظر می‌رسد که این اختلاف به‌دلیل رشد نمونه‌های مربوط به مطالعه آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی باشد. همچنین آن‌ها در مطالعه خود زادآوری را به‌عنوان مصداق بلوغ جنسی در نظر گرفتند، در حالی‌که در این مطالعه وجود خوشه های اسپرمی مرحله چهار به‌عنوان شاخص بلوغ در نظر گرفته شد. با این‌وجود با توجه به این‌که هضم اریتروسیت‌ها در سیستم گوارش زالو چند ماه طول می‌کشد (۱۹) و خون خواری در زالوی طبی وزن آن را چهار تا پنج برابر افزایش می‌دهد (۱۱)، این امکان وجود دارد که در این مطالعه برخی از زالوهای جوانی که به‌تازگی تغذیه کرده‌اند و قطر و وزن بالاتری نسبت به زالوهای مسن‌تر دارند، مورد بررسی قرار گرفته باشند که در این صورت احتمالا بیضه‌های تکوین نیافته‌تری نسبت به زالوهای مسن‌تر خواهند داشت. همچنین از آنجا که گرسنگی طولانی مدت وزن و قطر بدن زالوها و تعداد خوشه‌های اسپرمی را به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد، احتمالا زالوهایی که از نظر سنی به بلوغ جنسی رسیده ولی به‌مدت زیادی مثلا طی دوره زمستان خوابی تغذیه نکرده‌اند، نیاز به یک دوره افزایش وزن و کسب انرژی از طریق تغذیه خون‌خواری برای تولید مثل داشته باشد. Keim (۲۰) محتوای مواد خونی موجود در لوله گوارش *H. medicinalis* را توسط الگوهای الکتروفورزی بررسی کرد و مشاهده کرد که زالوهایی که در لوله گوارشی آن‌ها خون قورباغه وجود داشت به‌طور آشکار وزن کمتری نسبت به آن‌هایی که خون اسب و گاو تغذیه نموده بودند آن‌ها موجود داشتند که دلیل آن محتوای انرژی کمتر خون قورباغه نسبت به خون اسب و گاو می‌باشد. Wilkin and Scofield (۱۱) در مطالعه خود از افراد جمعیت *H. medicinalis* یک نمونه زالوی دارای کمربند تناسلی را با وزن ۳/۲۴ گرم در طبیعت شناسایی کردند ، که به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه که زالوهای بالغ وزن بالای ۳ گرم داشتند، بسیار نزدیک بود. زالوهای آب شیرین در pH بسیار کم و اسیدی آب قادر به زندگی نیستند، اما قلیایی بودن آب تاثیر بسیار زیادی روی انتشار زالوها ندارد. دما و تغییرات جزئی آن هم توزیع جمعیت زالوها را تغییر نمی‌دهد، به‌جز در حداقل و حداکثر خارج از دامنه مطلوب که ممکن است تاثیرات منفی بر گسترش و تولید مثل زالو داشته باشد (۲۱). Zulhisam و همکاران (۲۲) نشان دادند که در *Hirudinea sp* افزایش دما و نور اثر سو بر تعداد پیله‌های تولید شده دارد. بسیاری از زالوها توسط انگل‌های پروتوزوآیی و کرم‌های پهن در دما و شدت نور بالا در طی آزمایش آنها آلوده شدند. در مطالعه آن‌ها در شرایطی که دما ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت نور صفر و تغذیه با خون تازه مارماهی بود تعداد کوکون‌های گذاشته شده بیشترین میزان بود. دمای بهینه در مطالعه آن‌ها به دمای بهینه در مطالعه اخیر بسیار نزدیک بود. در مطالعه اخیر در تیر ماه که دمای آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH، ۷/۵۳ بود بیشترین میزان میانگین وزن زالوها مشاهده شد و در طول نمونه برداری میزان شوری اندک و در حد آب‌های شیرین (کمتر از ۰/۵گرم در لیتر) بود.

نتیجه گیری

بر اساس مطالعات ریخت سنجی و بافت شناسی انجام گرفته در این پژوهش به‌نظر می‌رسد در *H. orientalis* صفت طول به‌جهت اینکه در طی گرسنگی طولانی مدت که تکوین خوشه های اسپرمی را در کیسه بیضه متوقف می‌کند، کاهش معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، نمی تواند با ساختار کیسه بیضه و خوشه‌های اسپرمی موجود در آن ارتباط مستقیمی داشته باشد، در حالی‌که قطر و وزن بدن می‌تواند ارتباط مستقیمی با تکوین خوشه های اسپرمی موجود در کیسه بیضه داشته باشد. با توجه به در انقراض بودن زالوهای طبی، نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند به اهداف پرورش آن‌ها کمک زیادی کند.

تشکر و قدردانی

از گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد به‌خاطر در اختیار قرار دادن امکانات لازم جهت انجام این طرح تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. همچنین مراتب تشکر و امتنان خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به

www.SID.ir

Archive of SID

خاطر تامین بخشی از هزینه های این پـژوهش (کـد طـرح: ۳/۱۷۷۱۱) ابراز می‌نماییم.

منابع

1. Sket B, Trontelj P. Global diversity of leeches (Hirudinea) in fresh water. Hydrobiologia. 2008; 595: 129-137.

2. Oka K, Takeda N. Relationship between neurosecretion and spermatogenesis in the *Erpobdella lineata*. Camp Biochem. Physiol.1986; 84A (3): 421-425.

3. Hagadorn IR. Neurosecretion in the hirudinea and its possible role in reproduction. Am Zoologist. 1966; 6: 251-261.

4. Webb RA, Omar FE. Spermatogenesis in leeches II: the effect of the supraesophageal ganglion and ventral nerve cord ganglia on spermatogenesis in the North American medicinal Leech *Macrobdella decora*. General and Comparative Endocrinology. 1981; 44: 54-63.

5. Hagadorn IR. Hormonal control of spermatogenesis in *Hirudo medicinalis* II. Testicular response to brain removal during the phase of testicular maturity. General and Comparative Endocrinology.1969; 12(3): 469-478

6. Singhal RN, Davies RW, Baird DJ. Oogenesis and spermatogenesis in *Nephelopsis obscura* and *Erpobdella punctata* (Hirudinoidea: Erpobdellidae) with comments on their life cycle. Can J Zool. 1985; 63: 2026-2031.

7. Biernacka B, Davies RW. Is a visible clitellum an index of sexual maturity in erpobdellid leeches? Invertebrate Reproduction and Development. 1995; 28(2): 97-101.

8. Lisa M, Misell BK, Shaw WB, Kristan JR. Behavioral hierarchy in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*: feeding as a dominant behavior. Behavioural Brain Research. 1998; 90: 13-21.

9. Kornreich L, Kleinhaus AL. Postingestive chemosensation and feeding by leeches. Physiology & Behavior. 1999; 67(5): 635–641.

10. Shams lahijani, M. Embryology, Reproduction and Embryogenesis in Invertebrates and small vertebrates. 1th Ed.Tehran. University of Beheshti press. 2009.

11. Wilkin PJ, Scofield AM .Growth of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, under natural and laboratory conditions. Freshwater Biology. 1991; 25: 547- 553.

12. Kutschera U, Roth M. Cannibalism in a population of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis L.*). Biology Bulletin. 2005; 32(6): 626-628.

13. Man, K.H. Leeches (Hirudinea) their structure, physiology, ecology and embryology. Volume II. 1th Ed. Pergammon press, New York. 1962.

14. Zhang B, Lin Q, Lin J, Chu X, et al. Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the Leech, *Hirudinaria manillensis*. Aquaculture. 2008; 276: 198–204.

15. Utevsky SY, Trontelj P. A new species of the medicinal leech (Oligochaeta, Hirudinida, Hirudo) from Transcaucasia and an identification key for the genus hirudo. Parasitol Res. 2005; 98: 61-66.

16. Grosser C, Pesic V. On the diversity of Iranian leeches (Annelida: Hirudinea). Arch Biol Sci Belgrade. 2006; 58(1): 21-24.

17. Darabi D, Malek M. Seasonal variation in the occurrence of the medicinal leech *Hirudo orientalis* in guilan province, Iran. Aquatic Biology. 2011; 11: 289-294.

18. Sawyer RT. Leech Biology and Behaviour, Volume II. Feeding, Biology, Ecology and Systematic. Clarendon Press. Oxford. 1986.

19. Davies RW, Mcloughlin NJ. The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. Fresh water Biology. 1996; 36(3): 563-568.

20. Keim A. Studies on the host specificity of the medicinal blood leech *Hirudo medicinalis L*. Parasitol Res.1993; 79(3): 251-5.

21. Jalali, B, Asadollah, S, Mirzaii, F, Jalali, M. Fresh water leeches of Iran. 1th Ed. Tehran. Norbakhsh press. 2009.

22. Zulhisyam AK, Ismail AA, Omar IC. Optimization of growth conditions of hirudinea sp. Aust J Basic & Appl Sci. 2011; 5(3): 268-275.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2014; 4(4): 425- 434

Original Article

The Study of Testis Sac Structure and Its Relation to Body Length, Width and Weight in *Hirudo orientalis*, Using Morphometrical and Histological Methods

Ganjavi M K, M.Sc.[1]*, Mahdavi shahri N, Ph.D.[1], Ghasemzadeh F, Ph.D[1], Shariat zadeh MA, Ph.D.[2], Mirshamsi kakhki O, Ph.D.[1]

1. Biology Department, Faculty of Scinces, Ferdowsi University, Mashhad 9177948974, Iran
2. Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran
* Email corresponding author: k_ganjavi@yahoo.com

Received: 1 May. 2013 Accepted: 20 Aug. 2013

Abstract

Aim: The aim of this project is finding a relationship between body characters of *Hirudo orientalis* with testis sac and spermatic follicles structure in order to find a relationship between these characters and sexual maturity, regarding farming goals.

Material and methods: 30 individuals of *H. orientalis* were collected From 3 ponds located in Gonbad-é-Kavous city in May, July and November. Body length, width and weight, Testis sac diameter, testis sac diameter to body diameter ratio and spermatic follicle numbers obtained for each sample. For understanding starvation effect on testis sac, 20 individuals of collected leeches were starved for 120 days. Data were analyzed using ANOVA test and SPSS 16 software.

Results: Body length, width and weight, testis sac diameter, testis sac diameter to body diameter ratio and spermatic follicle numbers showed significantly reduction in May comparing with July and November (P<0.05). Mature spermatic follicles were observed in samples with more than 3 gr weight, >10.3 cm length and >0.79 cm diameter in July and November. All of studied characters were reduced with the exception of body length and testis sac diameter to body diameter ratio in starved samples (P<0.05).

Conclusion: This study showed that testis sac structure and spermatic follicle numbers can directly related to body weight and diameter in *H. orientalis* but not to body length.

Keyword: Leeches, Reproduction, Sperm maturation, Testis

www.SID.ir