Study of karyology and reproductive capacity of populations of water frog *(Pelophylax bedriagae*) in the northern and southern regions of Khuzestan Province

Fahimeh Saberi, Ashraf Jazayeri* and Tayebeh Mohammadi
Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahwaz, Iran.

Received: 27 December 2021 Accepted: 12 March 2022

Key words

Pelophylax bedriagae
Karyology
Reproductive capacity
Male vocal sounds
Khuzestan Province

Abstract

Water frogs are an important part of the food chain in ecosystems and natural pest control. Khuzestan Province, due to climatic diversity, can be a suitable area for biosphere studies. In this regard, in the present study, the karyology of *P. bedriagae* was studied and the reproductive capacity was compared, along with the amplitude of male voice fluctuations in the breeding season in the northern and southern regions of Khuzestan Province. Twenty-one specimens of adult swamp frogs were caught live during the spring and autumn of 1995-96 and transferred to the laboratory. Species karyology, like other reports, was n = 262 and had sex chromosomes, which were divided into two groups: 5 pairs of metacentric type and 8 pairs of sub-metacentric type. Sex x chromosomes were the largest chromosome in the group y were the smallest chromosome in the group, and both types were metacentric. In the section on comparing reproductive capacity, the populations of both sexes in the northern and southern regions had the highest reproductive capacity in spring. In addition, males with higher callus weight and diameter and also females with higher weight had higher reproductive capacity. . The amplitude of the male acoustic sounds also showed that the males of the southern regions have an average intensity and amplitude of more sounds than the males of the northern regions.

* Email: jazayeriashraf@ymail.com

مطالعه کاریولوژی و توان تولیدمثلیِ جمعیت‌های قورباغه آبی *Pelophylax bedriagae* در نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان

فهیمه صابری، اشرف جزایری* و طیبه محمدی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۶ دی ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: ۲۱ اسفند ۱۴۰۰

واژه‌های کلیدی

قورباغه آبی
کاریولوژی
توان تولیدمثلی
اصوات صوتی نرها
استان خوزستان

چکیده

قورباغه آبی به عنوان بخش مهمی از زنجیره غذایی در اکوسیستم‌ها و کنترل طبیعی آفات محسوب می‌شود. استان خوزستان باتوجه به تنوع اقلیمی، می‌تواند منطقه‌ای مناسب برای مطالعات زیستی دوزیستان بی‌دم باشد. در این راستا، در پژوهش حاضر به بررسی کاریولوژی گونه *P.bedriagae* و مقایسه توان تولیدمثلی، به همراه دامنه نوسان اصوات نرها در فصل تولیدمثل در نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان پرداخته شد. تعداد ۲۱ نمونه قورباغه مردابی بالغ طی فصول بهار و پاییز ۹۶-۹۵ به صورت زنده صید و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از کشتن نمونه‌ها بوسیله کلروفرم در جار بی‌هوازی کاریولوژی و توان تولیدمثلی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. کاریوتیپ گونه در دو جنس نر و ماده همانند دیگر گزارشات ۲۶ =2n و دارای کروموزوم جنسی بود که که در دو گروه ۵ جفت از نوع متاسانتریک و ۸ جفت از نوع ساب متاسانتریک تقسیم بندی شدند. کروموزوم‌های جنسی x در گروه بزرگ‌ترین کروموزوم و y در گروه کوچک‌ترین کروموزوم و هر دو نوع متاسانتریک بودند، به این ترتیب وجود کروموزوم جنسی و اختلاف در سایز کروموزوم‌ها تأییدی بر وجود دو ریختی جنسی در جمعیت گونه حاضر بود. در بخش مقایسه توان تولیدمثلی، جمعیت هر دو جنس در نواحی شمالی و جنوبی در فصل بهار دارای بیش‌ترین توان تولیدمثلی بودند. به علاوه افراد نر با وزن و قطر زائده پینه‌ای بالاتر و هم‌چنین افراد ماده با میزان وزن بیش‌تر، از توان تولیدمثلی بیش‌تری برخوردار بودند. دامنه شدت اصوات صوتی نرها نیز نشان داد، نرهای نواحی جنوبی دارای میانگین شدت و دامنه اصوات بیش‌تری نسبت به نرهای نواحی شمالی هستند.

* پست الکترونیکی: jazayeriashraf@ymail.com

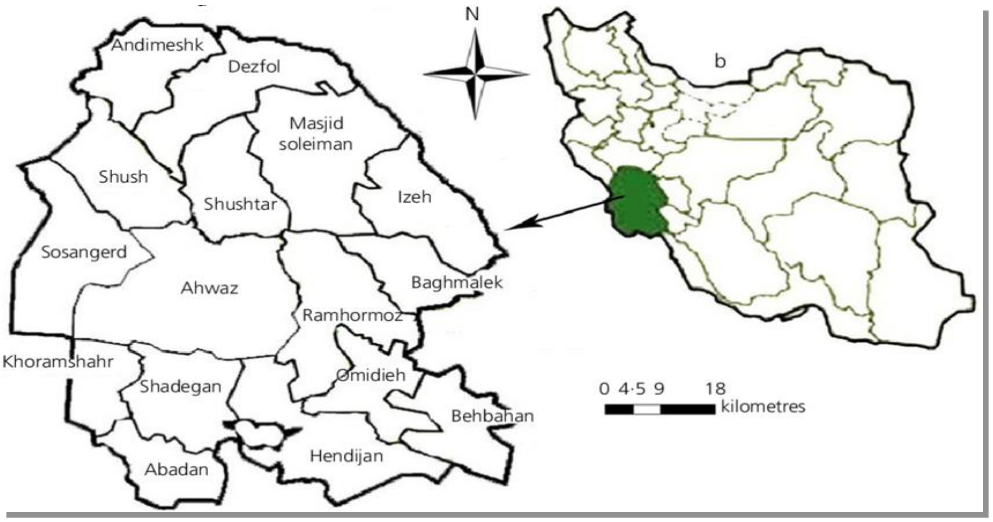
مقدمه

دوزیستان در حدود ۴۰۰ میلیون سال قبل (دوره دونین) از تکامل ماهیان باله لوب‌دار استخوانی به نام رپیدیستین ظاهر شدند. ترکیبی مهم از ویژگی‌هایی که اساساً مربوط به زیستگاه‌های آبی است، به این گونه‌ها امکان زندگی در خشکی را می‌دهد (Hickman et al., 2014). راسته دوزیستان بی‌دم، بیش‌ترین گستردگی را در سرتاسر جهان در بین دوزیستان دارند، علاوه برآن، صفات سیناپومورف زیادی از جمله کاهش تعداد مهره‌ها به ۹ عدد، جوش خوردن مهره‌های دمی، تشکیل یوروستیل ...، تک نیایی بودن دوزیستان بی‌دم را تأیید می‌کند (Frost, 2011). خانواده Ranidae جزء راسته مذکور بوده و تاکنون گونه‌های زیادی (۳۹۹) از این خانواده معرفی شده است که سه گونه از آن شامل *Rana macrocnemis*، *Rana pseudodalmatina* و *Pelophylax ridibundus* در ایران شناسایی شده‌اند (Frost, 2021). گونه *Pelophylax ridibundus* نخستین بار از ساحل شمالی دریای خزر و رودخانه‌ی ولگا گزارش شد و تا چندین سال پیش این گونه با نام *Rana ridibunda* شناخته میشد، اما به علت موقعیت پارافیلیتیک جنس *Rana* به *Pelophylax* تغییر یافت (Frost et al., 2006; Frost, 2011). قورباغه‌های مردابی جنس *Pelophylax* ازنظر ریختی دارای شباهت‌های زیادی می‌باشند ولی با بررسی‌های ژنتیکی و تأثیرات تغییرات زیست محیطی منطقه و با توجه به نقش فرایند گونه زایی در سواحل دریای مدیترانه شرقی، مشخص شد که در این مناطق چندین گونه متفاوت از نظر ژنتیکی وجود دارد که نیازمند بررسی‌های دقیق می‌باشند (Pierce et al., 2013). در گذشته تمامی جمعیت‌های قورباغه مردابی در ایران به گونه *Pelophylax ridibundus* مربوط می‌شدند، اما نتیجه مطالعات انجام شده نشان داد که جمعیت‌های قورباغه مردابی در دو گروه بزرگ جای می‌گیرند که یک گروه جمعیت شمال غرب و جنوب غرب یعنی گونه *P.bedriage* که از ترکیه وارد شده و گروه دوم شامل جمعیت‌های شمال و شمال شرق یعنی گونه *Pelophylax sp.* می‌باشد (Pesarakloo., 2016).

هر کدام از گونه‌های جانوری دارای یک سری ویژگی‌های کروموزومی است که کاریوتیپ نامیده می‌شود. شکل، تعداد و اندازه کروموزوم‌ها در شناسایی گونه‌ها مؤثر می‌باشد. در مرحله متافاز میتوزی تنها دو عامل در مورد یک کروموزوم قابل تشخیص است، اندازه کروموزوم و محل استقرار سانترومر، که با اندازه گیری طول بازوهای هر کروموزوم می‌توان نسبت بازوها ر بدست آورد. بر این اساس، نوع کروموزوم، آکروسانتریک، ساب متاسانتریک، متاسانتریک، تلوسانتریک و ساب تلوسانتریک مشخص می‌شود (Levan et al., 1964; Fakharzadeh et al., 2018). گروه‌بندی کروموزوم‌های یک فرد از نظر تعداد، شکل و سایر ویژگی‌های تیپیک کروموزومی، اطلاعات ژنتیکی زیادی را در جانوران مورد مطالعه نشان می‌دهد (Darvish, 1998). تفاوت در شکل کروموزوم‌ها و تقارن کاریوتیپی از عوامل مهم در مطالعه تکامل است (Levan et al., 1964). افزون بر آن، تعیین عدد کروموزومی گونه، تشخیص کروموزم‌های جنسی در صورت وجود، تعیین وضعیت هتروکروموزومی یا هموکروموزومی، شناسایی و دسته‌بندی انواع کروموزم‌ها و محاسبه برخی شاخص‌های کروموزومی، می‌توانند در رده‌بندی نقش مهمی را ایفا نمایند، به علاوه ضمن مطالعات کاریولوژیکی می‌توان احتمال وقوع انواع جهش‌ها و گونه زایی را نیز تشخیص داد (Piriaei & Tahamtani, 2011). وجود کروموزوم‌های جنسی در کاریولوژی یک گونه، جهت انجام مطالعات مربوط به تکامل کروموزومی مفید است (Cioffi et al., 2010; Matsubara et al., 2013). به نحوی که، توالی‌های تکراری اغلب در کروموزوم‌های جنسی تجمع می‌یابند و در مجاورت جایگاه تعیین جنسیت در بسیاری از گونه‌ها

شناسایی می‌شوند (Liu et al., 2019). علاوه بر آن، تقویت توالی‌های تکراری در کروموزوم‌های جنسی با فرآیند تمایز کروموزوم‌های جنسی مرتبط است (Poltronieri et al., 2014; Matsubara et al., 2016). با توجه به اینکه دوزیستان جانورانی خون‌سرد هستند چنانچه مطالعه کاریولوژی در فصل مناسب (بهار- تابستان) و همزمان با اوج فعالیت‌های متابولیسمی این جانوران انجام شود نتایج بهتری حاصل می‌گردد (Piriaei & Tahamtani, 2011).

مطالعه ویژگی‌های زایشی جانوران، یک راهکار اساسی است تا به سوالات زیادی در رابطه با زیست شناسی جانوران مختلف پاسخ دهند (Pesarakloo et al., 2011). دوزیستان با استفاده از سیگنال‌های صوتی، لامسه و یا شیمیایی در طول جفتگیری فرصت‌هایی را برای یافتن جفت انتخاب می‌کنند. رفتارهای تولیدمثلی تحت تأثیر هورمون‌ها قرار می‌گیرد. در دوزیستان جنس نر و گاهی ماده در زمان جفت‌گیری گامت‌های رسیده دارند. در برخی گونه‌ها ماده‌ها می‌توانند اسپرم را ذخیره کنند و زمان زیادی بعد از جفتگیری، از آن‌ها برای لقاح استفاده کنند. در بسیاری از قورباغه‌ها لقاح خارجی می‌باشد و به این صورت است که جنس نر اسپرم‌های خود را روی تخمک ماده رها می‌کند تا بارور شوند (Vitt & Caldwell, 2014). از آنجایی که تاکنون دوزیستان بی‌دم استان خوزستان کمتر مطالعه شده‌اند (شکل ۱)، بررسی کاریولوژی و توان تولیدمثلی گونه *P. bedriagae* در نواحی شمالی و مقایسه آن با نواحی جنوبی استان خوزستان هدف این تحقیق است.



شکل ۱. نقشه استان خوزستان و ایستگاه‌های مورد مطالعه

مواد و روش ها

این مطالعه بر روی ۲۱ نمونه قورباغه آبی، شامل ۵ نر و ۶ ماده از نواحی شمال و ۵ نر و ۵ ماده از نواحی جنوبی، انجام شد. نمونه برداری از رودخانه‌ها، برکه‌ها و مرداب‌ها انجام گرفت (موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌ها در جدول ۱ ذکر شده است). قورباغه‌ها با استفاده از تورهای دسته بلند و با کمک دست صید شدند. از آنجایی که این جانوران شب فعال‌اند، اکثر نمونه‌ها در شب و با کمک نور چراغ قوه گرفته شدند. کلیه نمونه‌ها به صورت زنده و در ظرف پلاستیکی درب‌دار به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

جدول ۱. مشخصات مناطق مورد مطالعه

مکان جغرافیایی	منطقه مورد مطالعه	نوع اقلیم	موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌ها
نواحی شمالی	شوش	معتدل- تپه ماهوری	32˚-48´N48˚-14´E
	دزفول	کوهپایه‌ای- کوهستانی	32˚-20´N48˚-30´E
نواحی جنوبی	خرمشهر	گرم و مرطوب- جلگه ساحلی	32˚-29´N48˚-15´E
	تالاب شادگان	گرم و مرطوب- جلگه ساحلی	48˚-20´N49˚-20´E

در تهیه کاریوتیپ وجود یک مهار کننده دوک تقسیم میتوزی لازم است تا وقفه تقسیم را در انتهای متافاز و ابتدای آنافاز ایجاد نماید. از جمله این مهار کننده‌ها می‌توان به وین بلاستین، کلشیسین و مشابه آن کلسمید (دی استیل متیل کلچسین) اشاره نمود. هم‌چنین به منظور دسترسی به کروموزوم‌ها و رها سازی آن‌ها از درون هسته از یک محلول هیپوتونیک در مایع سلولی استفاده شود تا موجب تورم سلول‌ها گردد. محلول هیپوتونیک مورد استفاده کلرید پتاسیم (KCL) ۰/۰۷۵ مولار بود و محلول تثبیت کننده، محلول تازه و سرد تهیه شده از ۳ قسمت متانول و یک قسمت اسید استیک گلایسیال در دمای۴ درجه سانتی‌گراد بود (Jazayeri et al., 2012). در این مطالعه از روش تزریق داخل صفاقی کلشیسین به منظور متافازی نمودن هسته‌های بافت خون‌ساز استفاده شد. پس از استخراج بافت مغز استخوان‌های ران، محلول هیپوتونیک به مدت ۲۰ دقیقه اضافه شد و پس از آن، چند قطره فیکساتیو سرد نیز به آن‌ها اضافه گردید. پس از انجام سه مرحله سانتریفیوژ، با دور 1500 rpm و به مدت ۱۰ دقیقه، به رسوب حاصل ۱ میلی لیتر محلول فیکستاتیو اضافه شد و سپس بوسیله پیپت پاستور، از فاصله ۶۰ تا ۸۰ سانتی‌متری لام گیری انجام شد و بلافاصله روی سطح شیب‌دار قرار گرفته و پس از خشک شدن رنگ آمیزی انجام شد. لام‌ها بلافاصله روی سطح شیب دار قرار گرفته و در هوای آزمایشگاه خشک و کد گذاری انجام شد، رنگ آمیزی لام‌ها به‌وسیله گیمسا ۵٪ به مدت ۱۰دقیقه صورت گرفت، لام‌های رنگ آمیزی شده، برچسب گذاری شده و بوسیله میکروسکوب نوری(Olympus-cx31) مطالعه و از بهترین پلاک‌های متافازی به کمک عدسی ×۱۰۰و میکروسکوپ BEL مجهز به دوربین عکس‌برداری انجام شد. پس از تهیه عکس از پلاک‌های متافازی، روی هر کروموزوم اندازه گیری‌های لازم از قبیل طول کل، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه انجام شد، سپس ضمن جدا کردن کروموزوم‌ها و شناسایی هومولوگ‌ها، کاریوتیپ مطابق روش استاندارد (Green 1970) چیده شد. برای بررسی‌های کروموزومی در اسلایدهای تولیدی از نرم افزارهای اندازه گیری Imag.J v1 & Karyo vision 3.0 استفاده شد (Jazayeri, 2012).

مطالعه ویژگی‌های تولیدمثلی

در پژوهش حاضر، پس از تشریح و جداسازی نمونه‌های نر و ماده، ابتدا در انواع نر بیضه‌ها جداسازی و با دقت به وسیله ترازوی دیجیتال توزین شد، سپس به کمک فرمول ذیل، شاخص گنادی بر اساس نسبت وزن بیضه‌ها به وزن کل جانور محاسبه گردید (Ibrahim Nejad, 2011).

$$GSI = \frac{T}{W} \times ۱۰۰$$

GSI = شاخص گنادی در افراد نر

T = وزن بیضه‌ها

W = وزن کل بدن

در فرمول حاضر، به دلیل اینکه واحد گرم از صورت و مخرج حذف می‌شود، بنابراین شاخص گنادی فاقد واحد می‌باشد. در جمعیت‌های جنس نر با توجه به دو فصل پاییز (آذرماه) که در واقع زمستان گذرانی دوزیستان است و اواسط فصل بهار (اردیبهشت‌ماه) که فعالیت‌های تولیدمثلی در سطح بالایی قرار دارند محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت. به علاوه در انواع ماده، به منظور محاسبه میزان همآوری، کل بافت تخمدانی از حفره شکمی خارج شده و با دقت توزین شد(G). سپس قطعه کوچکی از تخمدان جدا شده و مجددا توزین گردید (g). قطعه فوق را به پتری دیش حاوی آب مقطر انتقال داده، ضمن افزودن ۱ قطره دترجنت (مایع ظرف شویی) تخم‌ها از هم باز شده و در محیط آبی پتری دیش شناور شدند. ضمن مشاهده زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ به کمک کلنی کانتر شمارش دقیق تخم‌ها انجام شد(n). با کمک فرمول محاسبه همآوری، میزان همآوری محاسبه و میانگین آن برای ماده‌های بالغ محاسبه گردید (Ibrahim Nejad, 2011).

$$F = \mathrm{n} \times \frac{\mathrm{G}}{g}$$

F = همآوری

G = وزن کل تخمدان

g = وزن یک قطعه کوچک تخمدان

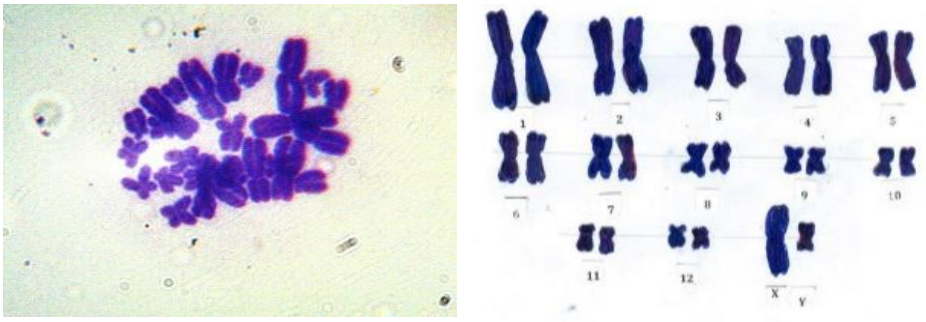
n = تعداد تخم در قطعه کوچک

اصوات نرها طی بهار از نواحی شمالی و جنوبی ثبت گردید، سپس در محیطی آرام پخش شدند و عقربه دستگاه صوت سنج بر اساس بلندی و شدت صدا اعداد مختلفی را نشان می‌داد. در پایان، جایی که عقربه ثابت ماند به عنوان شدت آن صوت ثبت کردیم و شدت اصوات بر حسب دسی بل (db) بدست آمد.

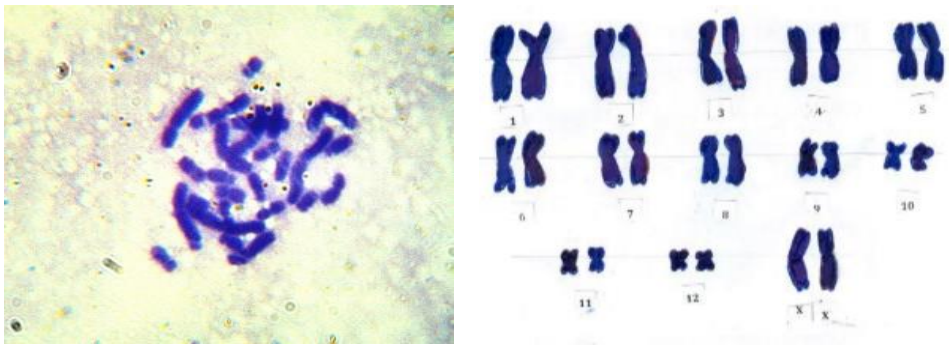
نتایج

مطالعات کاریولوژی

بر اساس پژوهش حاضر عدد کروموزومی گونه *P.bedriagae* در هر دو نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان 2n=26 مشاهد شد (شکل ۲و۳).



شکل ۲. کروموزوم‌های گونه ***P. bedriagae*** در جنس نر



شکل ۳. کروموزوم‌های گونه ***P. bedriagae*** در جنس ماده

از مجموع کروموزوم‌های فوق، کروموزوم‌های شماره ۱، ۳، ۵، ۶ و ۱۳ از نوع متاسانتریک و سایر کروموزوم‌ها از نوع ساب متاسانتریک بود. هم‌چنین کروموزوم‌های جنسی به وضوح قابل مشاهده و در جنس ماده به فرم XX و در جنس نر به فرم XY بود. تعداد بازوهای کروموزومی (FN) نیز ۵۲ بود. هم‌چنین مقایسه کاریوتیپ گونه فوق در دو ناحیه شمالی و جنوبی استان خوزستان هیچ گونه تفاوتی را نشان نداد و در حقیقت عدد کروموزومی و ساختار کاریوتیپی این گونه در جمعیت نواحی مذکور کاملا مشابهت داشته و تفاوت‌های مشاهده شده مربوط به جنسیت نر و ماده بود.

مجموعه طول کروموزومی (در عدد هاپلوئید) برابر با ۱۲۲/۹۸ میکرون بود، بیش‌ترین طول نسبی مربوط به جفت کروموزوم شماره ۱ با میزان ۱۱/۸۶ میکرون و کم‌ترین طول نسبی متعلق به جفت کروموزوم شماره ۱۲ به میزان ۱/۸۹ میکرون بود. هم‌چنین کروموزوم جنسی X از نوع متاسانتریک و با طول نسبی ۹/۷۹ میکرون در گروه بزرگ‌ترین کروموزوم‌های جمعیت این گونه قرار گرفت، در حالی که کروموزوم جنسی Y که از نوع متاسانتریک و با طول نسبی ۶/۸۳ میکرون بود در گروه کروموزوم‌های کوچک قرار گرفت. شاخص سانترومری برای جمعیت این گونه بین حداقل ۰/۲۷ میکرون (جفت کروموزوم شماره ۱۱) و حداکثر ۰/۷۴ میکرون (جفت کروموزوم شماره ۱) قرار داشت. به علاوه، شاخص سانترومری ۰/۳۷ میکرون فراوان‌ترین شاخص سانترومری مشاهده شده بود. نسبت بازویی در این گونه نیز بین حداقل ۱/۱ میکرون (جفت کروموزوم شماره ۱) و حداکثر ۲/۱ میکرون (جفت کروموزوم شماره ۱۲) قرار داشت (پیوست، جدول ۱). فرمول کاریوتیپی گونه *P.bedriagae*: 5m + 6sm = 11 (m = متاسنتریک؛ sm = ساب متاسنتریک)

شاخص‌های گنادی (GSI) و همآوری (F)

شاخص گنادی

رسیدگی یا بلوغ و زمان یا فصل تخم‌ریزی و تولیدمثل در جمعیت‌های جنس نر در نواحی مورد مطالعه در استان خوزستان از طریق محاسبه شاخص گنادی مورد بررسی قرار گرفت.

دامنه تغییرات شاخص گنادی در فصل پاییز برای جمعیت‌های جنس نر نواحی شمالی استان خوزستان، بین کم‌ترین میزان (۰/۰۵) در نرهایی به وزن (۱/۹۳) گرم تا بیش‌ترین میزان (۰/۳۴) برای نرهایی به وزن (۲۸/۹۵) گرم در نوسان بود. هم‌چنین میانگین شاخص گنادی در فصل پاییز برای جمعیت نواحی شمالی با میانگین وزنی (۷/۶۳) گرم برابر با (۰/۱۳) بود. هم‌چنین دامنه تغییرات شاخص گنادی جمعیت جنس نر در نواحی شمالی استان خوزستان در فصل بهار که اوج فعالیت تولیدمثلی است، بین کم‌ترین میزان (۰/۰۹) برای نرهایی به وزن (۲/۶۰) گرم تا بیش‌ترین میزان (۰/۴۷) برای نرهایی به وزن (۴۳/۷۶) گرم در نوسان بود. افزون برآن میانگین شاخص گنادی در فصل بهار برای جمعیت فوق با میانگین وزنی (۲۶/۳۷) گرم برابر با (۰/۳۱) بود.

دامنه تغییرات شاخص گنادی در فصل پاییز برای جمعیت‌های جنس نر نواحی جنوبی استان خوزستان، بین کم‌ترین میزان (۰/۱۶) برای نرهایی به وزن (۱۱/۰۴) گرم تا بیش‌ترین میزان (۰/۶۷) برای نرهایی به وزن (۶۰/۲۵) گرم در نوسان بود. هم‌چنین میانگین شاخص گنادی در فصل پاییز برای جمعیت نواحی جنوبی با میانگین وزنی (۳۱/۳۶) گرم برابر با (۰/۳۴) بود.

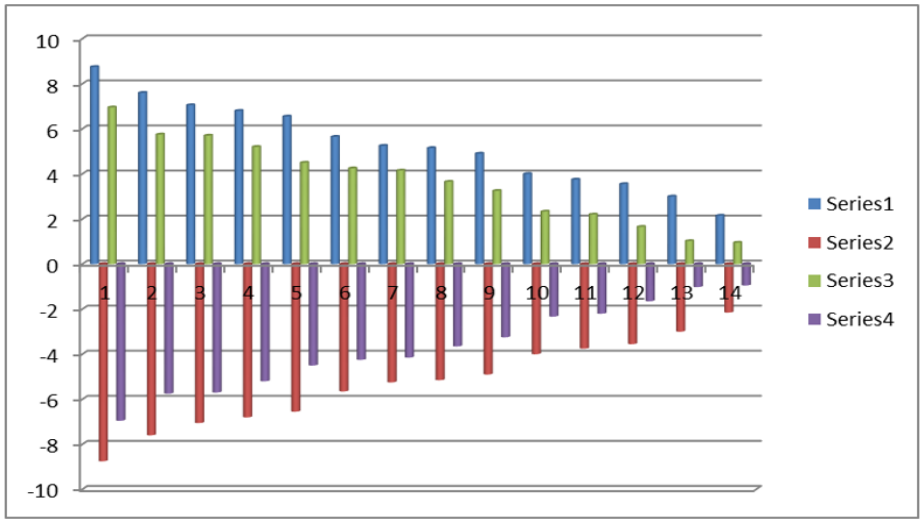
دامنه تغییرات شاخص گنادی جمعیت جنس نر در نواحی جنوبی استان خوزستان در فصل بهار که اوج فعالیت تولیدمثلی است، بین کم‌ترین میزان (۰/۲۳) برای نرهایی به وزن (۲۱/۱۰) گرم تا بیش‌ترین میزان (۱/۴۳) برای نرهایی به وزن (۶۴/۱۲) گرم در نوسان بود. هم‌چنین میانگین شاخص گنادی در فصل بهار برای جمعیت فوق با میانگین وزنی (۳۵/۵۴) گرم برابر با (۰/۴۳) بود. براساس نتایج مشاهده شد که جمعیت نرهای نواحی جنوبی در فصل بهار

در هر دو ناحیه مورد مطالعه جمعیت نرها در فصل پاییز بیش‌تر از فصل بهار بوده است، این در حالی است که با وجود تعداد کم نرها در بهار، میانگین شاخص گنادی آن‌ها بیش‌تر بود.

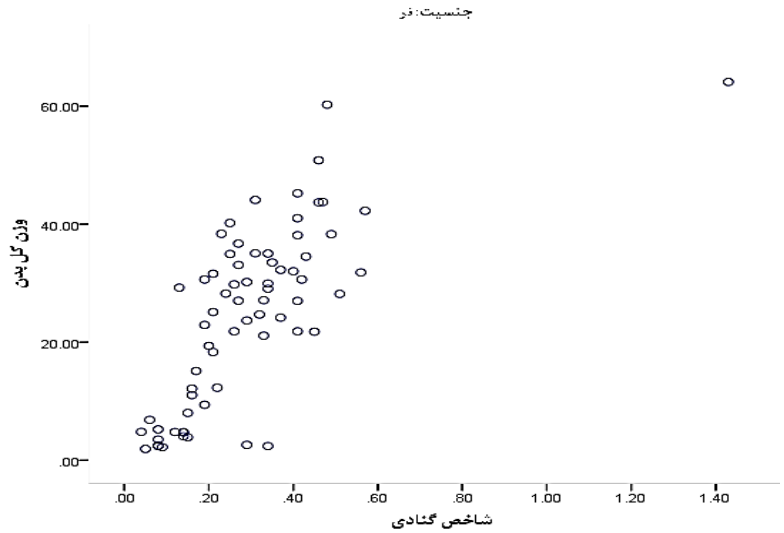
مقایسه توان تولیدمثلی در جمعیت‌های جنس نر بین نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان

مشاهده شد که شاخص گنادی و قطر زائده پینه‌ای افراد نر در سطح معنی‌داری (P<)۰/۰۵، بین نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان، دارای اختلاف معنی‌دار بود. هم‌چنین مشاهده شد که میانگین شاخص گنادی و قطر زائده پینه‌ای افراد نر در نواحی جنوبی بیش‌تر از نواحی شمالی بود.

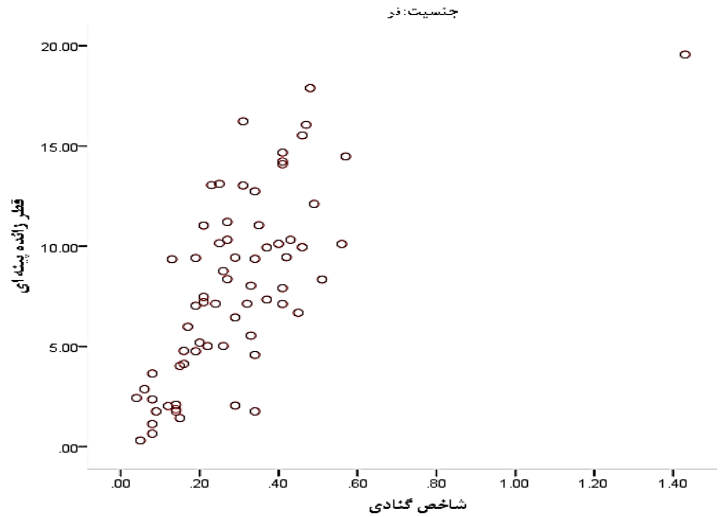
پس از مقایسه توان تولیدمثلی در نرهای دو ناحیه، ارتباط شاخص گنادی با وزن کل بدن و قطر زائده پینه‌ای در در جمعیت فوق بررسی شد. باتوجه به (شکل‌های ۵و۶) مشاهده شد که بین شاخص گنادی افراد با هریک از پارامترهای وزن کل و قطر زائده پینه‌ای، در سطح معنی‌داری (P<)۰/۰۵، رابطه مستقیم و معنی‌دار وجود داشت. از آن‌جایی که اصوات صوتی تولید شده نرها در فصل تولیدمثل، نقش تعیین کننده‌ای در یک فرآیند جفت گیری موفق دارد، بنابراین اصوات تولیدی از سوی نرها در هر دو ناحیه شمال و جنوب استان خوزستان از نقاط مختلف ضبط شده و شدت اصوات تولیدی بوسیله دستگاه صوت سنج نیز ثبت گردید.



شکل ۴. آیدیوگرام کاریوتیپ جنس نر و ماده گونه ***P. bedriagae***. رنگ آبی و قرمز: جنس نر، رنگ سبز و بنفش: جنس ماده.



شکل ۵. ارتباط شاخص گنادی با وزن کل بدن جمعیت نرهای نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان، گونه *P. bedriagae*

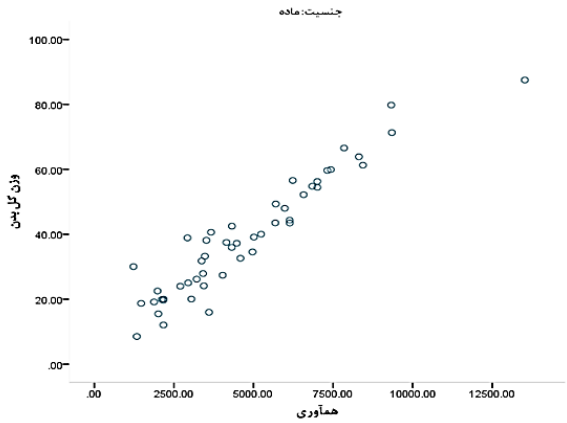


شکل ۶. ارتباط شاخص گنادی با قطر زائده پینه‌ای جمعیت نرهای نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان، گونه *P. bedriagae*

مشاهده شد که میانگین شدت اصوات تولیدی از ۵ ایستگاه در نواحی شمالی برابر با ۷۲/۴ دسی بل بود، به علاوه دامنه شدت اصوات تولیدی بین حداقل ۴۳ و حداکثر ۱۱۵ دسی بل بود. از طرفی میانگین شدت اصوات تولیدی از ۷ ایستگاه در نواحی جنوبی برابر با ۸۷/۴ دسی بل بود، هم‌چنین دامنه شدت اصوات تولیدی نیز بین ۴۲ تا ۱۳۰ دسی بل ثبت شد. نرهای نواحی جنوبی دارای میانگین شدت و دامنه اصوات بیش‌تری نسبت به نرهای نواحی شمالی داشتند.

همآوری

تعداد تخم تولیدی در هر دوره تولیدمثلی در ماده‌های بالغ می‌باشد که به منظور تعیین وزن و سن رسیدگی و زمان یا فصل تخم‌ریزی بررسی می‌شود. محاسبه همآوری نیز مطابق با بررسی‌های مربوط به شاخص گنادی در دو فصل پاییز و بهار ۹۶-۹۵ انجام شد. براساس نتایج مطالعه حاضر، میانگین همآوری در ماده‌های بالغ نواحی شمالی طی فصل پاییز برای ماده‌هایی با کم‌ترین وزن (۱۲/۰۷) گرم برابر با (۲۱۷۰) و برای ماده‌هایی با بیش‌ترین وزن (۵۶/۵۹) گرم برابر با (۸۶۲۱) در نوسان بود. از طرفی میانگین همآوری در جمعیت نواحی شمالی با میانگین وزنی (۳۸/۰۸) گرم برابر با (۴۷۲۷) در هر دوره تولیدمثلی بوده است.



شکل ۷. ارتباط تعداد تخم تولیدی با وزن بدن، ماده‌های نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان، گونه *P. bedriagae*

میانگین همآوری در ماده‌های بالغ نواحی شمالی طی فصل بهار با کم‌ترین وزن (۲۵/۰۴) گرم برابر با (۵۲۱۵) و برای ماده‌هایی با بیش‌ترین وزن (۶۳/۸۹) گرم برابر با (۹۸۳۵) در نوسان بود. از طرفی میانگین همآوری در جمعیت نواحی شمالی با میانگین وزنی (۴۱/۲۰) گرم برابر با (۶۳۵۵) در هر دوره تولیدمثلی بود.

میانگین همآوری در ماده‌های بالغ نواحی جنوبی طی فصل پاییز برای کم‌ترین وزن (۱۵/۵۱) گرم برابر با (۲۰۱۰) و برای بیش‌ترین وزن (۷۹/۸۰) گرم برابر با (۹۳۲۵) در نوسان بود. از طرفی میانگین همآوری در جمعیت نواحی جنوبی با میانگین وزنی (۳۸/۱۳) گرم برابر با (۵۳۶۸) در هر دوره تولیدمثلی بود.

میانگین همآوری در ماده‌های بالغ نواحی جنوبی طی فصل بهار بین کم‌ترین وزن (۱۹/۷۸) گرم برابر با (۲۱۷۶) و برای بیش‌ترین وزن (۸۷/۵۲) گرم برابر با (۱۱۵۶۱) در نوسان بود. از طرفی میانگین همآوری در جمعیت نواحی جنوبی با میانگین وزنی (۴۸/۷۱) گرم برابر با (۷۳۱۶) تخم در هر دوره تولیدمثلی بوده است. در میان جمعیت‌های مورد بررسی در نواحی مورد مطالعه همانند جمعیت‌های نر نواحی جنوبی، جمعیت ماده‌های جنوبی در فصل بهار دارای بیش‌ترین تعداد تخم تولیدی و جمعیت ماده‌های شمالی در فصل پاییز علی‌رغم میانگین وزنی برابر با جمعیت ماده‌های جنوبی، دارای تعداد تخم تولیدی کم‌تری در هر دوره تولیدمثلی بودند. مقایسه میزان همآوری در جمعیت‌های جنس ماده *P.bedriagae* بین نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان، نشان داد که تعداد تخم تولیدی در هر دوره تولیدمثلی در سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$)، بین نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان، فاقد اختلاف معنی‌دار است. با این وجود میانگین تعداد تخم تولیدی در جمعیت ماده‌های جنوبی از میزان بالاتری نسبت به نواحی شمالی برخوردار بود، بر این اساس برخلاف اختلاف معنی‌دار در توان تولیدمثلی نرهای شمالی و جنوبی، ماده‌های دو ناحیه از نظر تعداد تخم تولیدی همگن‌تر بودند. علاوه بر انجام آزمون T-test ، ارتباط تعداد تخم تولیدی در هر دوره تولیدمثلی با وزن کل بدن مورد بررسی قرار گرفت و مطابق (شکل ۷)، مشاهده شد که همانند نرها، ماده‌های هر دو ناحیه با افزایش وزن بدن دارای تعداد تخم تولیدی بیش‌تری در هر دوره تولیدمثلی هستند.

بحث و نتیجه گیری

کاریولوژی

مطالعات کاریولوژی بر روی دوزیستان در سال ۱۹۳۲ بر روی گونه *Bufo sachalinesis* با استفاده از بافتی که تقسیمات میتوز در آن صورت می‌گرفت آغاز شد و در حقیقت مقدمه انجام پژوهشات کاریولوژیکی در آینده قرار گرفت (Makino, 1932). نتایج پژوهش حاضر عدد کروموزومی ۲۶ را برای جمعیت‌های گونه *P.bedriagae* در نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان ارائه نمود، نتایج تحقیقات مشابه در مطالعات جزایری و همکاران (۲۰۱۳) بر روی گونه *Pelophylax ridibundus* در شهرستان‌های اهواز و شهرکرد، هم‌چنین مطالعات مولوی (۱۳۷۹)، فخارزاده در استان خراسان (۱۳۸۲)، هزاوه و همکاران در استان مرکزی (۱۳۸۵)، هم‌چنین (Bashirichelkasari & Kami, 2017) بر روی گونه *Pelophylax* sp. در استان گیلان نیز عدد کروموزومی ۲۶ را از یک‌سو و وجود کروموزوم‌های جنسی X و Y را از سوی دیگر منعکس و تأیید می‌نماید. در گونه‌های دیگری از دوزیستان بی دم عدد کروموزومی متفاوت بوده است، از جمله عدد کروموزومی *Bufo dhufarensis* در سال ۲۰۱۰ در عربستان سعودی برابر با 2n=22 محاسبه شد (Yorio & Bentley, 1977). در سال ۲۰۰۴ ، ۷۹ گونه از دوزیستان بی‌دم در چین مورد بررسی کاریولوژیکی قرار گرفتند. از خانواده Ranidae عدد کروموزومی گونه *R.japonica* و *Rana chaechiaoensis* برابر با 2n=26 و عدد کروموزومی گونه *Rana amurensis* ، *Rana chensinensis* و *Rana altacia* برابر با 2n=24 محاسبه شد (Voyles et al, 2009). در سال ۲۰۰۱ در

ترکیه عدد کروموزومی گونه *Pelobatessyriacus* از خانواده Pelobatidae، 2n=26 محاسبه شد که ترکیه عدد کروموزومی گونه *Pelobatessyriacus* از خانواده Pelobatidae، 2n=26 محاسبه شد که این گونه علاوه بر کروموزوم‌های متاسانتریک و ساب متاسانتریک دارای کروموزوم‌های آکروسانتریک نیز بود (Tur, 1997). در سال ۲۰۰۰ عدد کروموزومی ۳ گونه از جنس *Physalaemus* ، به نام‌های *Pelophylax biligonigerus* ، *Pelophylax fuscomaculatus* و *Pelophylax* sp برابر با 2n=22 محاسبه شده است (Lourenco etal., 2000).

در مطالعه حاضر مشاهده گردید، کروموزوم‌های این گونه در دو گروه متاسانتریک و ساب متاسانتریک قرار دارند و این وضعیت در اکثر افراد این گونه در سطح جهان نیز به طور قابل توجهی مشاهده شده است. مطابق نتایج مشاهده می‌شود که کروموزوم‌های جنسی در پژوهش حاضر و مطالعات جزایری و همکاران (۲۰۱۳) از نوع متاسانتریک و در مطالعات حاتمی (۱۳۹۴) از نوع ساب متاسانتریک بوده است. هم‌چنین طول کل کروموزوم‌های جنسی X و Y در این مطالعه بیش‌تر از کروموزوم‌های جنسی مطالعه شده در شهر اهواز، شهرکرد و الشتر استان لرستان بود. در ارتباط با تعداد جفت کروموزوم‌ها نیز، در پژوهش حاضر و حاتمی، ۵ جفت از نوع متاسانتریک و ۸ جفت از نوع ساب متاسانتریک بود، در حالیکه در مطالعات جزایری و همکاران، ۶ جفت از نوع متاسانتریک و ۷ جفت از نوع ساب متاسانتریک و مطالعه (Bashirichelkasari & Kami, 2017) در گونه *Pelophylax* sp. در استان گیلان، ۱۲ جفت ساب متاسانتریک و یک جفت متاسانتریک گزارش شده است. همان گونه که قابل مشاهده است، از نظر تعداد کروموزوم تفاوتی در مطالعات مشاهده نمی‌شود، آنچه که جالب توجه است، وجود تفاوت در الگوی تعداد جفت کروموزوم‌ها و طول کل کروموزوم‌های جنسی است .

به علاوه، وقوع پلی پلوئیدی در ارتباط با گونه *P. ridibundus* توسط بورکین و همکاران (۲۰۰۴) مورد مطالعه قرار گرفته و وجود کروموزوم‌های تریپلوئید و تتراپلوئید در نمونه‌های هیبرید به ثبت رسیده است. در سطح کشور ایران تا به حال نمونه‌های پلی پلوئیدی در گونه مذکور گزارش نشده است و کلیه گزارشات مربوط به تفاوت‌های اندازه و شکل کروموزوم‌ها است که همان گونه که بیان شد مستلزم مطالعات مولکولی است. البته می‌توان پیش‌بینی نمود، با توجه به مشاهده تفاوت‌های بسیار در این خصوص، احتمال وقوع پلی پلوئیدی همانند وزغ سبز تریپلوئید که توسط فخارزاده و همکاران (۲۰۱۵) گزارش شد نیز وجود داشته باشد. در مجموع مطالعه انجام شده و مطالعات پیشین نشان می‌دهد که تنوع قابل توجهی از نظر کاریوتیپی در شمار جفت کروموزوم‌های متاسانتریک و ساب متاسانتریک در نمونه‌های ایران وجود دارد که احتمال دارد نشانه‌ای از کمپلکس گونه‌ای در جنس *Pelophylax* باشد، اثبات این موضوع نیازمند انجام مطالعات مولکولی گسترده در آینده می‌باشد.

تولیدمثلی

مقایسه نتایج حاصل از بررسی شاخص گنادی در جمعیت‌های جنس نر نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان در فصول بهار و پاییز نشان داد، فراوانی نرها در هر دو ناحیه در فصل پاییز نسبت به بهار بیشتر بوده است، هم‌چنین فراوانی نرهای نواحی شمالی بیشتر بود. بیش‌ترین توان تولیدمثلی مربوط به فصل بهار و در جمعیت نرهای جنوبی و کم‌ترین توان مربوط به نرهای شمالی و در فصل پاییز بوده است. این نتایج را می‌توان چنین تحلیل کرد: خون‌سرد بودن دوزیستان و در نتیجه تأثیر پذیری بالا از شرایط اکولوژیکی با توجه به اینکه باران و درصد رطوبت محیط از تأثیر گذارترین عوامل بر آمپلکسوس تولیدمثل دوزیستان است (Najibzadeh et al, 2014)، تفاوت اقلیمی نواحی از سوی دیگر (زیستگاه‌های نواحی شمالی دارای اقلیم کوهستانی و تپه ماهوری و زیستگاه‌های جنوبی دارای اقلیم جلگه ساحلی) موجب می‌شود که، نواحی شمالی با وجود بارش بیشتر، درصد رطوبت نسبی و درجه حرارت

کم‌تری نسبت به نواحی جنوبی داشته باشند، لذا با تأثیر میزان حرارت و رطوبت و سایر عوامل اکولوژیکی بر روی جنسیت، جمعیت نواحی شمالی به سمت جنسیت نر سوق داده شده و بدیهی است در فصل پاییز که میزان درجه حرارت و رطوبت کاهش بیش‌تری می‌یابد نیز تعداد نرها فراوانی بیش‌تری نسبت به فصل بهار داشته باشند. در ارتباط با توان تولیدمثلی نیز با توجه به اینکه نواحی جنوبی دارای درجه حرارت و رطوبت نسبی بیش‌تری هستند، لذا با افزایش فعالیت‌های فیزیکی از جمله جست‌وخیز (Tsuji, 2004) و با توجه به نتایج حاصل از اصوات ضبط شده که شدت میانگین بیش‌تری را در نواحی جنوبی نشان می‌دهند، بدیهی است نیاز به غذا افزایش یافته و در نهایت وزن نیز افزایش می‌یابد و مطابق نتایج از آن‌جایی که بین وزن، توان تولیدمثلی و قطر زائده پینه‌ای رابطه مستقیم وجود دارد نرهای نواحی جنوبی با میانگین وزن بیش‌تر و قطر زائده بالاتر از توان تولیدمثلی بیش‌تری برخوردار هستند.

در مطالعه حاضر، جمعیت ماده‌ها در هر دو ناحیه در فصل بهار بیش‌تر از فصل پاییز بود، می‌توان چنین بیان نمود، چون ماده‌ها در فصل اوج تولیدمثل با افزایش وزن مواجه هستند و به حاشیه رودخانه‌ها و آبراهه‌ها رفته، تحرک کم‌تری دارند و شانس صید آن‌ها در نواحی شمالی به مراتب افزایش یافته است، در حالی که در تالاب (نواحی جنوبی) که شرایط امن و ایده آل برای هر دو جنس فراهم بوده شانس صید مساوی و به عبارتی تعادل جنسی در جمعیت برقرار است.

در ارتباط با همآوری، از آن‌جایی که تعداد تخم تولیدی در دو ناحیه فاقد تفاوت معنی‌دار بود لذا علت را می‌توان به تأثیرپذیری کم‌تر از شرایط اکولوژیکی دانست، این یافته را نتایج حاصل از آزمون آماری مبنی بر عدم وجود تفاوت جمعیت‌های ماده در نواحی شمال و جنوب، تأیید می‌کند. بنابراین، فعالیت‌های تولیدمثلی در دوزیستان به واسطه تغییرات آب‌وهوایی بسیار متنوع است و این نشان از نقش شرایط اکولوژیکی زیستگاه در فرآیند تولیدمثل است (Najibzadeh et al, 2014). در مطالعه حاضر نیز، با توجه به توضیحات داده شده فعالیت‌های تولیدمثلی متأثر از تغییرات آب و هوایی و شرایط اکولوژیکی متغیر بود.

در پژوهش حاضر، جمعیت‌های جنس نر و ماده در نواحی جنوبی در فصل بهار دارای بیش‌ترین توان تولیدمثلی بودند، فصل تخم ریزی این گونه از اوایل اسفندماه شروع شده و در اواسط بهار به اوج خود می‌رسد. مطالعات صورت گرفته در ارتباط با تولیدمثل *Pelophylax ridibundus* در تالاب انزلی نیز نشان داده است که جفت‌گیری و تخم‌ریزی این گونه در نقاط مختلف تالاب و بسته به شرایط اکولوژیکی از نیمه اسفند تا اواسط مرداد ادامه می‌یابد (Najibzadeh et al, 2014). دوره تولیدمثلی *Rana clamitans* در زمین‌های پست ویرجینیا از اواسط ماه می تا اواسط ماه سپتامبر (اردیبهشت تا مهرماه) گزارش شده است (Wells. 1979)، که با نتایج مطالعه ما متفاوت بوده و دوره تولیدمثلی بیشتری دارد. مطالعه لوکانوو و همکاران (۲۰۱۴) بر روی جفت گیری *Rana ridibunda* تحت تأثیر عوامل محیطی در بلغارستان نیز نشان داد، بین پارامترهای زیست محیطی شامل ارتفاع، درجه حرارت، آب و هوای منطقه، نوع بدن و همزیستی با گونه‌های نزدیک همبستگی معناداری وجود دارد و این نشان از نفوذ پیچیده اثرات پارامترهای زیست محیطی بر جفت‌گیری این گونه دارد (Lukanov et al, 2014).

به دنبال آن، دوئلمان و همکاران (۱۹۸۶) بیان داشته‌اند که از مهم‌ترین عواملی که در رشد جمعیت قورباغه موثر است می‌توان به تراکم و در دسترس بودن غذا، دمای محیط و میزان ماده‌های بارور اشاره کرد (Duellman & Trueb, 1986). در مطالعه حاضر نیز توان تولیدمثلی بیشتر ماده‌های نواحی جنوبی نشان از میزان غذای کافی و دمای مناسب محیط بوده است. در جمعیتی از قورباغه‌های تایوان که جنس نر دارای اندازه بدن و سر بزرگ‌تر نسبت به جنس ماده است، جفت‌گیری موفق به‌طور غیرمستقیم از طریق الگوی جنبش فضایی وابسته به اندازه رخ می‌دهد و این نشان از نقش انتخاب طبیعی در فعالیت‌های تولیدمثلی است

(Toledo & Jared, 1993).

به‌طورکلی، چرخه تولیدمثلی دوزیستان وابسته به عوامل محیطی است، بنابراین آگاهی عمیق‌تر از ویژگی‌های زیست محیطی بدون شک به تلاش برای حفاظت از جمعیت دوزیستان در برابر کاهش چشم‌گیر جمعیت آن‌ها کمک می‌کند. کوبا بیان کرد با توجه به کاهش جمعیت دوزیستان و به منظور حفاظت از گونه‌های در معرض تهدید، عواملی چون فناوری تولیدمثل، مانند هماهنگ‌سازی هورمون‌ها، ذخیره‌سازی گامت‌ها و لقاح مصنوعی ابزار ارزشمندی برای کنترل جمعیت دوزیستان هستند (Kouba et al., 2009).

در تأیید موارد ذکر شده، همان گونه که نرهای نواحی جنوبی دارای توان تولیدمثلی بالاتری در مقایسه با نرهای نواحی شمالی هستند، دامنه شدت اصوات صوتی و میانگین آن‌ها نیز برای نرهای نواحی جنوبی بیش‌تر است که علت این امر می‌تواند ناشی از تفاوت شرایط اقلیمی و در نتیجه تحرک و سایر مواردی باشد که پیش‌تر ذکر گردید. انجام مطالعات آکوستیکی می‌تواند به طور دقیق در ارتباط با مقایسه اصوات ثبت شده و عوامل تأثیرگذار بر آن اقدام نماید. اهمیت این گونه مطالعات تا آنجاست که، مطالعه بر روی ساختار صدا (مطالعات بیوآکستاتیک) منجر به توصیف چندین گونه جدید هم‌چون *Pelophylax lessonae* و *Pelophylax ridibundus* در غرب بالکان (Schneider etal, 1984)، *Rana bergeri* در ایتالیا و هم‌چنین *Rana levantina* در ترکیه، فلسطین اشغالی و مصر شد (Schneider et al., 1992). مطالعات بیوآکستاتیک، همواره به صورت ترکیب با سایر روش‌های مطالعه هم‌چون مطالعات مبتنی بر ریخت شناسی برای مثال در مورد *Pelophylax balcanica* و *Pelophylax levantina* بکار گرفته شده‌اند (Schneider et al., 1992).

منابع

Bashirichelkasari, N., Kami, H. 2017. Karyological study of the Marsh frog (*Pelophylax* sp.) in Guilan province. *Iran (Anura: Ranidae)*, 10, 677-680.

Borkin, L. J., Korshunov, A. V., Lada, G. A., Litvinchuk, S. N., Rosanov, J. M., Shabanov, D. A., & Zinenko, A. I. 2004. Mass occurrence of polyploid green frogs (Rana esculenta complex) in eastern Ukraine. *Russ, Journal of Conservation Biology*, 11(3), 194-213.

Cioffi, M. B., Martins, C., Vicari, M. R., Rebordinos, L., & Bertollo, L. A. C. 2010. Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish Hoplias malabaricus (Characiformes, Erythrinidae): unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sexual Development*, 4(3), 176-185.

Darvish, J. 1998. Color Atlas of Laboratory Vertebrate Anatomy, King. Zh. Am, Kostani. D. R. Ann. *Ferdowsi University of Mashhad Press*. Pp, 84-87.

Duellman, W. E., & Trueb, L. 1986. Biology of amphibians. *Journal H press*, 2(1), 56-78.

Fakharzadeh, F. 2003. Biosystematic study of tailless amphibians in the north and northeast of Khorasan province. Master Thesis in Animal Science. College of Science. *Ferdowsi University of Mashhad*, 156 p.

Fakharzadeh, F., Darvish, J., Kami, H. G., Ghassemzadeh, F., Rastegar-Pouyani, E. & Stock, M. 2015. Discovery of triploidy in Palearctic green toads (Anura: Bufonidae) from Iran with indications for a reproductive system involving diploids and triploids. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 255, 25-31.

Fakharzadeh, F., Darvish, J., Kami, H G., Ghassemzadeh, F., RastegarPouyani, E. 2018. Karyological Investigation of *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae) Populations from Northwest and Southeast of Iran. *Russian Herpetology Jurnal*, 25(1), 56-60.

Frost, DR. 2011. Amphibian species of the

considerations. *Theriogenology*, 71(1), 214-227.

Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, 201–220.

Liu, Y., Song, M., Luo, W., Xia, Y., & Zeng, X. 2019. Chromosomal Evolution in the Amolops mantzorum Species Group (Ranidae; Anura) Narrated by Repetitive DNAs. *Cytogenetic and genome research*, 157(3), 172-178.

Lourenço, L. B., Recco-Pimentel, S. M., & Cardoso, A. J. 2000. A second case of multivalent meiotic configurations in diploid species of Anura. *Genetics and Molecular Biology*, *23*, 131-133.

Lukanov, S. P., Tzankov, N. D., & Simeonovska-Nikolova, D. M. 2014. Effects of Environmental Factors on Mating Call Characteristics of the Marsh Frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) in Bulgaria. *Journal of Acta Zoological Bulgarica*, 66(2), 209-216.

Makino, s. 1932. Notes on the chromosomes of Rana temporaria l. and *Bufo sachalinensis* (nikolski). *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 8, 23-26.

Matsubara, K., Knopp, T., Sarre, S. D., Georges, A., & Ezaz, T. 2013. Karyotypic analysis and FISH mapping of microsatellite motifs reveal highly differentiated XX/XY sex chromosomes in the pink-tailed worm-lizard (Aprasia parapulchella, Pygopodidae, Squamata). *Molecular Cytogenetics*, *6*(1), 1-7.

Matsubara, K., O'Meally, D., Azad, B., Georges, A., Sarre, S. D., Graves, J. A. M., ... & Ezaz, T. 2016. Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida. *Chromosoma*, *125*(1), 111-123.

Najibzadeh, M., Darvish, J., Kammi., HGh., Qasemzadeh , F. 2014. Habitat comparison, mating and spawning behavior of three species of amphibian amphibians Rana *(Pelophylax) ridibundus*, Hyla savignyi tree frog and Bufo (Pseudepidalea) variabilis in Lorestan province, *Research Journal (Biology Journal) Iran*, 27 (2), 291-299.

Odierna, G., Aprea, G., Capriglione, T., Castellano, S., & Balletto, E. 2007. Cytological evidence for population-specific sex chromosome heteromorphism in Palaearctic green toads world: *An online referenceherpetology/amphibia/Am Mus Nat Hist*, 2, 13-19.

Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F., ... & Wheeler, W. C. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of natural History*, 2006(297), 1-291.

Galloy, V. & Denoël, M. 2010. Detrimental effect of temperature increase on the fitness of an amphibian (Lissotriton helveticus). *Acta Oecologica*, 36(2), 179-183.

Hatami, A. 2013. Identification and classification of tailless amphibians in Aleshtar region (Lorestan province) with emphasis on morphometry and karyology, Master Thesis, Department of Biology, Faculty of Science, *Shahid Chamran University of Ahvaz.*

Hazaveh, N., Qasemzadeh, F., Darvish, J. 2007. Biosystematic study (morphology, karyology and morphometry) of tailless amphibians (Anura) of Markazi province. *Iranian Journal of Biology*, 20 (4), 16-27.

Hickman, C. P., Roberts, L. S., Keen, S. L., Larson, A., I'anson, H. 2014. Integrate principles of zoology, sixteenth edition.

Ibrahim Nejad, M. 2011. Biology of Vertebrates, Linzi. D. *University of Isfahan Press*, 3(4), 124-129.

Ismaili, A. 2013. Comparison of frog species in a warm region (Ahvaz) and cold region (Shahrekord) with emphasis on their skin structure. Master Thesis, Department of Biology. Faculty of Science. Shahid Chamran University of Ahvaz.

Jazayeri, A., & Saberi, F. 2019. Biological study of *Pelophylax ridibundus* population in the southern habitats of Khuzestan province, 4th International Congress on Agricultural Development, Natural Resources, Environment and Tourism of Iran, Tabriz, https: // civilica .com / doc / 971953.

Jazayeri, A., Papan, F., & Ismaili, A. 2012. Karyological Study of Marsh Frogs (*Rana Ridibunda*). Life Science Journal of Life Scince, 9(3): 864-866.

König, E., Bininda-Emonds, O. R., & Shaw, C. 2015. The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*, 63, 96-117.

Kouba, A. J., Vance, C. K. and Willis, E. L. 2009. Artificial fertilization for amphibian conservation: current knowledge and future

(Amphibia, Anura). *Journal of biosciences*, 32(4), 763-768.

Pesarakloo, A., Gharzi, A., Kammi, H.Gh., Homayouni, M. 2011. Study of color polymorphism in swamp frog, Rana ridibunda in Golestan province. *Iranian Journal of Biology*. 24 (3), 455-446.

Pesarakloo, A., Rastegar-Pouyani, N., Rastegar Pouyani, E., Oraie, H. 2016. The first taxonomic revaluation of the Iranian water frogs of the genus *Pelophylax* (Anura: Ranidae) using sequences of the mitochondrial genome. *Mitochondrial DNA*, 28(3), 392-398.

Pierce, S. E., Hutchinson, J. R., & Clack, J. A. 2013. Historical perspectives on the evolution of tetrapodomorph movement. *Integrative and comparative biology*, 53(2), 209-223.

Piriaei, A., Tahamtani, AY. 2011. Developmental Biology, Gilbert. Iran Biology House. pages 210 and 211.

Schneider H, Sinsch U, Nevo E. 1992. The lake frogs in Israel represent a new species. Zoologischer A nzeiger, 228: 97- 106.

Toledo, R. C., & Jared, C. 1993. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 105(4), 593-608.

Tsuji, H. 2004. Reproductive ecology and mating success of male Limnonectes kuhlii, a fanged frog from Taiwan. *Herpetologica*, 60(2),155-67.

Tur, E. 1997. Physiology of the skin—differences between women and men. *Clinics in dermatology*, 15(1), 5-16.

Vitt, J., Caldwell, P. 2014. Herpetology An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. *Academic press*, 40,117-123.

Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., ... & Speare, R. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326(5952), 582-585.

Wells, K. D. 1979. Reproductive behavior and male mating success in a neotropical toad, *Bufo typhonius*. *Biotropica*, 301-307.

Yorio, T., & Bentley, P. J. 1977. Asymmetrical permeability of the integument of tree frogs (Hylidae). *Journal of Experimental Biology*, 67(1), 197-204.

پیوست

جدول ۱. مطالعه کروموزوم‌های جمعیت گونه *P.bedriagae* در نواحی شمالی و جنوبی استان خزستان

شماره کروموزوم	نوع کروموزوم	طول کل (میکرون)	طول نسبی (میکرون)	طول بازوی کوتاه (p)	طول بازوی بلند (q)	نسبت بازویی $(\frac{q}{p})$	شاخص سانترومری $(\frac{p}{p+q})$
۱	متاسانتریک	۱۴/۵۹	۱۱/۸۶	۶/۹۵	۷/۶۰	۱/۱	۰/۷۴
۲	ساب متاسانتریک	۱۳/۸۹	۱۱/۳۰	۵/۲۰	۸/۷۵	۱/۶	۰/۳۷
۳	متاسانتریک	۱۲/۴۶	۱۰/۱۳	۵/۷۵	۶/۸۰	۱/۳	۰/۴۶
۴	ساب متاسانتریک	۱۱/۳۷	۹/۲۴	۴/۲۵	۷/۰۵	۱/۸	۰/۳۷
۵	متاسانتریک	۱۰/۲۵	۸/۳۳	۴/۵۰	۵/۶۵	۱/۴	۰/۴۳
۶	متاسانتریک	۹/۳۳	۷/۵۸	۴/۱۵	۵/۲۵	۱/۲	۰/۴۴
۷	ساب متاسانتریک	۸/۱۶	۶/۶۳	۳/۲۵	۵/۱۵	۱/۷	۰/۳۹
۸	ساب متاسانتریک	۶/۲۸	۵/۱۰	۲/۳۳	۴/۰۰	۱/۸	۰/۳۷
۹	ساب متاسانتریک	۵/۸۲	۴/۷۳	۲/۲۰	۳/۷۵	۱/۶	۰/۳۷
۱۰	ساب متاسانتریک	۴/۵۹	۳/۷۰	۱/۶۵	۳/۰۰	۲/۰	۰/۳۵
۱۱	ساب متاسانتریک	۳/۷۵	۲/۸۰	۱/۰۲	۳/۵۵	۱/۹	۰/۲۷
۱۲	ساب متاسانتریک	۳/۱۳	۱/۸۹	۰/۹۵	۲/۱۵	½	۰/۳۰
۱۳	X متاسانتریک	۱۲/۲۵	۹/۷۹	۵/۷۰	۶/۵۵	۱/۴	۰/۴۶
	Y متاسانتریک	۸/۴۰	۶/۸۳	۳/۶۵	۴/۹۰	۱/۳	۰/۴۳