

**Biosystematic study of *Bufo*
variabilis (Pallas, 1769) populations
from East and North east of
Khuzestan province based on
morphometric and karyotype data**

**بررسی بیوسیستماتیکی جمعیت‌های گونه
Bufo variabilis (Pallas, 1769)
در مناطقی از شرق و شمال شرق استان
خوزستان بر اساس داده‌های ریخت‌سنجی
و کروموزومی**

Forough Seydi Avandi¹, Fatemeh Fakharzadeh^{2*}

1. M.A., Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid
Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of
Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received: May 12, 2018 - Accepted: Jul. 02, 2019)

فروغ صیدی اوندی^۱، فاطمه فخرزاده^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه
شهید چمران اهواز، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران
اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۱)

Abstract

Variable toad (*Bufo variabilis*) is a member of the *Bufo viridis* complex in Bufonidae family. Although this species broadly spreads in the western part of Iran, few studies have been carried out on different populations of this species in Iran, especially in Khuzestan province. Totally 59 specimens were collected from Behbahan, Masjed Soleyman and Dehdez from June 2016 to September 2017. Analysis of variance (Anova) confirmed the separation of populations in 11 characters. The results of t-test showed no sexual dimorphism in the studied populations. The results of the discriminant analysis showed that both functions are significant. Scatter plot of canonical functions shows that according to the first function, the specimens of Behbahan are partially separated from specimens of two other regions and according to the second function, specimens of the Masjed Soleyman are clearly separated from specimens of two other regions. Overall, 89.8% of the toads were placed in their expected groups. Karyological studies demonstrate that all samples are diploid and have $2n=22$. These chromosomes are classified into two groups. The first group consists of 6 pairs of large chromosomes and the second group contains 5 pairs of small chromosomes. In all samples of the three mentioned areas, 8 pairs of chromosomes are metacentric and 3 pairs of chromosomes are sub metacentric. Such karyotype pattern has been reported in many species of the genus *Bufo*.

Keywords: *Bufo variabilis*, *B. viridis* complex, Karyotype, Khuzestan province, Morphometry.

چکیده

وزغ متغیر (*Bufo variabilis*) از اعضای کمپلکس وزغ سبز (*Bufo viridis*) است و در خانواده Bufonidae قرار دارد. با وجود این‌که این گونه در نیمه غربی ایران پراکنش وسیع دارد، اما مطالعات اندکی بر روی جمعیت‌های مختلف این گونه در کشور و به‌ویژه در استان خوزستان صورت گرفته است. نمونه‌برداری‌ها در تیرماه ۱۳۹۵ آغاز و در شهریور ماه ۱۳۹۶ به پایان رسید. در مجموع ۵۹ وزغ از مناطق مختلف بهبهان، مسجدسلیمان و دهدز جمع‌آوری شد و مورد مطالعه کروموزومی و ریخت‌سنجی قرار گرفتند. آزمون آنالیز واریانس (Anova) جدایی بین جمعیت‌ها را در ۱۱ صفت تأیید می‌کند. نتایج آزمون t-test نشان داد که دی‌مورفسم جنسی در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود ندارد. نتایج تحلیل ممیزی منجر به استخراج دو تابع معنی‌دار شد. طبق نمودار پراکنش افراد و مرکز گروه‌ها، بر اساس تابع اول نمونه‌های بهبهان تا حدودی از نمونه‌های دو منطقه دیگر جدا می‌شود و بر اساس تابع دوم نمونه‌های مسجد سلیمان تا حدود زیادی از نمونه‌های دو منطقه دیگر جدا می‌شود. در مجموع ۸۹/۸ درصد نمونه‌ها در گروه خود قرار گرفتند. در مطالعه کاربولوجی، همه نمونه‌ها دیپلوئید و $2n=22$ بودند. در همه وزغ‌های مورد مطالعه کروموزوم‌ها در دو گروه قرار می‌گیرند. گروه اول شامل ۶ جفت کروموزوم بزرگ و گروه دوم شامل ۵ جفت کروموزوم کوچک می‌باشند. در همه نمونه‌های سه منطقه یادشده ۸ جفت از کروموزوم‌ها، متاساتریک و ۳ جفت ساب متاساتریک هستند. چنین الگوی کاربوتایی در بسیاری از گونه‌های جنس *Bufo* گزارش شده است.

واژه‌های کلیدی: استان خوزستان، کاربوتایپ، کمپلکس وزغ سبز، مورفومتري، وزغ متغیر.

مقدمه

دوزیستان اجزای اصلی بسیاری از اکوسیستم‌ها هستند. آنها از حشرات و دیگر بندپایان تغذیه می‌کنند لذا در کنترل جمعیت این بی‌مهرگان در طبیعت نقش بسزایی دارند (Baloutch & Kami, 2006). دوزیستان بی‌دم در ایران شامل ۵ خانواده (Pelobatidae, Ranidae, Hylidae, Bufonidae) و (Dicroglossidae) می‌باشند.

خانواده Bufonidae در سراسر جهان به جز ماداگاسکار، استرالیا، گینه نو و جزایر اقیانوسی یافت می‌شود. در این خانواده، کمپلکس وزغ سبز (Bufotes viridis) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا تنها کمپلکس گونه‌ای شناخته‌شده در دوزیستان است که تاکسون‌های 2n, 3n و 4n با تولید مثل دوجنسی دارد. این کمپلکس به‌طور وسیعی در پاله آرکتیک پراکنش دارد و هر سه سطح پلوییدی در آسیای مرکزی وجود دارد. مطالعات سیتوژنتیک و مولکولی در دسترس برای نشان دادن مسیر تکامل و فیلوژنی این گروه اندک می‌باشد (Stöck et al., 2005). Laurenti (1768) برای اولین بار تنوع ریختی وزغ سبز را در ناحیه پاله آرکتیک توصیف کرد. پژوهش‌های انجام‌شده نشان می‌دهد *B. oblongus* که در شرق ایران پراکنش دارد گونه‌ای تتراپلوئید از کمپلکس وزغ سبز است (Stöck et al., 2001a; Stöck et al., 2006; Stöck et al., 2005).

اخیراً Fakharzadeh et al. (2015) موفق به کشف وزغ‌های سبز تریپلوئیدی از رشته کوه کپه داغ در شمال شرقی ایران شدند. آنها به بررسی جامعی در مورد کمپلکس وزغ سبز در نواحی شمال شرقی ایران پرداختند و هر سه سطح پلوئیدی را گزارش کردند. ایشان همچنین به مقایسه دو گونه *B. surdus* و *B. luristanicus* از کمپلکس وزغ سبز پرداختند و با استفاده از مطالعات ریختی، ریخت‌سنجی و کروموزومی نشان دادند که این دو گونه کاملاً از یکدیگر مجزا هستند (Fakharzadeh et al., 2014).

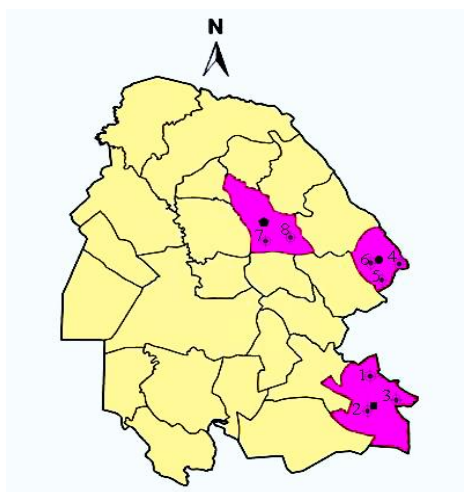
گونه *B. variabilis* از اعضای این کمپلکس گونه‌ای است که در نیمه غربی ایران یا به عبارتی در غرب بیابان‌های مرکزی ایران پراکنش دارد. این گونه قبلاً با نام *B. viridis* از ایران گزارش شده بود (Baloutch & Kami, 1995; Stöck et al., 2001b). اما مطالعات مولکولی نشان دادند که وزغ‌های سبز آسیای مرکزی، خاورمیانه و شمال اورازیا در کلادی جداگانه قرار می‌گیرند و نام *B. variabilis* برای افراد این کلاد در نظر گرفته شد (Stöck et al., 2003). تحقیقات انجام‌شده براساس توالی DNA میتوکندریایی نشان داد که دو تبار از این گونه در ترکیه وجود دارد. اولین تبار در غرب آناتولی پراکنش دارد و تبار دوم در نواحی شرقی ترکیه توزیع یافته است. این تبار دوم در آذربایجان، روسیه، شمال غرب و غرب ایران گسترش یافته است (Özdemir et al., 2007, 2014).

از آنجایی که تاکنون اطلاعات اندکی در مورد جمعیت‌های مختلف این گونه در ایران در دسترس است و بسیاری از جمعیت‌های این گونه در غرب ایران خصوصاً نواحی یادشده در استان خوزستان (بهبهان، مسجدسلیمان و دهدز) تا کنون مورد مطالعه ریخت‌سنجی و کاربوتایی قرار نگرفته‌اند، لذا ما در این تحقیق به بررسی جمعیت‌های مختلف این گونه در مناطق اشاره شده، پرداختیم.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در مطالعه حاضر ۵۹ نمونه *B. variabilis* از شمال شرق و شرق استان خوزستان (دهدز، مسجد سلیمان و بهبهان) جمع‌آوری و به‌صورت زنده به آزمایشگاه انتقال داده شد (شکل ۱). نمونه‌برداری از تیر ماه ۱۳۹۵ تا شهریور ۱۳۹۶ به‌طول انجامید. نمونه‌برداری در شب و با استفاده از نور چراغ‌قوه و با دست انجام شد. جدول ۱ مناطق نمونه‌برداری و تعداد نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در هر منطقه را نشان می‌دهد.



شکل ۱. نقشه استان خوزستان. مسجدسلیمان ● ده‌دز ● بهبهان ■. اعداد ۱ تا ۸ مکان‌های نمونه‌برداری را نشان می‌دهد.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به مناطق نمونه‌برداری

ردیف	آرایه	مکان	تعداد نمونه	طول و عرض جغرافیایی	ارتفاع (متر)
۱	<i>B. variabilis</i>	رود هیگو، ۱۰ کیلومتری شمال بهبهان	۵	۳۰° ۳۶'، ۵۰° ۱۴'	۳۱۲
۲	<i>B. variabilis</i>	پارک قائم، مرکز بهبهان	۴	۳۰° ۳۵'، ۵۰° ۱۵'	۳۲۳
۳	<i>B. variabilis</i>	پارک پردیس، شرق بهبهان	۶	۳۰° ۳۵'، ۵۰° ۱۴'	۳۲۷
۴	<i>B. variabilis</i>	روستای کلمت، ۱۰ کیلومتری شرق ده‌دز	۶	۹° ۴۵'، ۵۰° ۳۱'	۱۲۷۷
۵	<i>B. variabilis</i>	روستای موزرم، ۱۳ کیلومتری جنوب ده‌دز	۸	۳۰° ۳۸'، ۵۰° ۲۰'	۱۳۶۰
۶	<i>B. variabilis</i>	پارک دولت، مرکز ده‌دز	۷	۳۱° ۴۲'، ۵۰° ۱۶'	۱۴۸۱
۷	<i>B. variabilis</i>	منطقه تمبی، ۱۵ کیلومتری جنوب مسجدسلیمان	۱۲	۱۷° ۵۶'، ۴۹° ۳۱'	۲۶۴
۸	<i>B. variabilis</i>	منطقه بی بیان، ۸ کیلومتری جنوب شرقی مسجدسلیمان	۱۱	۱۹° ۵۴'، ۴۹° ۳۱'	۲۸۳

ریخت‌سنجی

در ابتدا با استفاده از صفات ریختی و کلیدهای شناسایی معتبر (Balouch & Kami, 1995) نمونه‌ها شناسایی شدند و مشخص شد که مربوط به گونه *Bufotes variabilis* می‌باشند.

در تمامی وزغ‌های جمع‌آوری شده ۱۷ صفت (جدول ۲) با استفاده از کولیس دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری شدند (Balouch & Kami, 1995; Stock et al., 2001b). جنسیت هر کدام از نمونه‌ها مشخص شدند. در این تحلیل فقط بالغین در نظر گرفته شدند. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS18 استفاده گردید.

کاربولوژی

جهت آماده‌سازی نمونه‌ها از روش Schmid (1978) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۲ تا ۱۶ ساعت قبل از

مرگ جانور محلول کلشی سین ۰/۳ درصد به زیر پوست ناحیه شکمی جانور تزریق می‌شود. سپس مغز استخوان ران آن را خارج و در محلول هیپوتونیک KCl ۰/۰۷۵ مولار قرار داده شد. ۵۰ تا ۵۵ دقیقه بعد سانتریفیوژ کرده و مایع بالای لوله را ریخته و دو مرتبه با ۵cc محلول فیکساتیو (مخلوط استیک اسید و متانول با نسبت ۳:۱) مخلوط و سانتریفیوژ را انجام داده و در مرتبه سوم ۱cc فیکساتیو اضافه و روی لام‌های سرد و تمیز ریخته شد. در آخر لام‌ها با گیمسای ۴ درصد رنگ‌آمیزی شدند. برای مشاهده کروموزوم‌ها از میکروسکوپ Olympus و برای عکسبرداری از دوربین DinoCapture 2.00 استفاده گردید. به‌منظور دسته‌بندی کروموزوم‌ها از روش Levan et al. (1964) استفاده شد و برای اندازه‌گیری مورفومتری هر کروموزوم از نرم‌افزار Nuc type v 1.5 استفاده شد (Yu et al., 2008).

نتایج

مورفومتری

تمامی نمونه‌ها از نظر ریختی مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که متعلق به گونه *B. variabilis* هستند.

آمار تک متغیره

بر اساس جدول ۳، در ۱۱ صفت (ESD, HL, NED, LMT, LFT, THL, ED, UEW, UED, IND)

(PL) تفاوت بین گروه‌ها معنی‌دار است ($P < 0.05$)، لذا بر اساس آزمون آنالیز واریانس (*Anova*) جدایی بین جمعیت‌ها در بسیاری از صفات مشاهده می‌شود. نتایج آزمون مقایسه میانگین‌ها (*t-test*)، نشان داد که در صفات مورد بررسی هیچ تفاوتی بین نمونه‌های نر و ماده یافت نشد ($P < 0.05$)، لذا دو ریختی جنسی در نمونه‌های این مناطق وجود ندارد (جدول ۴).

جدول ۲. صفات ریخت‌سنجی مورد اندازه‌گیری به همراه توضیحات و علائم اختصاری صفات

ردیف	نام صفت	توضیح	علامت اختصاری
۱	طول بدن	از شکاف کلوآک تا نوک پوزه	SVL
۲	طول ران	اندازه ران از مرکز شکاف کلوآک تا بخش انتهایی ران	THL
۳	طول ساق	اندازه ساق	TL
۴	طول مچ	اندازه مچ	TAL
۵	طول سر	اندازه سر از نوک پوزه تا قسمت خلفی پرده صماخ	HL
۶	فاصله پوزه تا چشم	از نوک پوزه تا لبه جلویی چشم	ESD
۷	فاصله پلک‌ها	کمترین فاصله	UED
۸	عرض پلک فوقانی	عرض پلک‌های بالایی	UEW
۹	قطر افقی چشم	فاصله گوشه عقبی چشم تا جلوی چشم	ED
۱۰	اندازه پرده صماخ	قطر پرده صماخ	DT
۱۱	طول پا	از برآمدگی داخلی پا تا نوک بزرگترین انگشت	FL
۱۲	طول اولین انگشت پا	از بخش انتهایی برآمدگی داخلی تا انتهای اولین انگشت اندام‌های عقبی	LFT
۱۳	طول برجستگی داخلی پا	بیشترین اندازه برآمدگی داخلی پا	LMT
۱۴	طول غده پاروتوئید	طول غده	PL
۱۵	عرض غده پاروتوئید	عرض غده	PW
۱۶	فاصله چشم تا نوستریل‌ها	فاصله گوشه جلویی چشم تا نوستریل‌ها	NED
۱۷	فاصله نوستریل‌ها	فاصله بین سوراخ‌های بینی	IND

جدول ۳. نتایج حاصل از داده‌های آمار توصیفی (میلی‌متر)

P	مسجد سلیمان (۲۳ نمونه) بیشینه/کمینه	میانگین ± انحراف معیار	بیشینه/کمینه	دهدز (۲۱ عدد)		بهبهان (۱۵ عدد) میانگین ± انحراف معیار	صفات
				میانگین ± انحراف معیار	بیشینه/کمینه		
.302	65.32-71.88	68.60±7.58	69.54-76.62	73.08±7.80	68.52-74.64	71 ± 5.36	SVL
.037	4.37-5.24	4.80±1.00	4.71-5.60	5.15±.97	5.87-6.56	6.21 ± .62	NED
.003	19.53-22.01	20.77±2.86	20.05-21.50	20.78±1.59	19.97-21.43	20.7 ± 1.31	HL
.000	7.84-9.43	8.64±1.84	8.93-10.85	9.89±2.11	8.08-8.69	8.39 ± .55	ESD
.012	3.98-4.55	4.27±.64	3.79-4.06	3.93±.29	4.68-5.38	5.03 ± .63	IND
.005	4.59-5.60	6.38±.86	5.98-6.77	6.38±.86	5.34-5.79	5.57 ± .40	UED
.001	4.80-5.56	5.18±.88	5.88-6.31	6.10±.47	6.03-6.69	6.36 ± .59	UEW
.000	6.34-7.04	6.69±.80	6.31-7.47	6.89±1.27	6.79-7.45	7.12 ± .59	ED
.054	3.52-4.11	3.81±.69	3.68-4.18	3.93±.54	3.89-4.36	4.12 ± .42	DT
.241	22.23-26.41	24.32±4.83	22.81-25.23	24.02±2.65	21.83-24.72	23.28 ± 2.61	THL
.180	23.20-27.90	25.55±5.43	24.22-26.35	25.29±2.34	27.06-30.62	28.84 ± 3.21	TL
.106	25.59-31.48	13.46±2.46	13.33-14.15	13.74±.90	11.72-13.00	12.36 ± 1.15	TAL
.000	4.12-5.91	28.54±6.81	26.39-19.17	27.78±3.05	28.12-31.00	29.56 ± 2.59	FL
.005	3.74-4.14	5.02±2.07	4.46-5.64	5.20±.96	3.60-3.92	3.76 ± .28	LFT
.016	13.79-14.91	3.94.45	4.14-4.93	4.54±.87	3.84-4.24	4.04 ± .36	LMT
.250	6.40-7.43	14.35±1.28	14.55-16.29	15.42±1.91	14.75-18.13	16.44 ± 3.04	PL
		6.92±1.18	7.05-8.14	7.60±1.19	7.80-9.43	8.62 ± 1.47	PW

توضیحات: SVL طول بدن، NED فاصله چشم تا نوستریل‌ها، HL طول سر، ESD فاصله پوزه تا چشم، IND فاصله نوستریل‌ها، UED فاصله پلک‌ها، UEW عرض پلک فوقانی، ED قطر افقی چشم، DT اندازه پرده صماخ، THL طول ران، TL طول ساق، TAL طول مچ، FL طول پا، LFT طول اولین انگشت پا، LMT طول برجستگی داخلی پا، PL طول غده پاروتوئید، PW عرض غده پاروتوئید.

جدول ۴. نتایج آزمون t-test

صفات	سطح معنی‌داری (Sig)	درجه آزادی (df)	Sig (2Tailed)
SVL	0.269	56.595	0.690
HL	0.170	56.779	0.223
ESD	0.662	56.957	0.313
IND	0.617	55.448	0.462
UED	0.151	55.088	0.980
UEW	0.383	51.390	0.841
ED	0.077	55.038	0.681
DT	0.178	56.524	0.811
THL	0.725	56.674	0.780
TL	0.785	55.983	0.532
TAL	0.904	56.995	0.796
FL	0.941	50.448	0.886
LFT	0.133	56.998	0.487
LMT	0.324	56.392	0.545
PL	0.371	56.265	0.910
PW	0.457	55.265	0.852
NED	0.478	54.452	0.860

آمار چند متغیره

تحلیل ممیزی

این تحلیل مورد استفاده قرار می‌گیرد تا توابعی را توصیف کند که احتمال رده‌بندی صحیح نمونه‌ها در جمعیت اصلی‌شان را به حداکثر برساند. نتایج حاصل از تحلیل ممیزی منجر به استخراج دو تابع معنی‌دار شد. مؤلفه اول ۷۴/۹ درصد و مؤلفه دوم ۲۵/۱ درصد از تغییرات را توجیح کردند، که هر دو تابع معنی‌دار است (جدول ۵). همچنین طبق جدول Wilks' Lambda هر دو تابع معنی‌دار (Sig=00) است (جدول ۶).

طبق نمودار پراکنش افراد و مرکز گروه‌ها (شکل ۲)، بر اساس تابع اول نمونه‌های بهبهان تا حدودی از نمونه‌های دو منطقه دیگر (دهدز و مسجد سلیمان) جدا می‌شود و بر اساس تابع دوم نمونه‌های مسجد سلیمان تا حدود زیادی از نمونه‌های دو منطقه دیگر (بهبهان و دهدز) جدا می‌شود. از ۲۱ نمونه دهدز تعداد ۱۸ نمونه در گروه خود قرار گرفته و بقیه در گروه مسجد سلیمان قرار می‌گیرند. از ۲۳ نمونه مسجد سلیمان ۲۰ نمونه در گروه خود قرار گرفتند و از بین ۱۵ نمونه بهبهان همه نمونه‌ها در گروه خود قرار گرفتند. به‌طور کلی ۸۹/۸ درصد نمونه‌ها در گروه خود قرار گرفتند (جدول ۷).

جدول ۵. نتایج تحلیل ممیزی

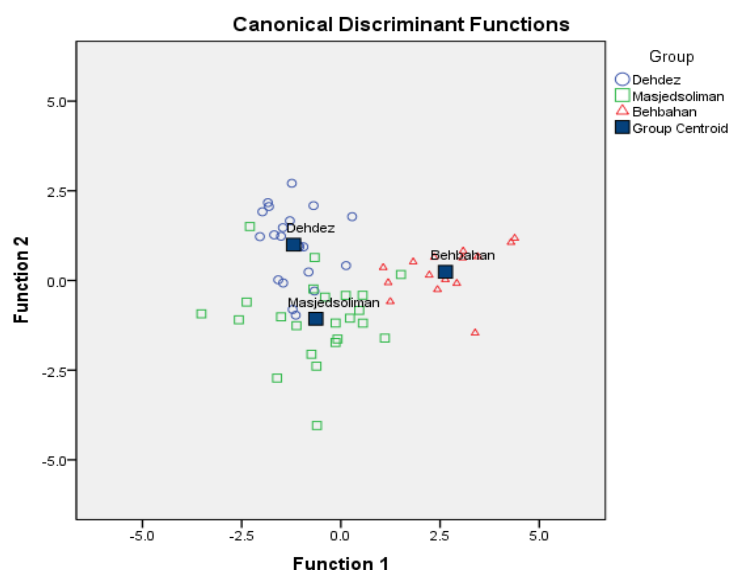
تابع	مقدار ویژه	واریانس (%)	تجمعی (%)	همبستگی استاندارد
1	2.557	74.9	74.9	0.848
2	0.858	25.1	100.0	0.679

کاربولوژی

در این مطالعه به بررسی کاربوتایپ نمونه‌های *B. variabilis* سه منطقه دهدز، مسجد سلیمان و بهبهان در شرق و شمال شرقی استان خوزستان پرداخته شد. نتایج نشان می‌دهد که همه وزغ‌ها دیپلوئید و $2n=22$ کروموزوم دارند (شکل ۳).

جدول ۶. نتایج ویلکس لامبدا (Wilks' Lambda)

معنا داری	درجه آزادی	کای اسکور	ویلکس لامبدا	آزمون توابع
0.000	10	101.969	0.151	1 through 2
0.000	4	33.444	0.538	2

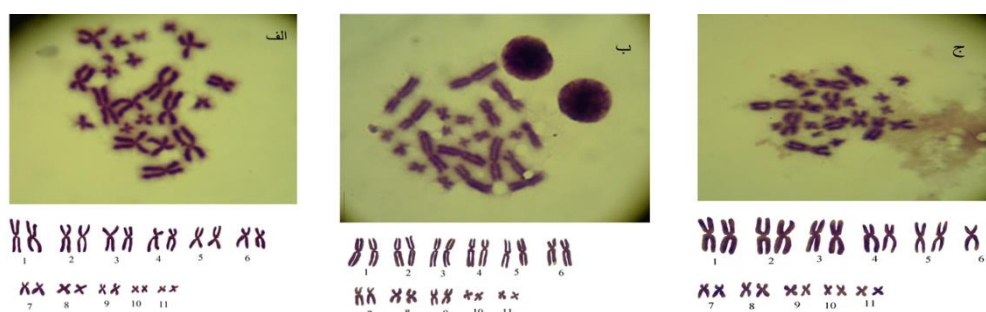


شکل ۲. نمودار پراکنش افراد و مرکز گروه‌ها

جدول ۷. نتایج دسته‌بندی نمونه‌ها

کل	بهبهان	مسجدسلیمان	دهدز	گروه‌ها	
21	0	3	18	دهدز	
23	1	20	2	مسجدسلیمان	تعداد
15	15	0	0	بهبهان	
100.0	0	14.3	85.7	دهدز	
100.0	4.3	87.0	8.7	مسجدسلیمان	%
100.0	100.0	0	0	بهبهان	

۸/۸۹٪ نمونه‌ها به درستی در گروه خود دسته‌بندی شده‌اند.



شکل ۳. کاریوتایپ *B. variabilis*. الف) مسجدسلیمان، ب) بهبهان، ج) دهدز

متاساتریک (جفت‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱) و ۳ و جفت کروموزوم‌ها ساب متاساتریک (جفت‌های ۴، ۶ و ۷) هستند. داده‌های مورفومتری کروموزوم‌ها در جدول‌های ۸، ۹ و ۱۰ نشان داده شده است. نتایج حاصل در قالب ایدیوگرام در شکل ۴ نشان داده شده است.

در همه وزغ‌های مورد مطالعه کروموزوم‌ها در دو گروه قرار می‌گیرند. گروه اول شامل ۶ جفت کروموزوم بزرگ و گروه دوم شامل ۵ جفت کروموزوم کوچک می‌باشد. همچنین تحلیل‌ها نشان داد که در همه نمونه‌های سه منطقه یادشده ۸ جفت از کروموزوم‌ها

جدول ۸. داده‌های مورفومتریک کروموزم‌های *B. variabilis* بهبهان

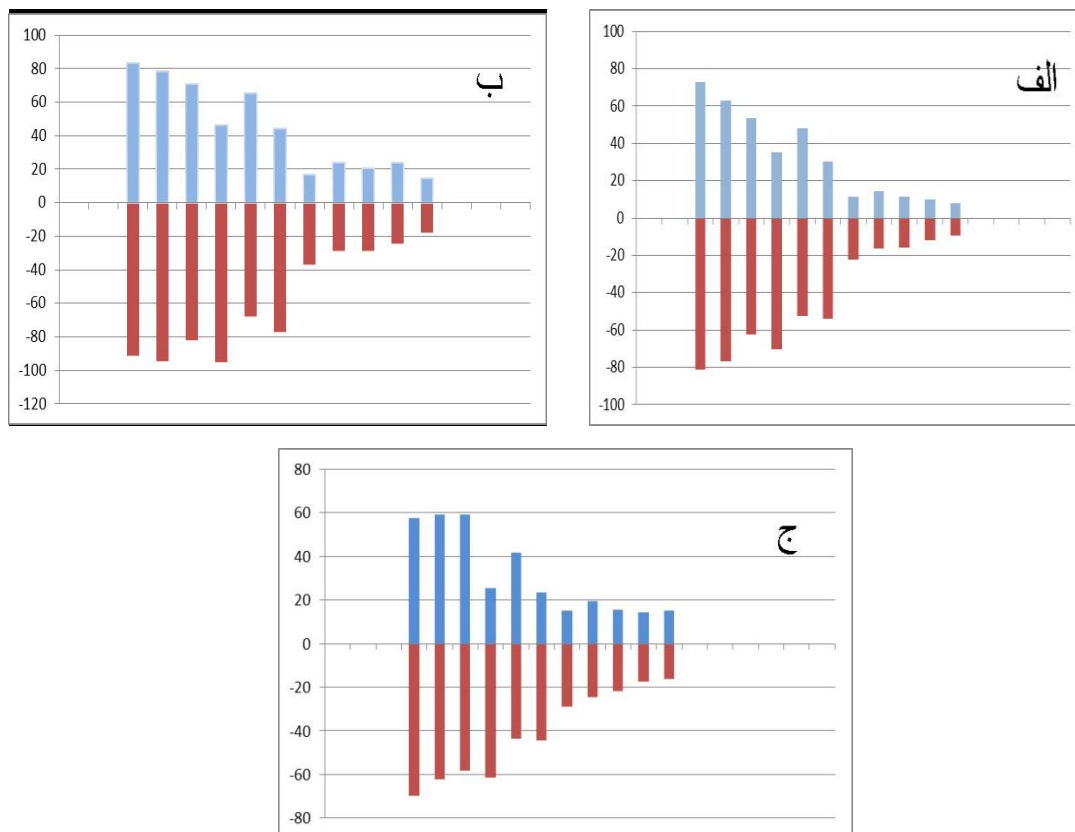
شماره کروموزوم	طول بازوی بلند (q)	طول بازوی کوتاه (p)	طول کل (p+q)	نسبت بازوها (q/p)	نوع کروموزوم
۱	۹۱,۶۹	۸۳,۱۹	۱۷۴,۸۸	۱,۱۱	متاسنتریک
۲	۹۴,۹۱	۷۸,۱۳	۱۷۳,۰۴	۱,۲۱	متاسنتریک
۳	۸۲,۶۳	۷۰,۴۹	۱۵۳,۱۲	۱,۱۷	متاسنتریک
۴	۹۵,۳۹	۴۶,۰۳	۱۴۱,۴۲	۲,۰۷	ساب متاسنتریک
۵	۶۸,۴۱	۶۵,۳۸	۱۳۳,۷۹	۱,۰۲	متاسنتریک
۶	۷۷,۴۵	۴۳,۷۱	۱۲۱,۰۲	۱,۷۹	ساب متاسنتریک
۷	۳۷,۴۷	۱۶,۸۶	۵۴,۳۳	۲,۲۲	ساب متاسنتریک
۸	۲۹,۳۹	۲۳,۸۹	۵۲,۴۷	۱,۳۱	متاسنتریک
۹	۲۹,۳۵	۲۰,۳۶	۴۹,۳۲	۱,۴۵	متاسنتریک
۱۰	۲۴,۹۰	۲۳,۹۷	۴۷,۵۶	۱,۰۴	متاسنتریک
۱۱	۱۸,۳۲	۱۴,۵۷	۳۳,۵۵	۱,۲۱	متاسنتریک

جدول ۹. داده‌های مورفومتریک کروموزم‌های *B. variabilis* دهدز

شماره کروموزوم	طول بازوی بلند (q)	طول بازوی کوتاه (p)	طول کل (q+p)	نسبت بازوها (q/p)	نوع کروموزوم
۱	۶۹,۵۵	۵۷,۶۱	۱۲۷,۱۶	۱,۲۰	متاسنتریک
۲	۶۲,۳۸	۵۹,۰۲	۱۲۱,۴۱	۱,۰۵	متاسنتریک
۳	۵۸,۳۲	۵۹,۰۱	۱۱۵,۲۱	۱,۰۲	متاسنتریک
۴	۶۱,۵۹	۲۵,۵۵	۸۷,۱۴	۲,۴۱	ساب متاسنتریک
۵	۴۳,۷۲	۴۱,۵۲	۸۵,۲۴	۱,۰۵	متاسنتریک
۶	۴۴,۳۶	۲۳,۳۰	۶۷,۲۱	۱,۹۱	ساب متاسنتریک
۷	۲۸,۸۲	۱۵,۲۰	۴۴,۰۲	۱,۸۹	ساب متاسنتریک
۸	۲۴,۵۳	۱۹,۲۳	۴۳,۷۶	۱,۲۷	متاسنتریک
۹	۲۱,۷۰	۱۵,۳۲	۳۷,۰۳	۱,۴۱	متاسنتریک
۱۰	۱۷,۶۲	۱۴,۰۹	۳۱,۷۱	۱,۲۵	متاسنتریک
۱۱	۱۶,۱۵	۱۴,۹۴	۳۱,۰۹	۱,۰۸	متاسنتریک

جدول ۱۰. داده‌های مورفومتریک کروموزم‌های *B. variabilis* مسجدسلیمان

شماره کروموزوم	طول بازوی بلند (q)	طول بازوی کوتاه (p)	طول کل (q+p)	نسبت بازوها (q/p)	نوع کروموزوم
۱	۸۱,۰۶	۷۲,۸۶	۱۵۳,۹۲	۱,۱۱	متاسنتریک
۲	۷۶,۵۵	۶۲,۷۶	۱۳۹,۳۱	۱,۳	متاسنتریک
۳	۶۲,۵۱	۵۳,۶۵	۱۱۶,۱۶	۱,۱۶	متاسنتریک
۴	۷۰,۳۳	۳۴,۹۹	۱۰۵,۳۲	۲,۰۱	ساب متاسنتریک
۵	۵۲,۷۲	۴۸,۲۰	۱۰۰,۹۲	۱,۰۹	متاسنتریک
۶	۵۳,۷۶	۳۰,۲۹	۸۴,۰۵	۱,۸۱	ساب متاسنتریک
۷	۲۲,۴۹	۱۱,۱۸	۳۳,۶۷	۲,۰۱	ساب متاسنتریک
۸	۱۶,۴۴	۱۴,۴۸	۳۰,۹۲	۱,۱۳	متاسنتریک
۹	۱۵,۶۱	۱۱,۵۴	۲۷,۱۵	۱,۳۵	متاسنتریک
۱۰	۱۱,۸۹	۱۰	۲۱,۸۹	۱,۱۸	متاسنتریک
۱۱	۹,۶۲	۸	۱۷,۶۲	۱,۲	متاسنتریک



شکل ۴. ایدیوگرام *B. variabilis* در مناطق مورد مطالعه. الف) بهبهان، ب) مسجدسلیمان، ج) دهدز

Hezaveh *et al.*, (2001) Fakharzadeh *et al.* (2008) و Najibzadeh *et al.* (2001). Hashemynejad *et al.* (2010) براساس تحلیل‌های آماری تک‌متغیره و چند متغیره نشان می‌دهند که در بین جمعیت‌های مختلف وزغ‌های سبز استان مازندران تفاوت معناداری در کلیه صفات وجود دارد. ایشان وزغ‌های استان مازندران را *B. variabilis* شناسایی کرده‌اند. اگرچه وزغ‌های شمال ایران از نظر ریختی شباهت زیادی با وزغ متغیر دارد اما مطالعات مولکولی براساس داده‌های ژن میتوکندریایی D-loop نشان می‌دهد که وزغ‌های سبز نواحی شمال، شمال شرق و شرق ایران گونه وزغ تورانی (*B. turanensis*) است (Stock *et al.*, 2006). در مطالعه حاضر بین دو جنس نر و ماده در هیچ‌کدام از صفات مورد مطالعه تفاوت معناداری مشاهده نشد، در نتیجه دی‌مورفیسم جنسی وجود ندارد. نتایج مطالعات بیومتری انجام گرفته بر روی وزغ‌های استان لرستان نیز مؤید این

بحث و نتیجه‌گیری

دوزیستان بی‌دم جانورانی هستند که باوجود اهمیت آنها، مطالعات سیستماتیک و بررسی تنوع آنها هنوز نیازمند تحقیقات بیشتری است. در این مطالعه، ۵۹ نمونه وزغ *Bufo variabilis* از ایستگاه‌های مختلف در سه منطقه بهبهان، مسجدسلیمان و دهدز در استان خوزستان جمع‌آوری شد و مطالعات ریخت‌سنجی و کاربولوژیکی روی آنها انجام گرفت.

مورفومتری

چنانچه بیان شد گزارش‌های اندکی از مطالعه ریخت‌سنجی اعضای کمپلکس وزغ سبز وجود دارد. در مجموع تحلیل‌های آماری انجام‌شده (تک‌متغیره و چند متغیره) جدایی بین جمعیت‌های سه منطقه مورد مطالعه را تا حدودی تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که نمونه‌های هر سه منطقه در بیشتر صفات با هم تفاوت دارند. این یافته‌ها با پژوهش‌های قبلی مطابقت دارد (نظیر

فیروزآباد، اهواز و چغازنبیل انجام گرفته دو جفت از کروموزوم‌ها (چهارمین و هفتمین و در یک مورد چهارمین و نهمین) ساب متاسانتریک بودند (Fakharzadeh et al., 2014)، که با نتایج این تحقیق اندکی متفاوت است. در هیچ کدام از وزغ‌های جمع‌آوری شده، کروموزوم‌های جنسی هترومورف یافت نشد. به همومورفی کروموزوم‌های جنسی در بسیاری از مقاله‌های نوشته شده در مورد دوزیستان بی‌دم اشاره شده است (Cavallo et al., 2002; Borkin et al., 2007; Shanthi et al., 2010; Fakharzadeh et al., 2009; Stock et al., 2011; Stock et al., 2013).

در مجموع بر اساس داده‌های ریخت‌سنجی تنوع قابل ملاحظه‌ای در جمعیت‌های مختلف گونه *B. variabilis* چه در مطالعه حاضر و چه در سایر تحقیقات انجام شده در ایران مشاهده می‌شود. همچنین با توجه به نتایج ما و نیز تحقیقات دیگر انجام شده، دی‌مورفیسم جنسی به‌ندرت در جمعیت‌های مختلف این گونه در ایران یافت می‌شود.

چنانچه اشاره شد این گونه در تمامی نیمه‌غربی ایران پراکنش دارد اما مطالعات کروموزومی بر روی این گونه تنها به جمعیت‌های چند استان محدود می‌شود. در مجموع نتایج کاریوتاییپی ما و نیز سایر نتایج اشاره شده در مطالعات دیگر تنوع کاریوتاییپی محدودی را از نظر تعداد کروموزوم‌های ساب متاسنتریک نشان می‌دهد که برخی جمعیت‌ها دو کروموزوم و برخی دیگر سه کروموزوم ساب متاسنتریک دارند.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر علیرضا البرزی عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که در مرحله عکس‌برداری از لام‌ها همکاری فراوان داشتند، همچنین از زحمات آقای حجت پورجعفری که در نمونه‌برداری‌ها مساعدت‌های فراوان داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

مطلب است (Najibzadeh et al., 2011). Hezaveh et al. (2008) نیز اشاره می‌کنند که وزغ‌های استان مرکزی تنها در یکی از صفات ریخت‌سنجی مورد مطالعه دی‌مورفیسم جنسی دارند. نتایج حاصل از مطالعه وزغ‌های شمال و شرق خراسان بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها (t-test) نشان داد که بین دو جنس نر و ماده تفاوت معناداری وجود نداشته است (Fakharzadeh et al., 2001)، که این برخلاف نتایج Nehmati (1988) است. نتایج حاصل از تحلیل چند متغیره نشان می‌دهد که ۸۹/۷ درصد نمونه‌ها در گروه خود جای گرفته‌اند که با نتایج حاصل از Hezaveh et al. (2008) همخوانی دارد.

کاریوتاییپی

در این تحقیق همگی وزغ‌های جمع‌آوری شده دیپلوئیدی و $2n=22$ کروموزوم دارند. هیچ وزغ پلوئیدی در نمونه‌های مورد مطالعه یافت نشد. همه کاریوتایپ‌ها ۶ جفت کروموزوم بزرگ و ۵ جفت کروموزوم کوچک دارند که متاسنتریک یا ساب متاسنتریک هستند. چنین الگوی کاریوتاییپی در بسیاری از گونه‌های جنس *Bufo* (سابقاً با نام *Bufo*) گزارش شده است (Volpe & Gerhardt, 1968; Doyle & Beckert, 1970; Bogart, 1972; Azevedo et al., 2003; Al-Shehri & Al-Saleh, 2008; Borkin et al., 2007; Fakharzaeh et al., 2014, 2015).

همچنین تفاوت محسوسی در نوع کروموزوم‌های (متاسنتریک و یا ساب متاسنتریک) هر سه منطقه مشاهده نشد. به‌طوری‌که در وزغ‌های هر سه منطقه دهدز، مسجدسلیمان و بهبهان چهارمین، ششمین و هفتمین جفت‌های کروموزومی ساب متاسنتریک و بقیه کروموزوم‌ها متاسنتریک هستند که با نتایج Fakharzadeh et al. (2008) و نیز et al. (2015) مطابقت دارد. در پژوهشی که بر روی جمعیت‌های *B. variabilis* مناطق شیراز، مهکویه

REFERENCES

- Al shehri, A. H.; Al Saleh, A. A.; (2008). Karyotype of amphibians in Saudi: The karyotype of *Bufo regularis*; Asian J. Cell. Biol.; 2: 67-71.
- Azevedo, M. F. C.; Forest, F.; Ramos, P. R.; Jim, J.; (2003). Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. *Gent Mol. Biol*; 26: 289-294.
- Baloutch, M.; Kami, H. G.; (2006). Amphibian of Iran. Tehran University Press, Tehran, pp: 177.
- Bogart, J. P.; (1972). Karyotypes. In Blair W. F. (Ed.), *Evolution in the Genus Bufo*. Austin: University of Texas Press, 171-195.
- Borkin, L. J.; Shabanov, D. A.; Brandler, O. V.; Kukushkin, O. V.; Litvinchuk, S. N.; Mazepa, G. A.; Rozanov, J. M.; (2007). A case of natural triploidy in European diploid green toad (*Bufo viridis*), with some distributional records of diploid and tetraploid toads. *Russ J Herpetol.*; 14(2): 121-132.
- Cavallo, D.; Devita, R.; Eleuteri, P.; Borkin, L.; Emechenko, V.; Odiema, G.; Balletto, E.; (2002). Karyological and flow cytometric evidence of triploid specimens in *Bufo viridis* (Amphibia Anura). *Eur J Histochem.*; 16: 159-164.
- Doyle, B. W.; Beckert, W. H.; (1970). Chromosome characteristics of bufonidae among species and within populations. *Caryologia*; 23: 145-154.
- Fakharzadeh, F.; Ghasemzadeh, F.; Kami, H. G.; (2001). Biosystematic study of two Anuran species from North and East Khorasan province, (3): 38-47. (In Persian)
- Fakharzadeh, F.; Darvish, J.; Ghasemzadeh, F.; Kami, H. G.; (2009). Anuran karyological study of Khorasan province. *Asian Journal of Biological Science*; 2(3): 6-73.
- Fakharzadeh, F.; Darvish, J.; Kami, H. G.; Ghasemzadeh, F.; Rastegar-Pouyania, E.; (2014). New karyological and morphometric data on poorly known *B. surdus* and *B. luristanicus* in comparison with data of diploid green toad of *B. viridis* complex from south if Iran. *Asiatic Herpetological Research*; 5(3): 168-178.
- Fakharzadeh, F.; Darvish, J.; Kami, H. G.; Ghasemzadeh, F.; Rastegar-Pouyani, E.; Stöck, M.; (2015). Discovery of triploidy in Palearctic green toads (*Anura: Bufonidae*) from Iran with indications for a reproductive system involving diploids and triploids. *Zool. Anz.*; 255: 25-31.
- Hezaveh, N.; Ghasemzadeh, F.; Darvish, J.; (2008). Biosystematic study (morphology, karyology and morphometry) of anuran amphibian in Markazy Province. *Iranian Journal of Biology*; 20(4): 458-467. (In Persian)
- Hashemynejad, R.; (2010). Anuran Biosystematic study of Mazandaran Province and survey the ecological condition of their habitat. Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A. A.; (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*; 52: 201-220.
- Najibzadeh, M.; (2011). Anuran Biosystematic study of Lurestan province. Ferdowsi University of Mashhad.
- Nehmati, A.; (1998). Recognition of Khorasan Anurian. Ferdowsi University of Mashhad. pp: 177.
- Özdemir, N.; Kutrup, B.; (2007). Intraspecific variation of Turkish green toads, *Bufo (Pseudepidalea) viridis* Laurenti, 1768, based on 16S ribosomal RNA sequences. *Herpetozoa*; 20: 3-10.
- Özdemir, N.; Gül, N. A.; Poyarkov, J. R.; Kutrup, B.; Tosunođlu, M.; Doglio, S.; (2014). Molecular systematics and phylogeography of *Bufotes variabilis* (syn. *Pseudepidalea variabilis*) (Pallas,

- 1769) in Turkey. Turk. J. Zool.; 38: 412-42.
- Schmid, M.; (1978). Chromosome Banding in Amphibia .Chromosoma; (Berl). 66: 361-388.
- Shanthi, P. A.; Singh, P.; Barh, D.; Venkatachalaiah, G.; (2010). Comparative karyology based systematics of *Euphlyctis hexadactylus* and *Euphlyctis cyanophlyctis*. International Journal of Integrative Biology.; 9 (1): 6-9.
- Siripivasing, P.; Chulalaksananukul, W.; Pariyanonth, P.; Kaewsri, S.; Sittigul, S.; Seatung, N.; and Tanomtong, A.; (2008). The identification of the sex chromosome and karyotype of four toad species (genus *Bufo*) in Thailand by T-lymphocyte cell culture, Cytologia; 73(3), 229- 241.
- Stöck, M.; Günther, R.; Böhme, W.; (2001a). Progress towards a Taxonomic revision of the Asian *Bufo viridis* group. Current status of nominal taxa and unsolved problems (Amphibia Anura: Bufonidae). Zool Abh Staatl Mus Tierkunde Dresden.; 51: 253-319.
- Stöck, M.; Frynta, D.; Grosse, W. R.; Steinlein, C.; Schmid, M.; (2001b). A review of the distribution of diploid, triploid and tetraploid green toads (*Bufo viridis* complex) in Asia including new data from Iran and Pakistan. Asiatic Herp Res.; 9: 77-100.
- Stöck, M.; Steinlein, C.; Lamatsch, DK.; Schartl, M.; Schmid, M.; (2005). Multiple origins of tetraploid taxa in the Eurasian *Bufo viridis* subgroup. Genetica.; 124:255-272.
- Stöck, M.; Moritz, C.; Hickerson, M.; Frynta, D.; Dujsebayaeva, T.; Eremchenko, V.; Macey, J. R.; Papenfuss, T. J.; Wake, D. B.; (2006). Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. Mol Phyl Evol.; 41: 663-689.
- Stöck, M.; Croll, D.; Dumas, Z.; Biollay, S.; Wang, J.; Perrin, N.; (2011). A cryptic heterogametic transition revealed by sex-linked DNA markers in Palearctic green toads. J. Evol. Biol.; 24: 1064-1070.
- Stöck, M.; Savary, R.; Betto-Colliard, C.; Biollay, S.; Jourdan-Pineau, H.; Perrin, N.; (2013). Low rates of X–Y recombination not turnovers account for homomorphic sex chromosomes in several diploid species of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). J. Evol. Biol.; 26: 674-682.
- Volpe, E P.; Gerhardt, B. M.; (1968). Somatic chromosomes of the marine toad *Bufo marinus* (Linne). Copeia.; 3570-576.