Summer (2024) 13(49): 1-12
DOI: 10.30473/eab.2024.69531.1927
Received: 22 Oct 2023 Accepted: 1 Sep 2024

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Cytogenetic study of two species *Pelophylax ridibundus* and *Bufotes viridis* of Anura in areas of Khuzestan province

Fatemeh Fakharzadeh[1]*, Somayeh Horobi[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Correspondence
Fatemeh Fakharzadeh
Email: f.fakharzadeh@scu.ac.ir

How to cite
Fakharzadeh, F., & Horobi, S. (2024). Cytogenetic study of two species *Pelophylax ridibundus* and *Bufotes viridis* of Anura in areas of Khuzestan province. *Experimental Animal Biology*, *13*(49), 1-12.

ABSTRACT

Two species, green toad (*Bufotes viridis*) from true toads (Bufonidae) family and Marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) from true frogs (Ranidae) family have the most distribution in Khuzestan province. These species have many taxonomic problems and the chromosomal studies have been done in the country are few. In the field studies, 28 samples of anura including 17 green toads and11marsh frogs were collected from northwest and south of Khuzestan province (Shush, Khorramshahr and Hendijan). Sampling was done between the summer of 2018 and the summer of 2019. Chromosome studies showed all green toads have 22n=22 chromosomes that were classified into two groups. The first group included 6pairs of large chromosomes and the second group composed of 5pairs of small chromosomes. In the toads of all three studied regions, the fourth and seventh pairs of chromosomes were submetacentric and the rest chromosomes were metacentric. Results showed all collected marsh frogs have 2n=26 chromosomes, which were divided into two groups. The first group included 5pairs of large chromosomes and the second group had 8 pairs of small chromosomes. The karyotype formula of the frogs of the three sampling areas are not the same. The karyotype formula of Khorramshahr, Shush and Hendijan frogs are 8m+1sm+4st, 7m+3sm+3st and 6m+6sm+1st, respectively. Sex heteromorphic chromosomes were not observed in any of the collected samples. Current study on marsh frogs and its comparison with other investigations shows a significant diversity in terms of karyotype in the country, which strengthens the possibility of the existence of a species complex.

KEYWORDS

Anura, Bufotes viridis, Karyotype, Khuzestan, *Pelophylax rdibundus*.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

سال سیزدهم، شماره اول، پیاپی چهل و نهم، تابستان ۱۴۰۳ (۱-۱۲)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۱
DOI: 10.30473/eab.2024.69531.1927

نشریه علمی
زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

مطالعه سیتوژنتیکی دو گونه *Pelophylax ridibundus* و *Bufotes viridis* از دوزیستان بی‌دم در مناطقی از استان خوزستان

فاطمه فخارزاده[1*]، سمیه حروبی[1]

[1]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

دو گونه وزغ سبز (*Bufotes viridis*) از خانواده وزغ‌های حقیقی (Bufonidae) و قورباغه مردابی (*Pelophylax ridibundus*) از خانواده قورباغه‌های حقیقی (Ranidae) بیش‌ترین پراکنش را در استان خوزستان دارند. این دو گونه مشکلات آرایه‌شناختی فراوانی دارند و مطالعات کروموزومی که تاکنون در کشور برروی آن‌ها انجام گرفته است، اندک می‌باشد. در مطالعات میدانی تعداد ۲۸ دوزیست بی‌دم شامل ۱۷ عدد وزغ سبز و ۱۱ عدد قورباغه مردابی از شمال‌غرب و جنوب استان خوزستان (شوش، خرمشهر و هندیجان) جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری در بازه زمانی تابستان ۱۳۹۸ تا تابستان ۱۳۹۹ انجام شد. مطالعات کروموزومی نشان داد که همگی وزغ‌های سبز جمع‌آوری شده از سه منطقه موردمطالعه ۲n=۲۲ کروموزوم دارندکه در دو گروه دسته‌بندی شدند. اولین گروه شامل شش جفت کروموزوم بزرگ و دومین گروه شامل پنج جفت کروموزوم کوچک بودند. در وزغ‌های هر سه منطقه موردمطالعه جفت چهارم و هفتم کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک و بقیه آن‌ها متاسانتریک بودند. نتایج نشان داد که همه قورباغه‌های مردابی صیدشده ۲n=۲۶ کروموزوم دارند که در دو گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل پنج جفت کروموزوم بزرگ و گروه دوم شامل هشت جفت کروموزوم کوچک بودند. فرمول کاریوتایپی قورباغه‌های سه منطقه نمونه‌برداری با یکدیگر یکسان نیستند. فرمول کاریوتایپی قورباغه‌های خرمشهر، شوش و هندیجان به‌ترتیب 8m+1sm +4st، 7m+3sm+3st و6m+6sm+1st می‌باشند. در هیچ‌کدام از دوزیستان بی‌دم صیدشده کروموزوم‌های هترومورف جنسی مشاهده نشد. مطالعه حاضر در مورد قورباغه‌های مردابی و مقایسه آن با پژوهش‌های دیگر در ایران تنوع قابل‌توجهی را از نظر کاریوتایپی در کشور نشان می‌دهدکه احتمال وجود کمپلکس گونه‌ای را قوت می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی

خوزستان، دوزیستان‌بی‌دم، قورباغه‌مردابی، کاریوتایپ، وزغ‌سبز.

نویسنده مسئول:
فاطمه فخارزاده
رایانامه: f.fakharzadeh@scu.ac.ir

استناد به این مقاله:
فخارزاده، فاطمه و حروبی، سمیه (۱۴۰۳). مطالعه سیتوژنتیکی دو گونه *Pelophylax ridibundus* و *Bufotes viridis* از دوزیستان بی‌دم در مناطقی از استان خوزستان. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۳(۴۹)، ۱-۱۲.

مقدمه

وضعیت جمعیتی دوزیستان شاخص مهمی است که وضعیت سلامتی یک اکوسیستم را نشان می دهد (کروتز- گومز، ۲۰۱۵؛ هاکینگ و بابیت، ۲۰۱۴؛ ویدال، ماکوسی و پونس، ۲۰۱۸). از راسته دوزیستان بی دم تا کنون ۵۰ خانواده و ۷۶۳۶ گونه در جهان گزارش شده است که پنج خانواده (Ranidae، Hylidae، Bufonidae، Pelobatidae و Dicroglossidae) از آن با ۱۵ گونه در ایران وجود دارد (فراست، ۲۰۲۱). گونه وزغ سبز (*Bufotes viridis*) از خانواده وزغ‌های حقیقی (Bufonidae) در نیمه غربی و مرکز ایران به وفور یافت می شود (فخارزاده و حسین زاده ۲۰۲۱). این گونه متعلق به کمپلکس وزغ سبز (*Bufotes viridis* complex) است. این کمپلکس گونه‌ای در پاله‌آرکتیک پراکنش و مشکلات آرایه‌شناختی فراوان دارد و شامل تاکسون های دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید با تولیدمثل دو جنسی است. استوک و همکاران (b ۲۰۰۱) پژوهش هایی را بر روی فرم‌های پلی‌پلوئیدی وزغ سبز در ایران و پاکستان انجام دادند. آن‌ها دریافتند که گونه *Bufotes oblongus* تتراپلوئیدی است و در شرق ایران در حوالی بیرجند توزیع یافته است. فخارزاده و همکاران (۲۰۱۴) به مطالعه سه عضو از کمپلکس *Bufotes viridis* در جنوب ایران پرداختند و مطالعات کاریولوژی از سه گونه وزغ *Bufotes variabilis*، *Bufotes surdus* و *Bufotes luristanicus* نشان دادکه دارای ۲n=۲۲ کروموزوم هستند و هم چنین نتایج مطالعات سیتوزنتیکی نشان داد که گونه‌های *B. surdus* و *B. luristanicus* دو گونه از هم متمایز هستند. فخارزاده و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی کمپلکس وزغ سبز در قسمت‌هایی از شمال‌شرق ایران پرداختند و هر سه سطح پلوئیدی را گزارش کردند. در مطالعات میدانی آن ها موفق به کشف وزغ های سبز تریپلوییدی (۳n=۳۳) از رشته کوه کپه داغ در شمال‌شرقی ایران شدند.

گونه موردمطالعه دیگر *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) یا قورباغه مردابی از خانواده قورباغه‌های حقیقی (Ranidae) است که در همه جای ایران به غیر از مناطق کویری پراکنش دارد. اعضای جنس *Pelophylax* از نظر آرایه شناختی مشکل‌دارترین دوزیستان بی‌دم می‌باشد و در حقیقت یک کمپلکس گونه‌ای (*Pelophylax ridibundus* complex) در ایران وجود دارد. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که مشکلات تاکسونومی و شناسایی جمعیت های محلی درون این جنس در ایران هنوز حل نشده است (مهمینی و همکاران، ۲۰۲۲). وضعیت آرایه شناختی این گونه در ایران نامشخص است و بسیاری از جمعیت‌های قورباغه‌های آبی ایران که قبلاً با نام *P. ridibundus* گزارش شده‌اند، تاکنون موردمطالعه مولکولی قرار نگرفته‌اند (فخارزاده، صیدی و ممبینی، ۲۰۲۳؛ جعفری و فخارزاده، ۱۴۰۱). مطالعه برخی از جمعیت‌های این جنس در ایران نشان می‌دهد که احتمال دارد قورباغه‌های آبی غرب ایران متعلق به *Pelophylax bedriagae* باشند (پسرکلو و همکاران، ۲۰۱۶). آکین و همکاران (۲۰۱۰) هاپلوتایپ های مختلفی را از قورباغه‌های آبی در غرب ایران گزارش کرده اند که شاید بتواند این فرضیه را قوت بخشد که بیش از یک گونه یا هیبریدی از آن ها در غرب ایران پراکنش دارد. محمدی و همکاران (۲۰۱۵) رکورد جدیدی از وجود گونه ی قورباغه مردابی در استان سیستان و بلوچستان را گزارش کردند و به بررسی ریختی و کاریولوژی این گونه در این استان پرداختند. در مطالعه‌ای که توسط بشیری و کمی (۲۰۱۷) بر روی گونه *Pelophylax* sp. در استان گیلان صورت گرفته بود، مشاهده شد که مجموعه کروموزومی شامل ۱۲ جفت ساب‌متاسانتریک و یک جفت متاسانتریک می‌باشد. فخارزاده و همکاران (۲۰۲۳) به تفاوت‌های قابل‌توجهی در نوع کروموزوم های برخی جمعیت های مطالعه‌شده در ایران اشاره می کنند که این تفاوت ها به‌ویژه در وجود یا عدم وجود و تعداد کروموزوم‌های ساب‌تلوسانتریک می‌باشد.

داده‌های سیتوژنتیکی برخی از اساسی‌ترین اطلاعات را در مورد ژنوم ارائه می‌دهند و از آن‌ها به‌عنوان سرنخی برای مطالعات تبارزایی و کشانه‌های جغرافیایی استفاده می‌شود (ولنروتر و برناچز، ۲۰۱۸؛ پرکینز و همکاران، ۲۰۱۹). دوزیستان یکی از بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین ساختار ژنومی همه مهره‌داران را ارائه می‌دهند (مورسکاچی،۱۹۷۳؛ دولمن و تراب، ۱۹۸۶؛ وینگرادو ۱۹۹۸؛ گرین و سشنز ۱۹۹۱). اکثریت دوزیستان تعداد زیادی کروموزوم ندارند و کروموزوم‌های آن‌ها نسبتا بزرگ و به راحتی به‌دست می‌آید. لذا دوزیستان جایگاه بسیار خوبی در تحقیقات کروموزومی دارند (فخارزاده و همکاران ، ۲۰۰۹).

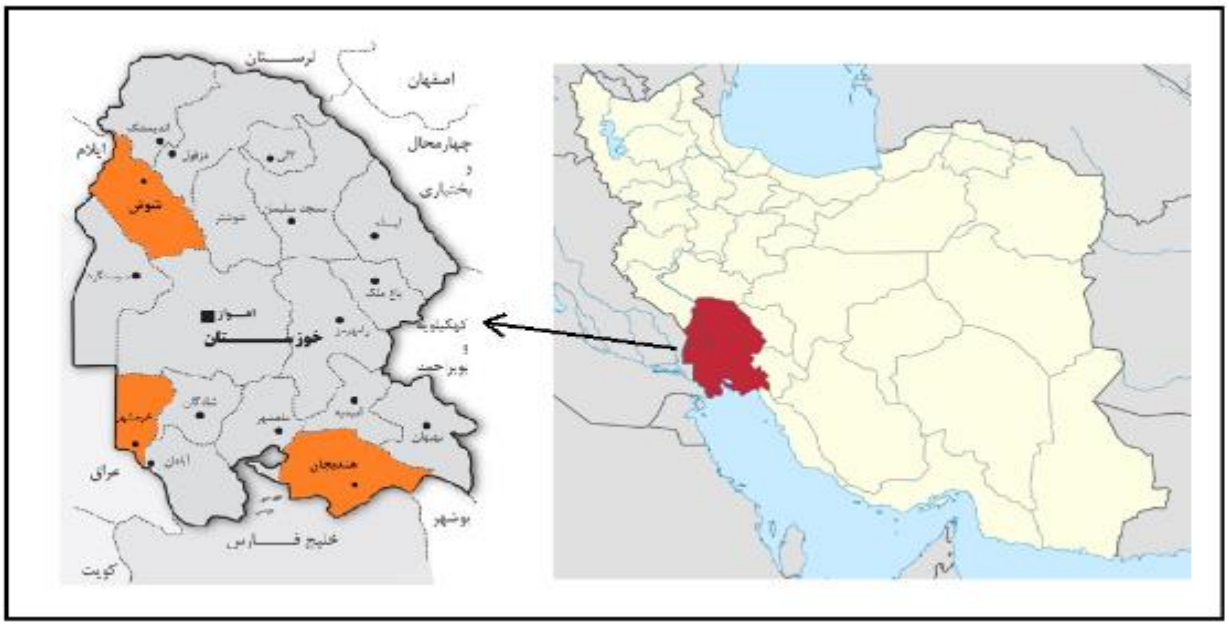
بررسی منابع معتبر مشخص می کند که احتمال حضور پنج گونه دوزیست بی دم در نیمه غربی ایران وجود دارد که شامل قورباغه درختی (*Hyla savignyi*)، قورباغه قفقازی (*Rana macrocnemis*)، قورباغه مردابی، وزغ سبز و وزغ لرستانی (*Bufotes luristanicus*) است. وزغ لرستانی تا کنون فقط از رشته کوه زاگرس گزارش شده است (فراست، ۲۰۲۴؛ صفی ماهرو، ۲۰۲۳). اکثر نواحی استان خوزستان به علت وجود منابع

آبی فراوان و رطوبت بالای هوا، محیطی مساعد را برای دوزیستان بی دم فراهم می کنند. دو گونه وزغ سبز و قورباغه مردابی در استان خوزستان پراکنش وسیعی دارند. اگرچه دوزیستان ایران از دیرباز توسط پژوهش گران خارجی و داخلی موردبررسی قرار گرفته‌اند، اما مطالعات سیتوژنتیکی در این زمینه اندک یا مربوط به نواحی محدودی از کشور پهناور ایران بوده است. ازسوی دیگر، چنانچه اشاره شد دو گونه موردمطالعه مشکلات آرایه‌شناختی قابل‌توجهی دارند. از آنجایی‌که تاکنون مطالعه کروموزومی در مورد دوزیستان بی‌دم شمال غرب و جنوب استان خوزستان صورت نگرفته است، لذا مطالعه حاضر می‌تواند در بازنگری‌های آرایه‌شناختی دوزیستان بی‌دم ایران راه‌گشا باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در پژوهش حاضر تعداد ۲۸ دوزیست بی‌دم (۱۷ عدد وزغ سبز و ۱۱ عدد قورباغه مردابی) از مناطق مختلف شمال غرب و جنوب استان خوزستان (شوش، خرمشهر و هندیجان) جمع آوری شدند (شکل ۱). چنانچه اشاره شد در منابع معتبر علمی دو گونه قورباغه درختی و قورباغه قفقازی نیز از نیمه غربی ایران و برخی استان های همجوار گزارش شده‌اند. اما با وجود مطالعات میدانی مکرر در مناطق یاد شده تنها دو گونه وزغ سبز و قورباغه مردابی یافت شدند. نمونه‌برداری در بازه زمانی تابستان ۱۳۹۸ تا تابستان۱۳۹۹ انجام شد و نمونه‌ها به صورت زنده به آزمایشگاه تحقیقاتی بیوسیستماتیک جانوری دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. ایستگاه‌های نمونه‌برداری در مناطقی که دارای رودخانه، رود، شالیزار، نیزار یا برکه بود، تعیین شدند. هم چنین چاله‌های دارای آب‌های فصلی یا مناطق مرطوب از جمله پارک‌ها، اطراف درختان و زیر صخره‌ها نیز جهت جمع‌آوری نمونه‌ها مدنظر قرار گرفته شده است. نمونه‌برداری با کمک دست یا با استفاده از تورهای دسته بلند انجام گرفت. در جدول (۱) اطلاعات مناطق نمونه‌برداری و تعداد نمونه‌های صیدشده در هر منطقه را نشان می‌دهد.



شکل ۱. نقشه استان خوزستان و مناطق نمونه‌برداری (شوش، خرمشهر و هندیجان).

جدول ۱. مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری و تعداد نمونه‌های هر منطقه

ایستگاه‌ها	مکان‌های نمونه‌برداری	طول و عرض جغرافیایی	ارتفاع (متر)	تعداد قورباغه‌ها (*P. ridibundus*)	تعداد وزغ‌ها (*B. viridis*)
خرمشهر	روستای معاف حفار غربی	′۲۶ °۴۸ ′، ۴۷ °۳۰	۱۶	۳	۲
	پارک ساحلی خرمشهر	′۱۷ °۴۸ ′، ۴۳ °۳۰	۱۳	۲	۳
	روستای مرادشوه	′۲۲ °۴۸ ′، ۲۲ °۳۲	۲۵۵	۲	۴
شوش	پارک ساحلی شوش	′۲۴ °۴۸ ′، ۱۹ °۳۲	۲۳۶	۱	۵
	روستای ناصرآباد	′۷۲ °۴۹ ′، ۳۹ °۳۰	۴۵	–	۳
هندیجان	نیزارهای مسکن مهر هندیجان جنوبی	′۷۲ °۴۹ ′، ۲۲ °۳۰	۱۹	۳	۲

مناطق موردمطالعه

مناطق نمونه‌برداری از نظر شرایط آب‌وهوایی و جغرافیایی متفاوت هستند. خرمشهر در ارتفاع ۳ متری از سطح دریا قرار دارد و آب و هوای آن در تابستان بسیار گرم و مرطوب و در زمستان خنک است. این شهر در کنار رود کارون قرار دارد. میانگین بارش بارندگی آن کم‌تر از ۲۰۰ میلی‌متر (کم‌ترین حد بارندگی در استان) است. میانگین دمای سالانه درخرمشهر ۲۶/۴ درجه سانتی گراد و بارش سالانه ۱۴۶/۵ میلی لیتر می باشد. شهر شوش با ارتفاع ۸۷ متر از سطح دریا، دارای آب وهوای گرم وخشک است. رودخانه های دز وکرخه در این شهر جریان دارند. میانگین دمای سالانه در شوش ۲۵/۸ درجه و میانگین بارش سالیانه ۲۵۰/۷ میلی‌متر است. جلگه ساحلی هندیجان در منطقه گرم و خشک قرار دارد. ارتفاع آن از سطح دریا ۵ متر است. بندر هندیجان ۹۰ کیلومتر مرز آبی با خلیج فارس دارد. میانگین دمای سالیانه ۲۶/۱ و میانگین بارش سالیانه ۲۱۸/۱ است (سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی، ۱۳۹۶). همان‌طورکه در جدول (۱) نشان داده شده است از خرمشهر پنج عدد قورباغه و پنج عدد وزغ، از شوش سه عدد قورباغه و نُه عدد وزغ، از بندر هندیجان سه عدد قورباغه و سه عدد وزغ صید شدند.

ریخت‌شناسی و تشخیص گونه

دوزیستان جمع آوری‌شده با استفاده از صفات ریختی و کلیدهای شناسایی معتبر (نظیر بلوچ و کمی؛ ۱۳۸۳؛ استوک و همکاران، ۲۰۰۱a) شناسایی شدند. در این پژوهش صفات ریختی مثل وجود یا عدم جود چین های پشتی، پرده صماخ، زبان، صفحات انگشتی، دندان های فکی، شکل سر، لکه گیجگاهی، پرده ما بین انگشتان در اندام های حرکتی عقبی، وجود یا عدم وجود غده پاروتوئید، شکل غده پاروتوئید، برآمدگی پا، اندام تشدید صدا، تنوع رنگ و دندان موردبررسی قرار گرفت.

کاریولوژی

ابتدا به ازای هر گرم از وزن دوزیست ۰/۰۱ میلی‌لیتر از محلول کلشی‌سین به زیر پوست شکمی جانور تزریق شد و ۱۲-۱۶ ساعت بعد از تزریق، جانور با محلول کلروفرم کشته شد. سپس مغز استخوان ران جانور را خارج کرده و در محلول KCL ۰/۰۷۵ مولار قرار داده، بعد از آن محلول وارد لوله سانتریفیوژ شد. بر روی رسوب حاصل ۵ میلی‌لیتر محلول حاوی متانول و اسیداستیک به ترتیب به نسبت سه به یک (محلول فیکساتیو) ریخته و دوباره سانتیریفوژ شد. این مرحله یک بار دیگر تکرار شد. در نهایت بر روی رسوب حاصل ۱ میلی لیتر محلول فیکساتیو ریخته و بر روی هر یک از لام های یخ زده چند قطره از محلول به دست‌آمده از فاصله۴۰ تا ۵۰ سانتی متری پرتاب شد. پس از خشک‌شدن، لام‌ها با گیمسای ۴ درصد رنگ آمیزی شدند. در پایان برای مشاهده کروموزوم‌ها از میکروسکوپ Olympus و برای عکس‌برداری از دوربین Dino Capture ۲,۰۰ استفاده گردید و به‌منظور دسته‌بندی کروموزوم‌ها از روش لوان و همکاران (۱۹۶۴) استفاده شد.

نتایج

مطالعه صفات ریختی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر نشان داد که همه وزغ‌های جمع‌آوری‌شده متعلق به گونه *B. viridis* و همه قورباغه‌های جمع‌آوری شده متعلق به گونه *P. ridibundus* هستند.

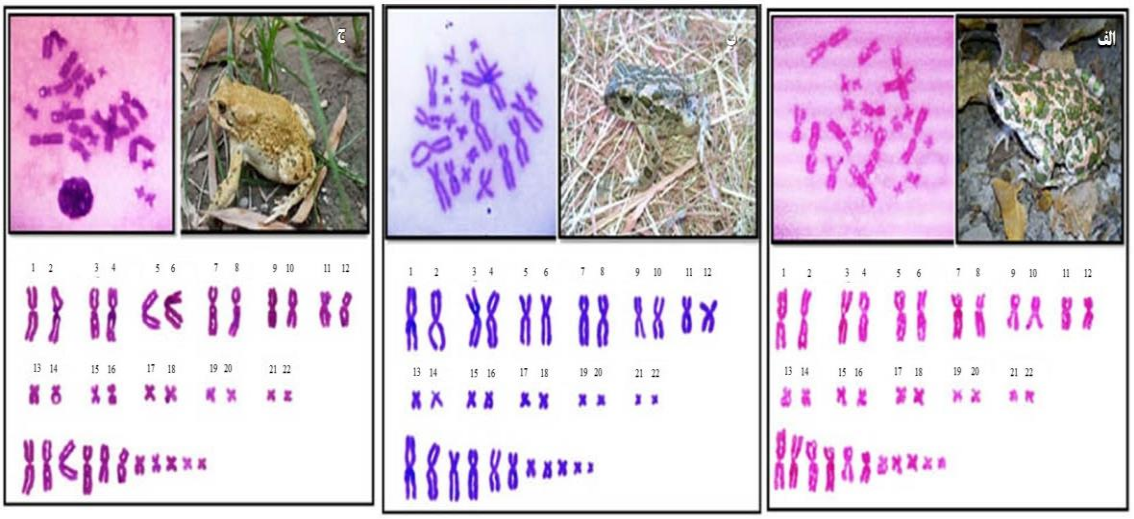
در این پژوهش به بررسی کاریوتایپ وزغ سبز در سه منطقه در شمال غرب و جنوب استان خوزستان (شوش، خرمشهر و هندیجان) پرداخته شد. مطالعات نشان دادند که همگی وزغ‌ها دارای مجموعه ۲۲ کروموزومی (۲n=۲۲) می باشند. کاریوتایپ آن شامل شش جفت کروموزوم بزرگ و پنج جفت کروموزوم کوچک است (شکل ۲).

هم‌چنین، طبق جدول (۲) که جزئیات کاریوتایپی را نشان می‌دهد، این مجموعه کروموزومی شامل نُه جفت کروموزوم متاسانتریک و دو جفت کروموزوم ساب‌متاسانتریک می‌باشد.

در هر سه منطقه یادشده جفت‌های چهارم و هفتم ساب‌متاسانتریک و بقیه جفت‌های کروموزومی متاسانتریک هستند. نتایج در قالب ایدیوگرام در شکل (۳) نمایش داده شده است.

بررسی کاریوتایپ قورباغه‌های مردابی سه منطقه موردمطالعه نشان می‌دهد که هر سه جمعیت مذکور دارای ۲۶ کروموزوم (۲n=۲۶) با پنج جفت کروموزوم بزرگ و هشت جفت کروموزوم کوچک می‌باشند (شکل۴).

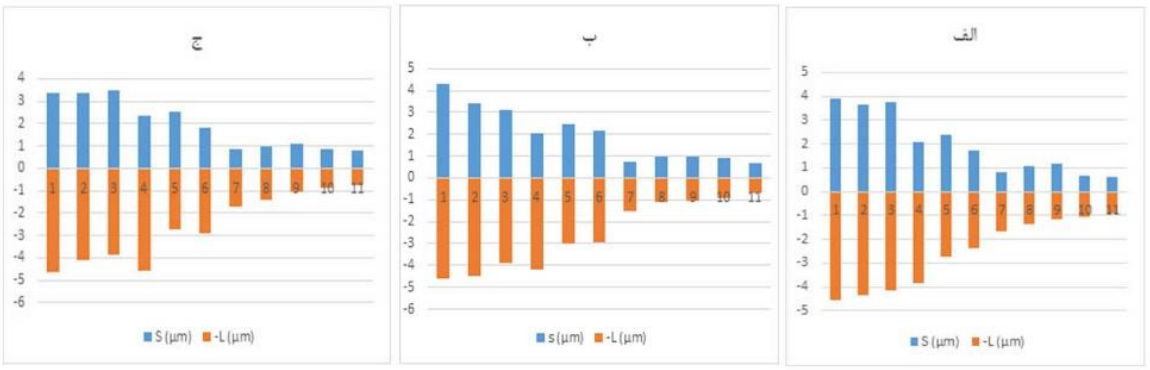
اما فرمول کاریوتایپی مناطق با همدیگر کاملاً متفاوت است. فرمول کاریوتایپی قورباغه‌های خرمشهر 8m+1sm+4st است. از مجموع پنج جفت کروموزوم بزرگ، چهار جفت متاسانتریک و جفت دیگر ساب‌متاسانتریک بود. از مجموع هشت جفت کروموزوم کوچک، چهار جفت کروموزوم متاسانتریک و چهار جفت از کروموزوم‌ها ساب تلوسانتریک بودند (جدول ۳-الف). شکل (۵- الف) ایدیوگرام مربوط به کاریوتایپ این نمونه را نشان می‌دهد.



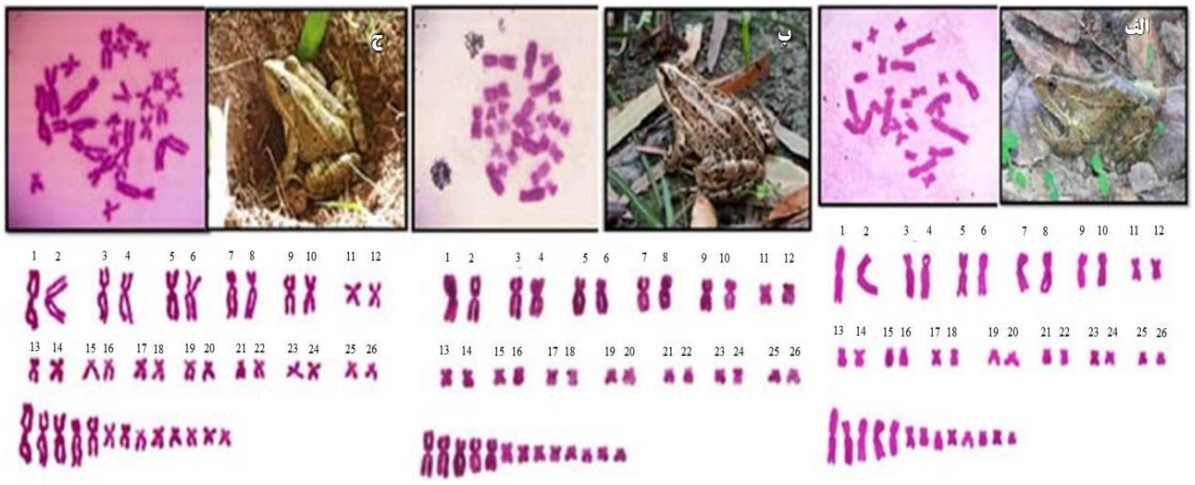
شکل ۲. کاریوتایپ گونه *B. viridis* در مناطق موردمطالعه؛ الف) خرمشهر، ب) شوش، ج) هندیجان

جدول ۲. جزئیات کاریوتایپی *B. viridis*؛ الف) منطقه خرمشهر، ب) منطقه شوش و ج) منطقه هندیجان (m=metacentric,sm=submetacentric).

الف					ب					ج				
شماره کروموزوم	بازوی بلند	بازوی کوتاه	طول کل	نسبت بازوها	نوع کروموزوم	بازوی بلند	بازوی کوتاه	طول کل	نسبت بازوها	نوع کروموزوم	بازوی بلند	بازوی کوتاه	طول کل	نسبت بازوها	نوع کروموزوم
۱	۴/۵۴	۳/۹	۸/۴۴	۱/۱۶	m	۴/۶	۴/۲۸	۸/۸۸	۱/۰۷	m	۴/۶۱	۳/۳۷	۷/۹۸	۱/۳۷	m
۲	۴/۳۷	۳/۶۷	۸/۰۴	۱/۱۹	m	۴/۵	۳/۴۱	۷/۹۱	۱/۳۲	m	۴/۱۲	۳/۳۶	۷/۴۹	۱/۲۳	m
۳	۴/۱۵	۳/۷۶	۷/۹۱	۱/۱۱	m	۳/۸۸	۳/۱۱	۶/۹۹	۱/۲۵	m	۳/۸۵	۳/۴۹	۷/۳۴	۱/۱۱	m
۴	۳/۸۲	۲/۰۷	۵/۸۹	۱/۸۴	sm	۴/۲۱	۲/۰۴	۶/۲۵	۲/۰۶	sm	۴/۵۹	۲/۲۸	۶/۸۷	۲/۰۱	sm
۵	۲/۷۵	۲/۳۸	۵/۱۳	۱/۱۵	m	۲/۹۷	۲/۴۵	۵/۴۲	۱/۲۲	m	۲/۷۵	۲/۵۴	۵/۲۹	۱/۰۹	m
۶	۲/۴	۱/۷۱	۴/۱۱	۱/۴	m	۲/۹۴	۲/۱۷	۵/۱۱	۱/۳۶	m	۲/۸۹	۱/۸۱	۴/۷۰	۱/۶	m
۷	۱/۶۹	۰/۷۹	۲/۴۸	۲/۱۵	sm	۱/۵۳	۰/۷۲	۲/۲۵	۲/۱۱	sm	۱/۷۳	۰/۸۷	۲/۶۰	۱/۹۹	sm
۸	۱/۳۵	۱/۰۴	۲/۳۹	۱/۲۹	m	۱/۱۲	۰/۹۹	۲/۱۲	۱/۱۳	m	۱/۳۵	۰/۹۹	۲/۳۴	۱/۳۷	m
۹	۱/۱۸	۱/۱۸	۲/۳۷	۱	m	۱/۰۲	۰/۹۹	۲/۰۲	۱/۰۳	m	۱/۰۸	۱/۰۸	۲/۱۶	۱	m
۱۰	۱/۰۷	۰/۶۷	۱/۷۴	۱/۶	m	۰/۹۲	۰/۸۹	۱/۸۱	۱/۰۳	m	۰/۸۷	۰/۸۴	۱/۷۲	۱/۰۳	m
۱۱	۰/۹۳	۰/۶۲	۱/۵۴	۱/۵	m	۰/۶۶	۰/۶۶	۱/۳۲	۱/۰۱	m	۰/۷۸	۰/۷۷	۱/۵۵	۱/۰۲	m



شکل ۳. ایدیوگرام *B. viridis* در مناطق موردمطالعه؛ الف) خرمشهر، ب) شوش، ج) هندیجان



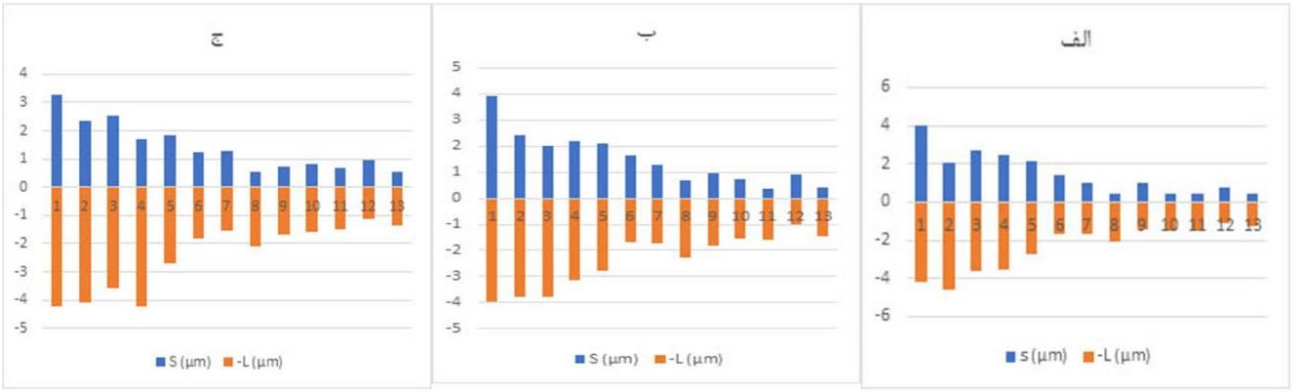
شکل ٤. کاریوتایپ گونه *P. ridibundus* در مناطق موردمطالعه؛ الف) خرمشهر، ب) شوش، ج) هندیجان.

جدول ۳. جزئیات کاریوتایپی *P. ridibundus*؛ الف) منطقه خرمشهر، ب) منطقه شوش و ج: منطقه هندیجان (m=metacentricsm=submetacentric,)

الف					ب					ج				
شماره کروموزوم	بازوی بلند	بازوی کوتاه	طول کل	نسبت بازوها	نوع کروموزوم	بازوی بلند	بازوی کوتاه	طول کل	نسبت بازوها	نوع کروموزوم	بازوی بلند	بازوی کوتاه	طول کل	نسبت بازوها	نوع کروموزوم
۱	۴/۲۲	۳/۹۶	۸/۱۸	۱/۰۶	m	۳/۹۶	۳/۹	۷/۸۶	۱/۰۱	m	۴/۲۴	۳/۲۸	۷/۵۱	۱/۲۹	m
۲	۴/۵۸	۲/۰۳	۶/۶۱	۲/۲۵	sm	۳/۷۹	۲/۴۱	۶/۲۰	۱/۵۷	m	۴/۰۸	۲/۳۵	۶/۴۳	۱/۷۳	sm
۳	۳/۶	۲/۶۷	۶/۲۷	۱/۳۵	m	۳/۷۸	۲/۰۱	۵/۷۹	۱/۸۸	sm	۳/۵۷	۲/۵۵	۶/۱۲	۱/۴	m
۴	۳/۵۴	۲/۴۵	۵/۹۹	۱/۴۵	m	۳/۱۶	۲/۱۸	۵/۳۴	۱/۴۵	m	۴/۲۳	۱/۷۲	۵/۹۵	۲/۴۵	sm
۵	۲/۶۹	۲/۱۲	۴/۸۲	۱/۲۷	m	۲/۷۶	۲/۰۹	۴/۸۶	۱.۳۲	m	۲/۷۱	۱/۸۴	۴/۵۵	۱/۴۸	m
۶	۱/۶۵	۱/۳۷	۳/۰۳	۱/۲۱	m	۱/۷	۱/۶۳	۳/۳۳	۱/۰۵	m	۱/۸۲	۱/۲۳	۳/۰۴	۱/۴۸	m
۷	۱/۶۵	۱/۰۴	۲/۷۰	۱/۵۸	m	۱/۷۲	۱/۲۸	۳/۰۰	۱/۳۴	m	۱/۵۲	۱/۲۷	۲/۷۹	۱/۲	m
۸	۲/۰۴	۰/۴۷	۲/۵۱	۴/۳۳	st	۲/۲۷	۰/۶۹	۲/۹۷	۳/۲۸	st	۲/۰۹	۰/۵۶	۲/۶۵	۳/۷۱	st
۹	۱/۴۷	۱	۲/۴۷	۱/۴۷	m	۱/۸	۰/۹۸	۲/۷۸	۱/۸۳	sm	۱/۶۷	۰/۷۵	۲/۴۲	۲/۲۱	sm
۱۰	۱/۵۳	۰/۴۶	۱/۹۹	۳/۳۵	st	۱/۵۴	۰/۷۲	۲/۲۶	۲/۱۵	sm	۱/۵۹	۰/۸۱	۲/۴۰	۱/۹۷	sm
۱۱	۱/۴۹	۰/۴۷	۱/۹۶	۳/۱۷	st	۱/۵۷	۰/۳۹	۱/۹۶	۴/۰۵	st	۱/۵	۰/۶۹	۲/۱۹	۲/۱۹	sm
۱۲	۱/۰۹	۰/۷۷	۱/۸۶	۱/۴۱	m	۱	۰/۹۲	۱/۹۳	۱/۰۸	m	۱/۱۴	۰/۹۴	۲/۰۸	۱/۲۲	m
۱۳	۱/۲۵	۰/۴۱	۱/۶۶	۳/۰۸	st	۱/۴۴	۰/۴	۱/۸۳	۳/۵۹	st	۱/۳۷	۰/۵۴	۱/۹۲	۲/۵۲	sm

مطالعه کروموزومی قورباغه های منطقه شوش نشان داد که فرمول کاریوتایپی آن 7m+3sm+3st است. از مجموع پنج جفت کروموزوم بزرگ، چهار جفت متاسانتریک و یک جفت ساب‌متاسانتریک بود. از مجموع هشت جفت کروموزوم کوچک، سه جفت کروموزوم متاسانتریک و دو جفت ساب‌متاسانتریک و سه جفت از کروموزوم ها ساب تلوسانتریک بودند (جدول ۳- ب). ایدیوگرام مربوط به کاریوتایپ این نمونه در زیر آورده شده است (شکل ۵- ب).

در مطالعه کاریولوژیکی نمونه‌های مربوط به منطقه هندیجان نیز مشخص شد که قورباغه‌های این منطقه دارای مجموعه ۲۶ کروموزومی (۲n=۲۶) می‌باشد (شکل۴- ج). فرمول کاریوتایپی آن (6m+6sm+1st) است لذا جزئیات کاریوتایپی آن تفاوت قابل ملاحظه ای با قورباغه‌های آبی خرمشهر و شوش دارد. از مجموع پنج جفت کروموزوم بزرگ، سه جفت متاسانتریک و دو جفت ساب‌متاسانتریک بودند. از مجموع هشت جفت کروموزوم کوچک، سه جفت کروموزوم متاسانتریک و چهار جفت ساب‌متاسانتریک و یک جفت از کروموزوم‌ها ساب تلوسانتریک بودند (جدول ۳- ج). شکل (۵-ج) ایدیوگرام مربوط به کاریوتایپ این نمونه را نشان می‌دهد. در هیچ‌کدام از قورباغه‌ها و وزغ‌های مناطق موردمطالعه کروموزوم‌های هترومورف جنسی مشاهده نشد.



شکل ۵. ایدیوگرام *P. ridibundus* در مناطق موردمطالعه؛ الف) خرمشهر، ب) شوش، ج) هندیجان

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه پلی‌پلوئیدی در جانوران کم‌تر از گیاهان مشاهده می‌شود با این حال در طیف وسیعی از آرایه های جانوری نظیر توربلاریاها، سخت‌پوستان، نرم‌تنان، کرم‌های حلقوی، حشرات، خزندگان، دوزیستان و ماهیان تلئوست گزارش شده است. دوزیستان تنها مهره‌دارانی هستند که گونه‌ها یا جمعیت‌های دیپلوئید و پلی‌پلوئید با تولیدمثل دو جنسی دارند (اشمید و همکاران، ۲۰۱۵). گونه‌های جنس *Bufotes* از اعضای کمپلکس وزغ سبز هستند که در ایران نیز پراکنش دارند و دارای تاکسون‌های دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید با تولید مثل دوجنسی هستند (استوک و همکاران، ۲۰۰۶ و ۲۰۰۱b). در مطالعه حاضر نمونه های صیدشده از نظر سطح پلوئیدی موردبررسی قرار گرفتند. همه وزغ های سبز دیپلوئید (۲n=۲۲) بودند و هیچ وزغ سبز پلی‌پلوئید مشاهده نشد. تا کنون وزغ‌های پلی‌پلوئید تنها از نیمه شرقی ایران گزارش شده است (فخارزاده و همکاران، ۲۰۱۵؛ استوک وهمکاران، ۲۰۰۶). آنالیزهای کرموزومی اطلاعات مفیدی را در زمینه تاکسونومی و فیلوژنی فراهم می آورند و یک ویژگی اساسی در تشخیص گونه ها هستند (بوسین و همکاران، ۲۰۰۱؛ آگیار و همکاران، ۲۰۰۴؛ لورنسو و همکاران، ۲۰۰۸؛ بوسین و همکاران، ۲۰۰۸؛ باراکت و همکاران، ۲۰۱۱). همگی کاریوتایپ‌ها شش جفت کروموزوم بزرگ و پنج جفت کروموزوم کوچک دارند که متاسانتریک یا ساب متاسانتریک هستند. چنین الگوی کروموزومی در اکثریت گونه های جنس *Bufotes* گزارش شده است (بوگارت، ۱۹۷۲؛ آزودو و همکاران، ۲۰۰۳؛ الشهری والصالح، ۲۰۰۸؛ بورکین و همکاران، ۲۰۰۷؛ فخارزاده و همکاران، ۲۰۱۴ و ۲۰۱۵؛ صیدی و فخارزاده، ۱۳۹۷). از دیدگاه آرایه شناختی ثبوت تعداد کروموزوم ها در درون یک گونه یا جنس یکی از فاکتورهای مهم در تشخیص آن گونه یا جنس است. از نظر نوع کروموزوم ها تفاوتی بین سه منطقه موردمطالعه مشاهده نشد، به طوری که در هر سه منطقه نمونه برداری جفت چهار و هفت کروموزوم ها ساب متاسانتریک و بقیه جفت ها متاسانتریک بودند. در پژوهشی که در مورد وزغ های سبز شیرکوه در منطقه تفت واقع در مرکز ایران انجام شد، جفت های چهارم، ششم و هفتم ساب متاسنتریک بودند (فخارزاده و همکاران، ۲۰۱۵) که با نتایج ما متفاوت است. در مطالعه دیگری که برروی جمعیت های وزغ سبز مناطق مهکویه، شیراز و فیروزآباد از استان فارس، چغازنبیل و اهواز از استان خوزستان صورت گرفته است (فخارزاده و همکاران، ۲۰۱۵). در تمامی آن‌ها به‌جز نمونه‌های متعلق به چغازنبیل جفت چهارم و هفتم ساب متاسانتریک هستند که با نتایج ما همخوانی دارد. اما در وزغ های چغازنبیل جفت کرموزوم های چهارم و نهم ساب متاسانتریک بودند. فخارزاده و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که در جمعیت‌های این گونه در شمال‌غرب ایران جفت چهارم و هفتم متاسانتریک و در جمعیت‌های جنوب‌شرق ایران (سیرجان) جفت چهارم و نهم ساب‌متاسنتریک و بقیه متاسنتریک هستند. بنابراین، تعدادکروموزوم های ساب متاسنتریک از شمال غرب تا جنوب شرق یکسان است (به جز شیرکوه در تفت)، اما عدد دومین جفت کروموزوم متاسنتریک بین هفت و نُه متغیر است. تفاوت در تعداد کروموزوم های ساب متاسنتریک در شیرکوه احتمالاً با این موضوع مرتبط است که وزغ های این ناحیه در مرکز ایران یک جمعیت ایزوله را نشان می‌دهد. درویش‌زاده (۱۳۷۰) به وجود ردپایی از یخچال‌های کواترنری در شیرکوه تفت اشاره داشته است. بنابراین مطالعه کروموزوم های وزغ های سبز سه منطقه یاد شده در این تحقیق و مقایسه آن با جمعیت‌های نواحی دیگر ایران تفاوت‌های درون‌گونه‌ای اندکی را از نظر کروموزمی نشان می‌دهد.

تمامی قورباغه های مردابی صیدشده در این پژوهش دیپلوئید هستند و ۲n=۲۶ کروموزوم دارند. همگی کاریوتایپ ها پنج جفت کروموزوم بزرگ و هشت جفت کروموزوم کوچک دارند. چنین الگوی ثابتی در اکثریت قورباغه های Ranoid گزارش شده است (فخارزاده و همکاران، ۲۰۰۹؛ محمدی و همکاران، ۲۰۱۵؛ بشیری و کمی، ۲۰۱۷). به‌طور معمول برای هر گونه یا جنس تعداد کروموزوم‌ها عددی ثابت است. نتایج نشان داد که فرمول کاریوتایپی قورباغه های سه منطقه موردمطالعه کاملاً متفاوت از یکدیگر است و تعداد هر نوع ازکروموزوم‌ها به‌ویژه کروموزوم‌های ساب تلوسانتریک در مناطق یادشده متفاوت هستند وجزئیات کاریوتایپی مختلفی را نشان می دهند. لذا تنوع کروموزومی بالایی در سه جمعیت موردبررسی وجود دارد. محمدی و همکاران (۲۰۱۵) رکورد جدیدی از قورباغه مردابی را از زابل در سیستان بلوچستان گزارش کردند. فرمول کاریوتایپی قورباغه‌های این منطقه 1M+6SM+6St است که با نتایج این پژوهش همخوانی ندارد. قورباغه‌های مردابی استان گیلان (*Pelophylax* sp.) فاقد کروموزوم ساب تلوسانتریک هستند و فرمول کاریوتایپی آن 1M+12SM است که با نتایج این پژوهش و سایر پژوهش های انجام‌یافته در ایران به‌علت عدم وجود کروموزوم ساب تلوسانتریک متفاوت است. در مطالعه‌ای که توسط فخارزاده و همکاران (۲۰۲۳) برروی قورباغه های آبی غرب و جنوب‌غرب ایران انجام داده اند دو فرمول کاریوتایپی (5m+5m+3st) و (6m+4m+3st) برای جمعیت‌های غرب (دهدشت، مسجد سلیمان، بهبهان) و دو فرمول کاریوتایپی (9m+1m+3st) و (7m+2m+4st) برای جمعیت های جنوب‌غرب (دیلم و بوشهر) گزارش کردند که متفاوت از نتایج این پژوهش است. لذا در مجموع مطالعات انجام‌شده در مورد جمعیت‌های مختلف قورباغه های آبی ایران نشان می دهد که تفاوت زیادی در فرمول کاریوتایپی و نوع و تعداد هر نوع کروموزوم وجود دارد که می تواند نشان دهنده وجود گونه یا گونه های دیگر از جنس *Pelophylax* و یا همراه با هیبریدی از آن ها باشد. جنس *Peolphylax* از نظر آرایه‌شناختی بحث‌انگیزترین دوزیست بی‌دم به‌ویژه در اروپای‌غربی است. این قورباغه ها از نظر ریختی بسیار شبیه هم هستند، اما واگرایی‌ای ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌ای که بیان‌کننده وجود گونه های همزاد با درجات متفاوتی از تمایز است در آن ها دیده می شود (پلاتنر و همکاران، ۲۰۱۰). پسرکلو و همکاران (۲۰۱۸) براساس مطالعات ریخت‌سنجی و صوت بیان می‌کنند که همه قورباغه‌های آبی شمال‌غرب، غرب و جنوب ایران یک گونه واحد به نام *Pelophylax bedriagae* است. از سوی دیگر، تنها مطالعه مولکولی قورباغه های آبی در ایران براساس آنالیزهای DNA میتوکندریایی نشان داد که نمونه های شمال و شمال شرق ایران *Pelophylax sp.* است (پسرکلو و همکاران، ۲۰۱۶)، اما در این پژوهش جمعیت های شرق، جنوب‌شرق و مرکز ایران موردبررسی قرار نگرفته‌اند. آکین و همکاران (۲۰۱۰) بیان می کنند که شش هاپلوتایپ اصلی (MHGs) در قورباغه‌های آبی شرق مدیترانه وجود دارد. آن ها نمونه های کمی از ایران را نیز در پژوهش خود داشتند که مربوط به شمال غرب و شمال ایران (MHG7 و MHG6d) است. MHG9 مربوط به قورباغه های پاسارگاد در جنوب‌غربی ایران است. این هاپلوتایپ ها ممکن است نه متعلق به *P. bedriagae* و نه متعلق به *P. ridibundus* است.

در هیچ‌کدام از قورباغه‌ها و وزغ‌های جمع‌آوری‌شده کروموزوم های هترومورف جنسی مشاهده نشد. در بسیاری از مقالات پیشین به هومومورفی کروموزوم‌های جنسی دوزیستان بی دم اشاره شده است) کاساهارا و همکاران، ۱۹۹۶؛ کاوالو و همکاران، ۲۰۰۲؛ بورکین و همکاران، ۲۰۰۷؛ الشهری و الصالح، ۲۰۱۰؛ استوک و همکاران، ۲۰۱۳؛ فخارزاده و همکاران، ۲۰۱۴).

چنانچه بیان شد از نظر کروموزومی تفاوت کمی در جمعیت‌های مختلف گونه وزغ سبز (*B. viridis*) در مناطق موردمطالعه در ایران وجود دارد. اما مطالعه حاضر در مورد قورباغه‌های مردابی (*P. ridibundus*) و مقایسه آن با پژوهش‌های انجام‌یافته دیگر در ایران، تفاوت‌های درون‌گونه‌ای قابل‌توجهی را از نظر کاریوتایپی در کشور نشان می‌دهد که احتمال وجود کمپلکس گونه‌ای را قوت می بخشد. لذا لزوم یک بازنگری آرایه شناختی با روش‌های کارآمدتری چون مطالعات مولکولی و بیوآکوستیک برای این گونه ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات دوستان عزیزی که هرکدام به نحوی در نمونه برداری و تهیه این اثر با نویسندگان همکاری داشته‌اند، تقدیر و تشکر می‌شود. کلیه مراحل کار زیر نظر دانشگاه شهید چمران اهواز و با شماره پژوهانه SCU.SB99.241 تأمین مالی شده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

Aguiar, Jr. O., Carvalho, K. A., Giaretta, A. A., & Recco-Pimentel, S. M. (2004). Cytogenetics of *Hylodes* and *Crossodactylus* species (Anura: Leptodactylidae) with comments on Hylodinae/Dendrobatidae relationships. *Genetica*, 121, 43-53.

Akin, C., Bilgin, C. C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S. N., Uzzell, T., Bilgin, M., Hotz, H., Guex, G. D., & Plötner, J. (2010). Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs have been determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography*, 37, 2111-2124.

Al-Shehr, A. H., & Al-Saleh., A. A. (2008). Karyotype of Amphibian in Saudi Arabia. 3. The karyotype of *Bufo regularis*. *Asian Journal of Cell Biology*, (3), 67-71.

Al-Shehri A. H., & Al-Saleh A. A. (2010). First report of the karyotype of *Bufo dhufarensis* from Saudi Arabia. *Journal* of *King Saud University-Science*, 22,73-76.

Azevedo, M. F. C., Forest, F., Ramos, P. R., & Jim J. (2003). Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus* and *B. paracnemis* (Amphibia: Anura) an intermediate form in sympatry. *Genetics and Molecular Biology*, (26), 289-294.

Baloutch, M., & Kami, H. G. (2006). Amphibian of Iran. Tehran University Press, Tehran. Pp: 177. (in Persian).

Bashirichelkasari, N., & Kami, H. G. (2017). Karyological study of the Marsh frog (*Pelophylax* sp.) from Guilan province. Iran (Anura; Ranidae). *Herpetology Notes*, (10), 677-680.

Baraquet, M., Valetti, J. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2011). Redescription of the karyotypes of five species of the family Bufonidae (Amphibia: Anura) from central area of Argentina. *Biologia* 66, 543-547.

Bogart, J. P. (1972). Karyotypes, in, W. F. Blair (ed.), *Evolution in the Genus Bufo*, University of Texas Press, Austin-London.

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. *Russian Journal of Herpetology*, 14 (2), 121-132.

Busin, C.S., Vinciprova, G., & Recco-pimentel, S.M. (2001). Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia-Anura). *Genetica*, 110, 131-141.

Busin, C. S., Vasconcellos Andrade, G., Bertoldo, J., Del Grande, M. L., Uetanabaro, M., & Recco-Pimentel, S. M. (2008). Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura: Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genetica*, 133, 119-127.

Cavallo D., De Vita R., Eleuteri P., Borkin L., Eremchenko V., Odierna G., & Balletto E**.** (2002). Karyological and flow cytometric evidence of triploid specimens in *Bufo viridis* (Amphibia: Anura). *European Journal of Histochemistry*, 159-164.

Cordella, A., & Iannacci, F. (2010). Information systems in the public sector, The e-Government enactment framework. *Journal of Strategic Information Systems*, 19 (4), 52-66.

Cortéz-Gómez, AM., Ruiz-Agudelo CA., Valencia-Aguilar A., & Ladle, R.J. (2015). Ecological functions of neotropical amphibians and reptiles, a review. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 229-245.

Darvishzadeh, A. (1990). Geology of Iran, Amirabad Press, Tehran. (in Persian).

Dodd, C. Kenneth (2010). *Amphibian ecology and conservation, a handbook of techniques*. Oxford University press.

Duellman, W. E., & Trueb, L. (1986). *Biology of Amphibians*. New York, U.S.A. McGraw-Hill Book Company.

Educational research and planning organization. (2017). Ggeography of Khuzestan province. 10th edition, Textbook Publishing Company. Tehran, Iran 138 pp. (in Persian).

Fakharzadeh, F., Darvish, J., Ghassemzadeh, F., & Kami, H. G. (2009). Anuran karyological study of Khorasan province. *Asian Journal of. Biological Sciences*, 2(3), 66 - 73.

Fakharzadeh, F., Darvish, J., Kami, H. G., Ghasemzadeh, F., & Rastegar-Pouyani, E. (2014). New karyological and morphometric data on poorly known *B. surdus* and *B. luristanicus* in comparison with data of diploid green toads of the *Bufo viridis* complex from South of Iran. *Asiatic Herpetological Research*, 5(3), 168-178.

Fakharzadeh, F., Darvish, J., Kami, H. G., Ghassemzadeh, 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. *Zoologischer Anzeiger*, 255, (25-31).

Fakharzadeh, F., Darvish, J., Kami, H.G., Ghassemzadeh, F., & Rastegar-Pouyani, E. (2018). Karyological investigation of *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae) populations from northwest and southeast of Iran. *Russian Journal of Herpetology*, 25(1), 56-60.

Fakharzadeh, F., & Hosseinzadeh, M. (2021). Overview of taxonomy and prediction potential distribution of *Bufotes sitibundus* (Anura, Bufonidae) using environmental factors. *Journal of Wildlife and Biodiversity*, 5(3), 21-34

Fakharzadeh, F., Seydi Avandi, F., & Mombeni, Y. (2023). Intrapopulation and interpopulation geographic variation in the marsh Frog (*Pelophylax ridibundus* sensu lato) of Iran based on cytogenetic and morphometric data. *Current Herpetology*, 42(2), 219-228.

Frost, D.R. (2024). Amphibian Species of the World, An Online Reference. Version 6.1 (Date of access). Electronic Database accessible at https://amphibians of the world.amnh.org/index.php. American Museum of Natural History, New York, USA.

Green, D.M., & Sessions, S.K. (1991). Nomenclature for chromosomes. In, Green, D.M. and Sessions, S.K., Eds., *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Academic Press, San Diego, pp. 431-432.

Hocking, D., & Babbitt, K. (2014) Amphibian Contributions to Ecosystem Services. *Herpetological Conservation and Biology*, 9, 1-17.

Kasahara S., Siva A. P., & Haddad C. F. (1996), Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae), *Revista Brasileira* de Genética., 19, 237-242.

Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, 201-220.

Lourenço, L. B., Bacci-Junior, M., Martins, V.G., Recco-Pimente, S. M., & Haddad, C. F. B. (2008). Molecular phylogeny and karyotype differentiationin *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura: Leptodactylidae). *Genetica*, 132, 255-266.

Mohaymeni, F., K. Nikcheh, H. G. Kami, and Z. Mohammadi. (2022). Morphological and morphometric variations of the water frog's genus *Pelophylax* in Iran. *Journal of Wildlife and Biodiversity*, 6, 54-71.

Morescalchi, A. (1973). Amphibia. In, *Cytotaxonomy and Vertebrate evolution*, A. B. Chiare-lli and E. Capanna eds., Acad. Press, London and New York, pp. 233-348.

Mohammadi, Z., Khajeh, A., Ghorbani, F., & Kami, H. G. (2015). A biosystematic study of new records of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) from the southeast of Iran. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, (8), 178-182.

Perkins, R.D., Gamboa, J.R., Jonika, M.M., Lo, J., Shum, A., Adams, R.H., & Blackmon, H. (2019). A database of amphibian karyotypes. *Chromosome Research*, 27, 313-319.

Pesarakloo, A., Rastegar-Pouyani, E., Rastegar-Pouyani, N., Kami, H. G., Najibzadeh, M., Khosravani, A., & 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, 392-398.

Pesarakloo, A., Najibzadeh, M., Rastegar-Pouyani, N., & Rastegar-Pouyani, E. (2018). Taxonomic survey of water frog populations of *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae) in western Iran, a morphometric and bioacoustic approach. *Biologia*, 73, 673-681

Plötner, J., Uzzell, T., Beerli, P., Akin, C., Bilgin, C.C., Haefeli, C., Ohst, T., Köhler, F., Schreiber, R., Guex, G. D., Litvinchuk, S.N., Westaway, R., Reyer, H. U., Pruvost, N., & Hotz, H. (2010). Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterraneanwater frogs. p. 372-403. *In*, M. Glaubrecht(ed.), *Evolution in Action, Case Studies in Adaptive Radiation and the Origin of Biodiversity*. Springer, Berlin.

Poorjfary, B., & Fakharzadeh, F. (2022). Study of color polymorphism and sexual dimorphism of *Pelophylax ridibundus* sensulato (Ranidae, Anura) populations in the west and southwest of Kohgiluyeh Va Boyer-Ahmad province. *Journal of Animal Environment*, 14(2),147-160. (in Persian)

Safaei-Mahroo, B., Ghaffari, H., & Niamir, A. (2023). A synoptic review of the amphibians of Iran, Bibliography, taxonomy, synonymy, distribution, conservation status, and identification key to the eggs, larvae, and adults. *Zootaxa*, 5279, 1-112.

Schmid, M., Evans, B.J., & Bogart, P. (2015). Polyploidy in Amphibia. *Cytogenetic and Genome Research* DOI, 10.1159/000431388

Seydi Avandi, F., & Fakharzadeh, F. (2018). Biosystematic study of *Bufotes variabilis* (Pallas, 1769) populations from East and North east of Khuzestan province based on morphometric and karyotype data. *Experimental Animal Biology*, 1, 99-109. (in Persian).

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). *Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde in 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 Herpetological Research*, (9), 77-100.

Stöck, M., Moritz, C., Hickerson, M., Frynta, D., Dujsebayeva, T., Eremchenko, V., Macey, J. R., Papenfuss, T. J., & Wake, D. B. (2006). Evolution of mitochondrial relationships & biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity, *Molecular Phylogenetics and Evolution*,41, 663-689.

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). *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 674-682.

Vidal, C.K., Macusi, E.D., & Ponce, A.G. (2018). Inventory and morphometrics of anuran species found in Mt. Kilala of the Mt. Hamiguitan range wildlife Sanctuary, governor Generoso, Davao Oriental, Philippines. *Philippine Journal of Science*, 147(4), 629-638.

Vinogradov, A.E. (1998). Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry, the triangular relationship. *Cytometry*, 31, 100-109.4

Wellenreuther, M., & Bernatchez, L. (2018). Eco-Evolutionary genomics of chromosomal inversions. Trends Ecology and Evolution. 33, 427-440.