

Study of Adult's Gonads and Gonadal Sex Development in Subspecies *Bufotes surdus annulatus* (Anura: Amphibian)

Zeynab Parvaresh^{1*}, Mohsen Nokhbatolfoghahaei²

1. M. A., Department of Biology, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. Associate Professor, Department of Biology, Shiraz University, Shiraz, Iran; Honorary Member University of Glasgow, Scotland, Britain

(Received: Jun. 28, 2019 - Accepted: Jun. 18, 2022)

شرحی بر بافت‌شناسی گنادهای جنسی بالغ و مطالعه تمایز جنسیتی گنادی در *Bufotes surdus annulatus* (Anura: Amphibian)

زینب پرورش^{۱*}، محسن نخبه‌الفتاحی^۲

۱. کارشناس ارشد، علوم پایه، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲. دانشیار، علوم پایه، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شیراز و عضو افتخاری دانشگاه گلاسکو، اسکاتلند، بریتانیا

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۸)

Abstract

Bufotes surdus annulatus as a subspecies of *B. sardus*; endemic in the very limited area in Fars province with a specific reproductive strategy that has recently been reported to be threatened by extinction. Histological studies on gonads in adults as well as studies on gonadal differentiation aimed to explore their reproductive strategy in more detail. In the reproductive season, fourteen males and females in adult stage were collected from Aliabad Niriz (Fars province). The gonads of the toads before and after mating (spawning and sperm releasing) were dissected and a histological study was carried out. To study gonadal differentiation, larvae at Gosner stage 40, 42, 43, 44 and 46 were selected and appropriate histological slides were prepared. Histology of the gonads in adults when they were in the amplexus situation and just before spawning and releasing sperm, showed a histologically similar image to *Bufotes viridis* that is a common toad that exist widely in the region. While the number of mature oocytes and spermatozoa were shown to be significantly reduced, some active oocytes as well as the bundles of spermatids were still observed in the ovary and testis respectively. The study on the gross anatomy of gonads at early stages of development showed there is no externally morphological difference between gonads in male and female. The semi differentiated pattern was recognized. The gonads in genetically male toads showed that they transformed into testes after degeneration of the oocytes.

Keywords: Gonad, gonadal differentiation, reproductive strategy

چکیده

Bufotes surdus annulatus گونه‌ای اندمیک از ناحیه از استان فارس با استراتژی تولیدمثلی اختصاصی است که گونه مورد تهدید و در خطر انقراض گزارش شده است. مطالعه بافت‌شناسی گنادهای جنسی بالغ و مطالعه تمایز گنادی با هدف یافتن جزئیات بیشتری از استراتژی تولیدمثلی انجام گرفت. در فصل تولیدمثلی تعداد ۱۴ نمونه از جنس بالغ نر و ماده از نیریز استان فارس جمع‌آوری شد. گنادهای جنسی نر و ماده قبل و بعد از تخم‌ریزی و اسپرم‌ریزی تشریح شدند مطالعات بافت‌شناسی بر روی آنها انجام گرفت. برای مطالعه تمایز گنادی، لاروها از مراحل ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴ و ۴۶ Gosner انتخاب شدند و اسلایدهای بافت‌شناسی تهیه شد. بافت‌شناسی گنادها در فرد بالغ در حال آمپلکسوس و درست قبل از تخم‌ریزی و اسپرم‌ریزی نشان داد که از لحاظ بافت‌شناسی مشابه بافت گناد در وزغ (*Bufotes viridis*) بودند. در حالی که تعداد تخم‌های بالغ و اسپرماتوزوآ به میزان قابل توجهی بعد از تخم‌ریزی و اسپرم‌ریزی کاهش یافته بود، اما بعضی اووسیت‌های فعال و همچنین دسته جات اسپرماتید به‌ترتیب در تخمدان و بیضه قابل مشاهده بود. مطالعه بر روی ساختار ظاهری گنادها در مراحل اولیه تکوین گنادی نشان داد که ساختار ظاهری گناد در بین جنس نر و ماده قابل تشخیص نیست. در این گونه، مدل شبه تمایزی گناد تشخیص داده شد. گنادها در بالغین که از لحاظ ژنتیکی نر بودند مشاهده شد که بافت گنادی بعد از این‌که اووسیت‌ها در آن از بین رفتند به بیضه تمایز پیدا کردند.

واژه‌های کلیدی: گناد جنسی، تمایز جنسی، استراتژی تولید مثلی

مقدمه

طبقه‌بندی وزغ‌ها در ایران هنوز کاملاً حل نشده است (Frost, 2014). نام‌های قبلی وزغ‌ها (*Pseudepidalea* و *Bufo*) را در لیست با نام جدید *Bufotes* معرفی می‌نماید. از میان وزغ‌های ایران *Bufotes surdus* که به‌طور کلی دامنه پیدایش و گستره آن نواحی غرب ایران، جنوب ایران و تا شرق ایران تا کوئته پاکستان گزارش گردیده از جمله مواردی است که طبقه بندی آن دچار تغییراتی گردیده است. به عنوان مثال *B. surdus luristanicus* که محل زندگی و یافت آن غرب ایران در کوهپایه‌های زاگرس است زمانی زیرگونه *B. surdus* به حساب می‌آمد، اما شواهد مولکولی نشان داد که *B. s. luristanicus* خود یک گونه مستقل است (Javari & Tork, 2009; Fakharzadeh et al., 2014). با این توصیف هم اکنون *B. surdus* خود شامل دو زیرگونه بنام زیرگونه *B. s. surdus* (وزغ بی‌گوش معمولی) و زیرگونه *B. s. annulatus* (وزغ بی‌گوش خال حلقه‌ای) است. با مروری بر تحقیقات نشان می‌دهد که زیرگونه *B. s. annulatus* که تنها یک نمونه تیپ از مهکویه در استان فارس (۵ کیلومتری شمال مهکویه، ۸۰ کیلومتری جنوب شیراز) از ارتفاع ۱۴۰۰ متری از سطح دریا در تاریخ ۱۹۶۸ میلادی قبلاً گزارش شده بود (Schmidtler & Schmidtler, 1969). به‌تازگی، از محل علی‌آباد در نیریز استان فارس (۲۳۰ کیلومتری جنوب‌شرقی شیراز از ارتفاع ۱۷۹۵ متری از سطح دریا) گزارش گردیده است (Parvaresh et al., 2016). Parvaresh et al. (2016) در این تحقیق به مطالعه ریخت‌سنجی نمونه بالغ و لارو زیرگونه *B. s. annulatus* پرداختند و از جنبه تکوینی و تولیدمثلی نیز به نتایجی دست یافتند که نشان داد در بسیاری خصوصیات کاملاً از *Bufotes viridis* (گونه رایج یافته‌شده در منطقه) متمایزند. در این تحقیق زمان تولیدمثلی در محدوده زمانی یک ماه (از ۲۳ فروردین‌ماه تا ۲۱ اردیبهشت‌ماه) برای این زیرگونه برآورد گردید.

کلاچ‌های تخم به‌صورت تک‌رشته‌ای و در چال‌هایی کم عمق محصور به‌وسیله سنگریزه در کنار آب‌های جاری با سرعت جریان آهسته یافت گردید. میانگین اندازه کلاچ تخم حدود 1031 ± 426 و میانگین قطر تخم‌ها $1/4 \pm 0/18$ mm محاسبه گردید. در بررسی‌های ریخت‌سنجی از افراد بالغ زیرگونه *B. s. annulatus* که از ۲۱ صفات بیومتریکی استفاده و بین جنس نر و ماده مقایسه گردید نشان داد که میانگین طول نر و ماده به‌ترتیب $43/97 \pm 2/9$ mm و $48/31 \pm 2/63$ mm می‌باشد. در ضمن در تعداد معدودی از صفات دیگر از جمله فاصله بین دو چشم و طول اولین انگشت دست اختلاف معنی‌داری را بین جنس نر و ماده نشان داد (جدول ۱).

با توجه به اطلاعات اولیه به‌دست‌آمده از زیرگونه *B. s. annulatus* از جمله ۱- تخم‌ریزی در شرایط اقلیمی، جغرافیایی و اکولوژیکی خاص، ۲- زندگی و تولیدمثل در ناحیه بسیار محدود، ۳- دوره بسیار کوتاه تخم‌ریزی (حدود یک ماه) و ۴- تعداد بسیار کم تخم در هر تخم‌ریزی لازم گردید تا بررسی‌های بیشتری در خصوص سیستم تولیدمثلی این گونه انجام شود.

مطالعه آناتومی و بافت‌شناسی غدد تناسلی در دوزیستان بدون دم

سال‌هاست سیستم تناسلی اغلب گونه‌های دوزیستان بدون دم مورد مطالعه جامع قرار گرفته است. بررسی‌ها نشان داده است که تقریباً بافت‌شناسی غدد تولیدمثلی بیضه و تخمدان در تمامی گونه‌ها از یک مدل تبعیت می‌کنند و یکسان نشان می‌دهند. در ایران آناتومی و بافت‌شناسی غدد تناسلی چهار جمعیت قورباغه مردابی (*Rana ridibunda*) مربوط به چهار منطقه متفاوت در سطح استان فارس توسط Amanat-Behbahani et al. (2014) مطالعه گردیده است. مطالعات بافتی غدد تناسلی در شرایط قبل و بعد از تخم‌ریزی در فرد بالغ نشان داد که فولیکول‌های تخمکی در حال رشد در تخمدان پس از تخم‌ریزی و دسته‌جات اسپرماتید

۳- نوع نیمه تمایز یافته (semidifferentiated) که گندها صرف‌نظر از این که فرد به لحاظ ژنتیکی نر یا ماده باشد به تخمدان متمایز می‌شود (در طی مرحله لاروی یا نزدیک به مرحله نوزادی). سپس تخمدان در فردی که به لحاظ ژنتیکی نر است پس از دژنره شدن تخمدان بافت موجود به بیضه تغییر شکل می‌دهد (مثل *Rana arboreus* و *Rana catesbeiana*). در *R. catesbeiana* هر دو نوع مرسوم یعنی هم نوع تمایز یافته و هم نوع نیمه‌تمایز یافته گزارش گردیده است (Hsu & Liang, 1970).

Falconi et al. (2007) تمایز جنسی گندها را در *Bufo bufo* مورد مطالعه قرار داد. آنها نشان دادند که سلول‌های جنسی صرف نظر از جنس نر و ماده ابتدا تمایل به تمایز به اوئوزن دارند تا بعداً در جنس ماده کامل بشوند اما در نرها از تکوین کامل تخمدان جلوگیری می‌شود. ظاهراً در جنس نر در وزغ‌ها که به‌وسیله بازدارنده‌هایی از تکوین تخمدان در بخش عقب طناب جنسی جلوگیری می‌شود در قسمت جلوی طناب جنسی، بافت دست‌نخورده باقی می‌ماند و همچنان به‌صورت تخمدان و یا اصطلاحاً جوانه تخمدان یا جوانه بیدر (Bider's body) باقی می‌ماند (Zaccanti et al., 1994).

Piprek et al. (2014) با مطالعه روی *B. viridis* و *B. bufo* نشان دادند که بخش جلویی نوار جنسی نسبت به بقیه بخش‌ها با سرعت بیشتری رشد یافتند که بدلیل افزایش تعداد سلول‌های جنسی در مرحله اولیه گنادزایی بود (G29). این افزایش سلول‌های جنسی که در منطقه آینده جسم بیدر اتفاق می‌افتاد ظاهر گناد در حال تکوین را چماقی شکل می‌کرد.

Zaccanti et al. (1997) نشان دادند که جوانه‌های گنادی از یک مرحله اولیه غیرتمایزی می‌گذرند که ساختار آن شامل یک لایه محیطی (قشری) و یک منطقه مرکزی است که به‌وسیله یک حفره گنادی اولیه این دو لایه از هم جدا شده‌اند. لایه محیطی اولیه شامل سلول‌های جنسی اولیه (PGD) و

بعد از اسپرم‌ریزی در بیضه همچنان وجود دارند. آنها پیش بینی نمودند که احتمالاً قورباغه مردابی در فصل تولیدمثل بیش از یک دوره تولیدمثلی داشته باشد. Badpayman Jahromi et al. (2016) نیز نتایج مشابهی در مطالعات بافت‌شناسی غدد تناسلی وزغ سبز (*Bufo viridis*) به‌دست آوردند.

تاکنون گزارشی از مطالعه غدد تناسلی فرد بالغ در هیچ‌کدام از زیرگونه‌های *Bufo surdus* ارائه نگردیده است.

مطالعه تکوینی غدد تناسلی در دوزیستان بدون دم

گندها در دوزیستان بدون دم در مراحل اولیه تکوین در هر دوجنس نر و ماده یکسان به نظر می‌رسند و تفاوتی از لحاظ ساختاری بین گناد جنسی نر و ماده نشان نمی‌دهند. گندها عموماً از مرحله تکوینی G25 با ورود سلول‌های جنسی اولیه به داخل نوار جنسی تکوین را آغاز می‌کنند. تمایز گندها نیز عموماً از مرحله‌ای بین G28 و G35 شروع می‌شود، اگرچه استثنائاً در بعضی گونه‌ها (مثلاً *Rana curtipes*) تمایز جنسی در G25 نیز گزارش شده است (Gramapurohit et al., 2000; Ogielska & Kotusz, 2004).

Gramapurohit et al. (2000) در مقاله تحقیقی خود سه طرح اصلی تمایز جنسی گنادی را معرفی نموده است.

۱- نوع تمایز یافته (differentiated) که گندهای اولیه قبل از تمایز مستقیماً به تخمدان یا بیضه تبدیل می‌شوند (مثل *Bombiana orientalis*, *Xenopus laevis*, *Rana catesbeiana*).

۲- نوع تمایز نیافته (undifferentiated) که در جنس ماده گندهای اولیه قبل از تمایز به تخمدان تبدیل می‌شوند و یا در جنس نر در شرایط اولیه برای دوره‌ای از زمان بدون تمایز می‌مانند و سپس به بیضه متمایز می‌شوند (مثل *Bufo bufo*, *Rana temporaria*).

کامل شد. بعد از دگردیسی تشکیل لوله‌های اسپرم‌ساز در نرهای دو هفتگی مشاهده شد و در نرهای سه ماهه بیضه کامل گردید. در این گونه گناد در مرحله ۲۵ و ۲۶ غیرتمایز یافته بود. در مرحله ۲۷ شروع تمایز تخمدان همراه با ظهور اوئوسیت‌های میوزی بود و در مرحله ۲۸ حفره مرکزی تشکیل گردید. در این مرحله سلول‌های فولیکولی اوئوسیت‌های دیپلوتن را در برگرفته بودند. مرحله ۳۱، اولین فاز رشد فولیکولی مشاهده گردید و تا مرحله ۳۶، همه لاروها تخمدان داشتند.

مواد و روش‌ها

با توجه به این که زیرگونه *B. s. annulatus* بومی ایران است و اطلاعات تکوینی و بیوسیستماتیکی اندکی در مورد آن وجود دارد و در استان فارس بجز از مَهکویه تنها از روستای علی‌آباد نیریز اخیراً گزارش گردیده است، به همین دلیل منطقه علی‌آباد نیریز برای نمونه‌گیری انتخاب گردید. لازم به توضیح است که تلاش برای یافتن مجدد نمونه‌های دیگری از این زیرگونه از منطقه مَهکویه استان فارس که قبلاً برای اولین بار نمونه تیپ گزارش شده بود علیرغم انجام چندین ماموریت موفق نگردید.

براساس اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی در ارتباط با پراکنش گونه‌های مختلف دوزیستان در استان فارس، منطقه علی‌آباد نیریز تنها منطقه مناسب و قابل دسترسی برای جمع‌آوری گونه *B. s. annulatus* تشخیص داده شد.

خصوصیات زیستگاه جمع‌آوری نمونه

محیط طبیعی نمونه‌برداری جزو منطقه دست‌نخورده‌ای در امتداد یک رودخانه فصلی کوهستانی در منطقه علی‌آباد نیریز است که جوشش چشمه‌های متعددی از کوه و کف رودخانه در مسیر آن حوضچه‌ها و جویبارهایی را به‌وجود آورده است به نحوی که در ادامه مسیر رودخانه، جویبارها بهم

اوئوگونی‌های در حال میوزی است. در بعضی از گونه‌ها حیوان از هر نوع جنسی که به لحاظ ژنتیکی باشد، این حالت اولیه غیرتمایزی به نوع تخمدان غیرتمایز یافته ثانویه تکوین پیدا می‌کند، که در اوئوسیت‌ها قشر تمایز یافته‌اند و در فاز دیپلوتن در مرحله تقسیم اول میوز هستند (Falconi et al., 2001).

Haczkiwicz & Ogielska (2013) تمایز بیضه را در بعضی از گونه‌هایی که از نوع مدل گنادی غیرتمایز یافته تبعیت می‌کردند از جمله *Hyla arborea*، *R. tempreria* و *Pelophylax lessonae* مورد بررسی قرار دادند. آنها بر این اساس نتیجه گرفتند که تمایز بیضه نتیجه تقابل دو فرآیند است؛ دژنره‌شدن بخش عقبی طناب جنسی و تکوین بخش جلویی آن که در نهایت بیضه فعال را به‌وجود می‌آورد. در واقع گناد غیر تمایز یافته بدون عبور از مرحله انتقالی به‌طور مستقیم به بیضه تمایز می‌یابد. آنها تکوین بیضه را به ده مرحله تقسیم کردند. مرحله ۱ الی ۳ که گناد، تمایز نیافته بود و مرحله ۴ تا ۱۰ که تمایز به بیضه کامل شده بود. آنها اولین علائم تمایز بیضه را در لاروهای چهار الی پنج هفتگی در مرحله G27-28 مشاهده نمودند.

Haczkiwicz & Ogielska (2013) در کنار گونه‌های *Hyla arborea*، *R. temporaria* و *P. lessonae* که از طرح گنادی تمایز یافته تبعیت می‌کردند، طرح مشابهی را یعنی تمایز گناد مستقیم به تخمدان و یا به بیضه را در نه گونه متعلق به پنج خانواده به‌عنوان مثال در *Bombina*، *Pelobates fascus*، *B. viridis* و *bombina* یافتند.

Phuge & Gronapurohit (2013) تمایز جنسی و تکوین گناد را تا زمان بلوغ در گونه *Euphylyctis cyanophlyctis* مورد مطالعه قرار دادند. در این گونه بیضه به‌طور غیرمستقیم از تخمدان تمایز پیدا کرد. دژنره‌شدن اوئوسیت از مرحله G37 به بعد مشاهده شد و این دژنره شدن تا اوج دگردیسی ادامه یافت و

توجه به صعب‌العبور بودن منطقه و نبود هیچ‌گونه جاده‌ای در طول مسیر رودخانه، امکان جستجو برای جمع‌آوری نمونه در شب به‌جز یک مورد فراهم نگردید. در این یک مورد ماموریت که در آغاز تاریکی شب انجام گرفت تنها تعداد انگشت شماری از نمونه‌های بالغ در دامنه پایین کوه جمع‌آوری گردید. در مجموع تعداد ۱۴ نمونه بالغ طی سه مرتبه ماموریت در تاریخ‌های ۲۲ و ۲۹ فروردین و ۱۷ اردیبهشت ۱۳۹۰ جمع‌آوری و سپس به آزمایشگاه منتقل گردید. طول نمونه‌های بالغ به کمک کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر و وزن نمونه‌ها با ترازوی دیجیتال مدل ES202 BEC با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند. نمونه‌ها در محیط آزمایشگاه در درون آکواریوم نگهداری و تا انجام آزمایش‌های بعدی به‌وسیله مگس سرکه تغذیه گردیدند. هیچ‌کدام از جفت‌های منتقل‌شده به آزمایشگاه در درون آکواریوم تخم‌ریزی نمودند.

پیوسته و به رودخانه تبدیل می‌شود. با توجه به افزایش شدت جریان آب در امتداد مسیر، تنها بخش اولیه مسیر رودخانه که طول آن از ۳۰۰ متر تجاوز نمی‌کند محیط مناسبی را برای زیستگاه این دوزیست فراهم آورده است. به همین دلیل بیشتر نمونه‌های تخم، لاروها و نمونه‌های بالغ در این محدوده یافت و جمع‌آوری گردید.

جمع‌آوری نمونه‌های بالغ از محیط جهت مطالعه بافتی غدد جنسی

بیشتر نمونه‌های بالغ زیرگونه *B. s. annulatus* در ساعات اولیه روز در حالی که هنوز جفت نر و ماده در حالت آمپلکسوس و در کنار کلاچ‌های تخم تازه ریخته شده بودند، به کمک دست جمع‌آوری گردیدند. بعضی از نمونه‌های بالغ نیز به‌صورت تکی جمع‌آوری شدند. محل جمع‌آوری بعضی از وزغ‌ها نیز در زیر سایه تخته سنگ‌ها و یا در حفرات کنده‌های درخت بود. با

جدول ۱. صفات اندازه‌گیری‌شده بر روی گونه *Bufo surdus annulatus*

تعریف	علامت اختصاری
فاصله بین دو چشم	IS (Interorbital Space)
فاصله بین منافذ بینی	ID (Interarial Distance)
حداقل فاصله منافذ بینی تا نوک پوزه	MDNS (Minimum Distance from Nostril opening to tip of Snout)
عرض پلک بالایی	WUE (Width of Upper Eye-lid)
طول پوزه تا اوروستیل	SU (Snout to Urostyle)
عرض سر	WH (Width of Head)
طول سر	LH (Length of Head)
قطر عمودی پرده صماخ	VDT (Vertical Diameter of Tympanum)
قطر افقی چشم	HDE (Horizontal Diameter of the Eye)
حداقل فاصله منافذ بینی تا گوشه قدامی چشم	MDNE (Minimum Distance from Nostril opening to anterior corner of Eye)
طول بازو تا مچ	LAW (Length of Arm to Wrist)
طول دست	LoH (Length of hand)
عرض اولین انگشت دست	WFFH (Width of First Finger of Hand)
طول اولین انگشت دست	LFFH (Length of First Finger of Hand)
طول اندام عقبی تا مفصل tibio- tarsal	LHL (Length of hind limb to tibio-tarsal articulation)
طول ساق پا	LT (Length of Tarsus)
طول توپرکول‌های داخلی کف پا	LMT (Length of Metatarsal Tubercle(s))
پرده بین انگشتان پا	W (webbing)
طول پا	LF (Length of Foot)
کمترین فاصله چشم تا پرده صماخ	MET (Minimum distance from the Eye to the Tympanum)
درازای آرواره	EM (Elongation of Mandible)
طول کل بدن	TL (Total Length)

جمع‌آوری نمونه‌های لاروی

با توجه به اطلاعات موجود از لاروهای وزغ سبز که تکوین گنادها از مرحله ۲۵ به بعد شکل می‌گیرند و تکوین را آغاز می‌نمایند، لذا جهت اطمینان از شکل‌گیری گنادهای جنسی در لارو زیرگونه *B. s. annulatus*، نمونه‌های لارو از مراحل ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴ و مرحله ۴۶ تکوینی از محیط جمع‌آوری گردیدند.

لازم به توضیح است که نمونه‌های تخم انتقال یافته به آزمایشگاه، مراحل تکوین را تا مرحله ۲۵ ادامه می‌دادند و در این مرحله متوقف و یا ادامه تکوین آنها به مرحله بعدی به کندی انجام می‌گرفت، به همین منظور جمع‌آوری نمونه‌های لاروی از مرحله ۲۵ به بعد به‌طور مستقیم از محیط انجام گردید. در مواردی نیز مراحل پیشرفته لاروی بعد از مرحله ۲۵ که از محیط جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل می‌گردیدند قادر بودند مراحل پیشرفته‌تری از تکوین را در آکواریوم طی نمایند که بدین صورت از این نمونه‌ها نیز استفاده گردید.

نحوه مطالعه ظاهری و بافت‌شناسی غدد تناسلی در افراد بالغ و لاروها

نمونه‌های بالغ پس از بیهوشی با اتر در بوئن فیکس شدند. تعداد ۱۴ عدد از نمونه‌های فیکس شده بالغ جنس نر و ماده از ناحیه شکم تشریح و قبل از خارج نمودن غدد تناسلی، در موقعیت خود در درون بدن به کمک میکروسکوپ تشریحی مطالعه و تصویربرداری گردیدند. سپس غدد تناسلی از بدن خارج و به اندازه ۵ میلی متر از گناد جنسی نر و ماده از بقیه بافت جدا و برای انجام مراحل بافت‌شناسی آماده گردید.

تعداد یک عدد از هر مرحله لاروی نیز پس از فیکس شدن در محلول بوئن با استفاده از میکروسکوپ تشریحی، تشریح و پس از مطالعه ظاهری گناد جنسی در موضع خود، گناد را از بدن جدا و جهت انجام مراحل بافت‌شناسی آماده شدند. لازم به توضیح است با توجه به کوچک بودن گنادها در مرحله لاروی و مشکلات ناشی

از تشریح، جهت اطمینان بیشتر، از نمونه کامل لارو برای مطالعه بافتی غدد تناسلی استفاده گردید. در این روش دم لارو ابتدا جدا شد و قسمت سر به همراه تنه برای انجام مراحل بافتی انتخاب گردید. شروع مقطع‌گیری از محل قطع دم که نزدیک به موضع گنادهای جنسی بود انجام شد.

نمونه‌های فیکس شده از کلیه مراحل آماده‌سازی بافت شامل آب‌گیری، شفاف‌سازی، قالب‌گیری و برش‌گیری (۷ میکرون) عبور داده شدند و سپس به کمک هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی گردیدند (Bancroft, 1962; Gorr, 1991). پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی، مقاطع بافتی بیضه و تخمدان و در لاروها به‌طور کلی مراحل رسیدگی گنادها با استفاده از میکروسکوپ موردبررسی قرار گرفتند. در مورد بیضه‌ها صفاتی مثل وضعیت کلی لوله‌های اسپرم‌ساز، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، اسپرماتید و اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. در مورد تخمدان نیز بافت کلی تخمدان و وضعیت اوئوسیت‌ها و مرحله رسیدگی آنها مورد مطالعه قرار گرفت. در ادامه با کمک میکروسکوپ نوری دوربین دار از برش‌های بافتی عکس تهیه گردید.

نتایج

مطالعات مورفولوژی، آناتومی، و بافتی گناد لاروها

مورفولوژی و آناتومی گنادها

گناد لاروهای تشریح شده همگی دارای ظاهری تقریباً بیضی شکل بودند و تفاوتی از لحاظ جنسیت در مورفولوژی گنادها مشاهده نشد و تنها پس از تهیه مقاطع بافتی تمایز جنسی آنها را تشخیص دادیم.

بافت‌شناسی گنادها

با توجه به این‌که شروع تکوین گنادها در بیشتر گونه‌های دوزیستان بدون دم از مرحله ۲۵ به بعد است. لذا جهت اطمینان بیشتر از تکوین گناد، لاروهای *B. s. annulatus* از مراحل ۴۰، ۴۲، ۴۳ و ۴۴ جدول Gosner جهت انجام این مطالعات انتخاب شدند.

جدول ۲. بعضی از تفاوت‌های مهم در پراکنش تولیدمثلی و خصوصیات فردی بین گونه *Bufotes viridis* و گونه*Bufotes surdus annulatus*

دوره تخمک ریزی	طول فرد بالغ (پوزه تا مخرج) (mm)	قطر تخم (mm)	شکل کلاچ تخم	اندازه کلاچ تخم	پراکنش
اواخر زمستان (پهمن‌ماه) تا اوایل تابستان (تیرماه)	۷۰/۴۱±۶/۰۲	۱/۴۵	دو زنجیره‌ای	۶۶۶۱±۱۳۳۶	وسیع از اروپا (فرانسه) تا آسیای مرکزی تا شمال آفریقا و جزایر مدیترانه
اواخر فروردین‌ماه (۲۳ فروردین‌ماه) تا اواخر اردیبهشت‌ماه (۲۱ اردیبهشت‌ماه)	۴۸/۳۱±۲/۶۳	۱/۴۵	تک‌زنجیره‌ای	۱۰۳۱±۴۲۶	علی‌آباد نیریز فارس (سابقاً از مهنکویه استان فارس گزارش شده بود)

به کلیه‌ها وصل شده‌اند (شکل ۲) و همین اتصال، لوله‌های وایران از بیضه‌ها را به سمت کلیه پشتیبانی می‌کند. بیضه‌ها در قسمت نیمه بالایی کلیه‌ها و در بخش شکمی بدن قرار گرفته‌اند.

بافت‌شناسی بیضه

بیضه به‌طور معمول از تعداد زیادی لوله‌های اسپرم‌ساز که در مقاطع تقریباً دایره‌ای با حد و مرز مشخص دیده می‌شود تشکیل شده است. در هر لوله اسپرم‌ساز دستجاتی از انواع مختلف سلول‌ها شامل دستجات اسپرماتوگونیوم‌ها، دستجات اسپرماتوسیت‌های اولیه، اسپرماتوسیت‌های ثانویه، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوئیدها در پیرامون لوله اسپرم‌ساز دیده می‌شود. وجود اسپرماتوزوئیدهای نزدیک به هم در دستجاتی نزدیک به حفره مرکزی لوله‌های اسپرم‌ساز، رسیدگی همزمان اسپرم‌ها را در هر دسته نشان می‌دهد. در کل در بافت بیضه قبل از اسپرم‌ریزی، دسته جات اسپرماتوزوئید نسبت به دیگر دسته‌های سلول (اسپرماتوگونیوم، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه و اسپرماتید) بیشتر دیده شد (شکل ۳-الف و ب).

دستگاه تولیدمثلی ماده بالغ

مورفولوژی و آناتومی تخمدان

آناتومی تخمدان در وزغ ماده تشریح شده در شکل ۴ نشان داده شده است. تخمدان‌های وزغ زیرگونه *B.s.annulatus* قبل از تخم‌ریزی ظاهری حجیم و پر از تخمک نشان می‌دهد.

مطالعه مقاطع بافتی از گناد لارو مراحل مختلف تکوینی نشان داد که الف) در مراحل اولیه تکوین، تنها تخمدان محتوی ائوسیت‌ها با اندازه‌های مختلف شکل می‌گیرد، ب) در مرحله ۴۰، ائوسیت‌ها به‌وسیله یک لایه سلول‌های فولیکولی از نوع سنگ‌فرشی به‌صورت ناپیوسته در اطراف ائوسیت‌ها قرار می‌گیرند. هسته‌ها به‌طور عمده تک‌هستکی و حجم سیتوپلاسم نسبت به هسته کم است، ج) در مرحله ۴۲، ائوسیت‌ها بزرگ‌تر شده‌اند. سلول‌های فولیکولی به‌صورت سنگ‌فرشی نزدیک به مکعبی و به‌طور پیوسته در اطراف هر ائوسیت دیده می‌شود. حجم سیتوپلاسم به نسبت هسته افزایش یافته است، د) در مرحله ۴۳ تعداد هستک‌ها در درون هسته در حال افزایش است و استرومای بین ائوسیت‌ها ظاهری فشرده‌تر دارد و افزایش یافته است، ه) در مرحله ۴۴ ائوسیت‌ها تکثیر می‌یابند و تعداد زیادی سلول‌های سوماتیک (سلول‌های فولیکولی آینده) در مرکز کیسه تخمدانی دیده می‌شود.

مقاطع بافتی از گناد جنسی لارو در مراحل مختلف تکوین در شکل ۱ نشان داده شده است. در این تصاویر، اندازه ائوسیت‌ها که طی مراحل تکوینی بزرگ‌تر شده‌اند دیده می‌شود.

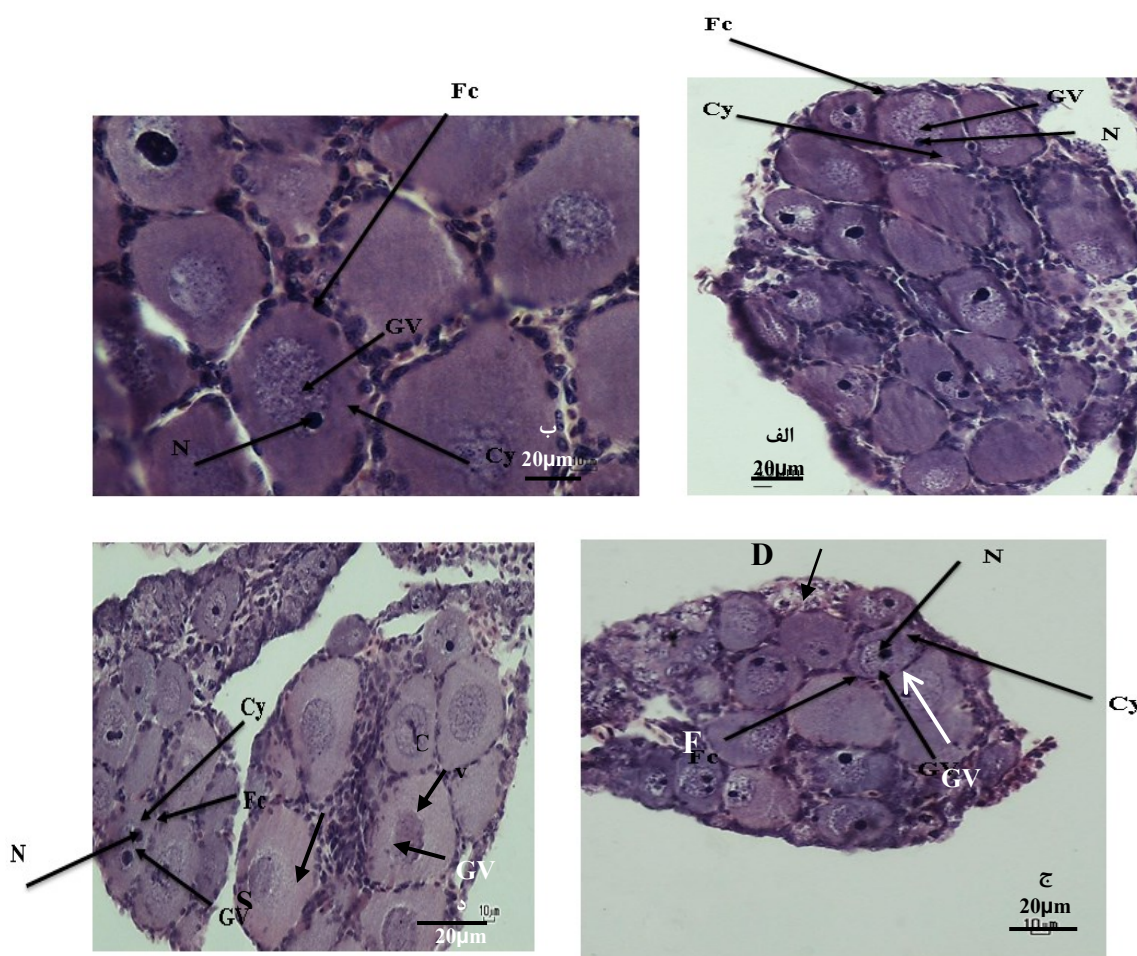
دستگاه تولیدمثلی وزغ‌های بالغ زیرگونه

B. s. annulatus

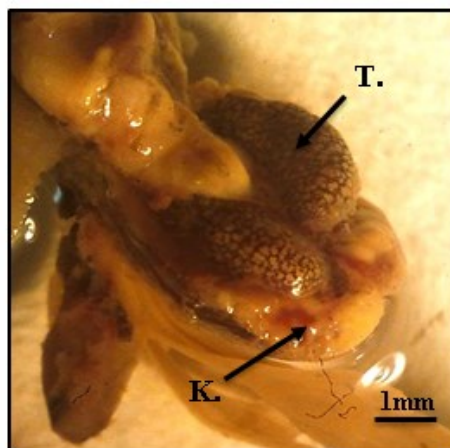
دستگاه تولیدمثلی نر بالغ

مورفولوژی و آناتومی بیضه

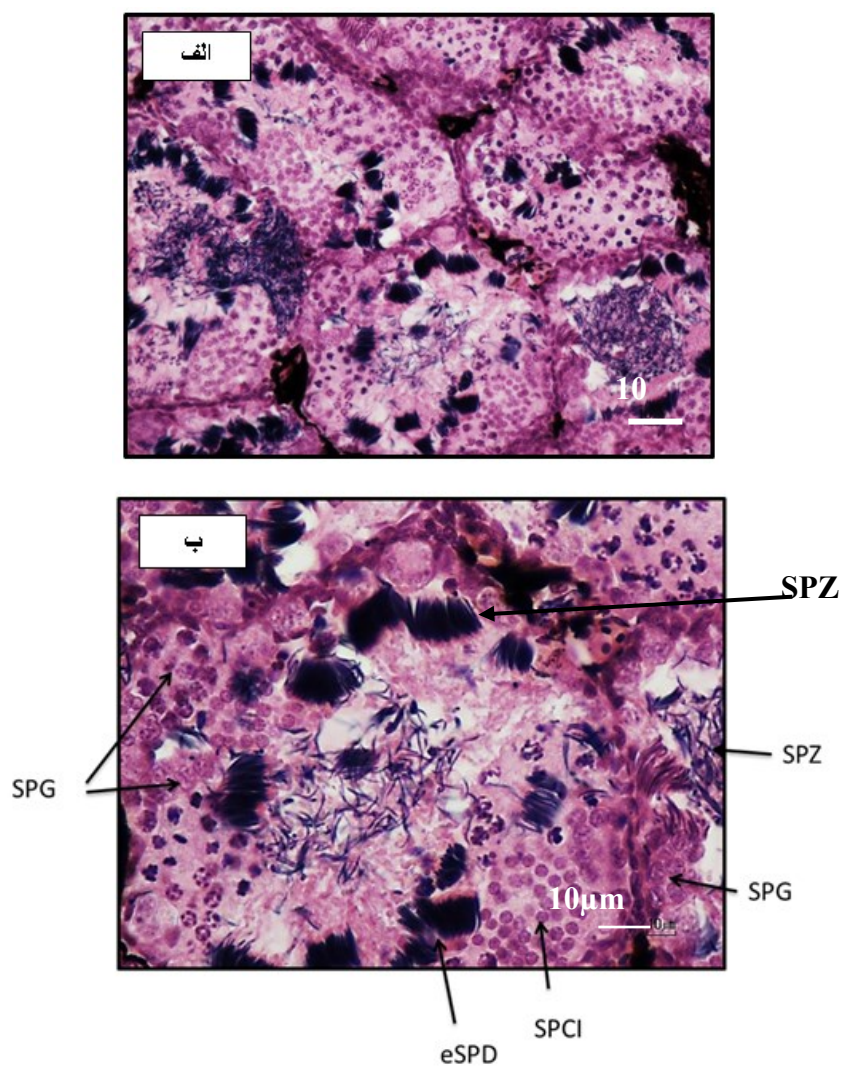
بیضه‌ها به‌صورت جفت با ظاهری کشیده و زمینه‌ای زرد رنگ با خطوط تیره به وسیله غشا mesorchium



شکل ۱. مقاطع بافتی عرضی از گناد لاروهای مراحل مختلف زیرگونه *Bufo surdus annulatus* با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (الف) مرحله G40، در این شکل ائوسیت‌ها فشرده و سلول‌های فولیکولی هنوز کاملاً در اطراف تخمک‌ها مستقر نشده‌اند، (ب) مرحله G42، سلول‌های فولیکولی در حال محصور کردن تخمک‌ها می‌باشند ائوسیت‌ها تا حدی رشد یافته هستند، (ج) مرحله G43، هستک‌ها در حال تکثیر و افزایش در درون هسته هستند، (د) مرحله G44، دو کیسه تخمدانی در شکل دیده می‌شود، بعضی ائوسیت‌های در حال تکثیر مشاهده می‌شوند و تعداد زیادی سلول‌های سوماتیک (سلول‌های فولیکولی آینده) در مرکز کیسه تخمدانی دیده می‌شود. سیتوپلاسم (Cytoplasm=Cy)، سلول‌های فولیکولی (Follicular cells=Fc)، هستک (Nucleolous=N)، هسته (Germinal Vesicle=GV)، ائوسیت‌های دژنره شده (Degenerated Oocyte=DO)، استروما (Stroma=S)



شکل ۲. بیضه تشریح شده وزغ بالغ زیرگونه *Bufo surdus annulatus*. بیضه (T=Testis)، کلیه (K=Kidney)



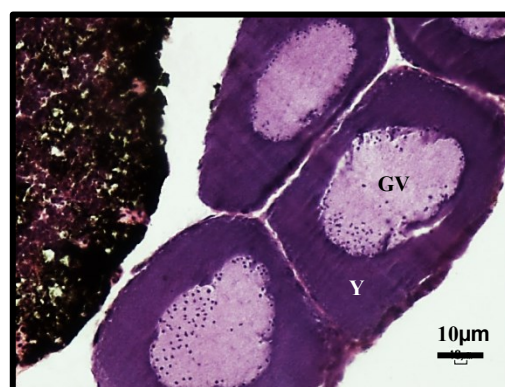
شکل ۳. مقاطع بافتی از بیضه در مرحله پیش از اسپرم‌ریزی با بزرگنمایی پایین (الف) و بزرگنمایی بالا (ب) در جنس نر بالغ *Bufo surdus annulatus* زیرگونه (Spermatogonium=SPG)، (Spermatozoid= SPZ)، (Spermatocyte = SPCI و (elongated spermatid = eSPD). Primary)



شکل ۴. تخمدان تشریح‌شده وزغ بالغ زیرگونه *Bufo surdus annulatus* پیش از تخم‌ریزی

بافت‌شناسی تخمدان

درفصل تولیدمثل پس از تشریح وزغ‌های بالغ ماده و بیرون آوردن تخمدان آنها، مقاطع بافتی از تخمدان تهیه گردید که در اشکال زیر نشان داده شده است. پیش از تخم‌ریزی، تخمدان‌ها شامل تعداد زیادی اووسیت‌های درشت محتوی زرده زیاد هستند. تخمک‌ها اتصال نزدیکتری به هم داشته و به شکل چندوجهی دیده می‌شوند و آرایش موزاییکی دارند (شکل ۵).



شکل ۵. مقطع بافتی تخمدان نمونه بالغ زیرگونه *Bufotes surdus annulatus* پیش از تخم‌ریزی، هسته (Germinal Vesicle=GV)، زرده (Yolk=Y)

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه بر روی زیستگاه *Bufotes surdus annulatus* و همچنین اطلاعات به‌دست‌آمده از اندازه طول افراد بالغ و استراتژی تولیدمثلی در این زیرگونه از جمله تولید تخمک‌های تک‌زنجیره‌ای، اندازه کوچک کلاچ تخم و در مواردی دو قسمتی‌بودن کلاچ، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این زیرگونه با وزغ سبز (*Bufotes viridis*) تفاوت‌های زیادی دارد. جدول ۲ مهمترین تفاوت‌ها را نشان می‌دهد.

تولیدمثل خاص زیرگونه *B. s. annulatus* و ویژگی‌های مشخص اکولوژیکی این زیرگونه به‌علاوه استراتژی تولیدمثلی منحصر به فرد آن به همراه پراکنش بسیار محدود در مقایسه با *B. viridis*، این زیرگونه را از بسیاری جهات می‌بایست جزو زیرگونه در معرض

خطر جدی قرار داد. محدود و معدودبودن مکان تخم‌ریزی *P. surdus* از یک‌طرف (تنها مشاهده شده در منطقه علی‌آباد نیریز و گزارش شده از مهکویه) و کوتاه‌بودن فصل تولیدمثل از طرف دیگر اهمیت مطالعه این نمونه و حفاظت از این گونه منحصر و در معرض تهدید و انقراض را بیشتر می‌نماید. همه این نتایج حاکی از این است که شرایط ویژه اکولوژیکی جهت تخم‌ریزی این گونه مورد نیاز است. کوچک‌بودن اندازه کلاچ و این که به‌طور قطع با توجه به محدودبودن فصل تولیدمثلی هر ماده فقط یک بار تخم‌ریزی می‌نماید، لذا کوچک‌بودن اندازه کلاچ عامل هشدارآمیز دیگری در جهت تهدید این گونه می‌تواند باشد.

در گزارش IUCN (2015) فقط به اطلاعات کلی در ارتباط با گونه *Bufotes surdus* بسنده شده است و با توجه به این که زیرگونه *B. s. annulatus* نیز در این طبقه‌بندی قرار می‌گیرد، اما در این گزارش بدون ذکر نام این زیرگونه مجموعاً گونه *B. surdus* را دارای پراکنش وسیع در نظر گرفته و آن را جزو گونه در معرض خطر قرار نداده است. لذا به نظر می‌رسد، اگر زیرگونه‌ها به‌طور مستقل بررسی گردد، به‌طور قطع زیرگونه *B. s. annulatus* جزو زیرگونه‌هایی است که در معرض خطر بودن آن مسلم و آشکار است. با این وجود از زیرگونه دیگر *B. surdus* یعنی *B. s. surdus* اطلاعات چندانی در دست نیست و صرفاً اطلاعاتی کلی در ارتباط با پراکنش این زیرگونه گزارش شده است، لذا ضروری به‌نظر می‌رسد که مطالعات جامعی از استراتژی تولیدمثلی زیرگونه *B. s. surdus* نیز به عمل آید تا تفسیر درست‌تری از وضعیت بقاء گونه *B. surdus* به‌دست آید. بر خلاف پرورش لارو گونه *B. viridis* که به راحتی در محیط آزمایشگاه قابل انجام است و مشکلی در تداوم تکوین تا مرحله دگردیسی وجود ندارد، ادامه تکوین لارو زیرگونه *B. s. annulatus* از مرحله G25 امکان‌پذیر نبود. لذا به نظر می‌رسد تکثیر تخم‌های *B. s. annulatus* در شرایط خاص

دو، دو مجرای تخمک‌بر مشخص وجود داشت و لذا احتمالاً تولید تخمک‌های تک‌زنجیره‌ای به دلیل آزاد شدن تخمک‌ها از مجرای تخمک‌بر به‌طور یک در میان، هر بار از یک تخمدان آزاد شده باشد و احتمالاً وجود دو کلاچ تک‌زنجیره‌ای تخم در بعضی از موارد نیز به همین دلیل باشد. چگونگی و مکانیسم این نوع آزاد شدن تخمک‌ها نیاز به بررسی بیشتری دارد. به نظر می‌رسد استراتژی آزاد شدن تخمک‌ها به‌طور تک‌زنجیره‌ای و به‌دنبال آن در مواردی دو قسمتی مزایایی از جمله دسترسی بیشتر تخمک‌ها به اکسیژن فراهم نماید که با توجه به میزان تولید کم تخمک می‌تواند نوعی سازگاری برای ارتقاء کیفی تخمک‌ها و در نتیجه بقاء حداکثری تخمک‌ها محسوب شود.

مطالعه گناد در لاروها

نتایج مشاهدات مورفولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ تشریحی نشان داد که شکل ظاهری گندها (صرف‌نظر از جنسیت حیوان) در تمامی لاروهای مورد مطالعه و تشریح شده (مراحل لاروی G40، G42، G43، G44 و تقریباً بیضی شکل و یکسان بود. بنابراین بررسی تمایز جنسی لاروها تنها با تهیه مقاطع بافتی از گندها امکان‌پذیر بود. در تمامی گندهای تشریح شده از مراحل لاروی مختلف نشان داد که تنها بافت تخمدان در حال تمایز است و در مرحله G44، رشد پیشرفته‌تری از ائوسیت‌ها در درون تخمدان لوبوله شده دیده می‌شود. Gramapurohit *et al.* (2000) و Ogielska & Kotusz (2004) گزارش کردند که تمایز گندها در دوزیستان بدون دم عموماً در بین مراحل G28 و G35 شروع می‌شود.

Phuge & Gronap (2013) با مطالعه بر روی *Euphlyctis* تمایز جنسی و تکوین گناد گونه *cyanophlyctis* تمایز جنسی و تکوین گناد گونه *cyanophlyctis* نشان دادند که بیضه به‌طور غیرمستقیم از تخمدان تمایز پیدا کرد. آنها همچنین

اکولوژیکی و محیط طبیعی خود انجام می‌گیرد. این شرایط خاص از جمله ترکیبات شیمیایی آب محیط، نوع تغذیه خاص، ارتفاع منطقه و شرایط فیزیولوژیکی و تولیدمثلی افراد زیرگونه *B. s. annulatus* است که می‌تواند در تداوم تکوین تعیین‌کننده باشد. به همین منظور زمانی که Parvaresh *et al.* (2016) لارو پیشرفته را به همراه آب و جلبک‌های محیط طبیعی به آکواریوم در آزمایشگاه منتقل کردند درجاتی از تداوم تکوین را به همراه داشت.

مطالعات بافت‌شناسی تخمدان در زیرگونه *B. s. annulatus* نشان داد که ساختار تخمدان از مدلی تبعیت می‌کند که در زیرگونه‌های دیگر دوزیستان بدون دم از جمله *B. viridis* است (بافت‌شناسی بیضه هم ساختاری مشابه بیضه در دیگر دوزیستان بدون دم نشان داد). در ارتباط با گناد تولیدمثلی ماده بدیهی است میزان تولید تخمک در تخمدان تابعی از اندازه طول افراد بالغ ماده است. بدین ترتیب با توجه به کوچک‌تر بودن طول بدن فرد ماده در زیرگونه *B.s.annulatus* ($48/31 \pm 2/63 \text{ mm}$) در مقایسه با طول بدن فرد ماده در گونه *B. viridis* ($70/41 \pm 6/02 \text{ mm}$) انتظار می‌رود میزان تولید تخم در *B. s. annulatus* یعنی اندازه کلاچ تخم (1031 ± 426) تا حدودی کمتر از اندازه کلاچ تخم در *B. viridis* ($6661 \pm 1336 \text{ mm}$) نشان دهد، اما در این مطالعه نشان داد که این کاهش اندازه کلاچ تخم بسیار بیشتر از انتظار است. با توجه به این که اندازه قطر تخم در *B. viridis* در مقایسه با قطر تخم در *B. s. annulatus* اختلافی وجود ندارد و در هر دو حدود $1/45 \text{ mm}$ می‌باشد، لذا به‌نظر می‌رسد قدرت تولیدمثلی *B. s. annulatus* بسیار کمتر از قدرت تولیدمثلی *B. viridis* باشد.

مطالعه آناتومیک اندام تولیدمثلی فرد بالغ ماده *B.s.annulatus* نیز تفاوتی با اندام تولیدمثلی ماده سایر گروه‌های دوزیستان بدون دم نداشت و در هر

سلول‌های ائوسیتی با درجاتی از تکوین وجود دارند این احتمال نیز وجود دارد که تمایز گنادی در مراحل پیشرفته‌تری از لارو در مقایسه با طرح عمومی تمایز اتفاق افتاده باشد. بر این اساس ممکن است از الگوی به تعویق افتاده (retarded) تبعیت کرده باشد (Kotusz & Ogielska, 2004).

Kotusz & Ogielska (2004) در مطالعه بر روی تکوین و تمایز گنادی در ۱۲ گونه از ۶ خانواده دوزیستان بدون دم، جنس *Bufo* را در طبقه‌بندی جزء گروه‌هایی قرار دادند که از الگوی به تعویق افتاده تبعیت می‌کنند.

از طرفی در مطالعات تکوین و تمایز جنسی گناد در گونه‌های مختلف جنس *Bufo* نشان می‌دهد که اعضای این گونه همگی از یک مدل تمایزی گناد پیروی نمی‌نمایند.

Gramapurohit *et al.* (2000) گزارش دادند که تمایز گناد جنسی در *Bufo bufo* از نوع غیرتمایزیافته (undifferentiated) می‌باشد که در آن گنادهای اولیه قبل از تمایز به تخمدان تبدیل می‌شوند و یا در شرایط اولیه برای دوره‌ای از زمان می‌مانند و بعد به بیضه تبدیل می‌شوند. از طرفی دیگر Haczkiwicz & Ogielska (2013) گزارش دادند که دو گونه *B. viridis* و *B. bufo* از الگوی تمایزیافته (differentiated) یعنی تمایز مستقیم گناد غیرتمایز یافته یا به تخمدان و یا به بیضه تبعیت می‌نمایند. آنها بعضی از گونه‌های Ranidae و Hylidae را هم در این طبقه قرار دادند. با توجه به یافته این تحقیق و مقایسه با تحقیقات گذشته می‌توان نتیجه‌گیری کرد که الگوی تمایز گنادی در *B. s. annulatus* متفاوت از *B. viridis* می‌باشد. بدین ترتیب با درجاتی از اطمینان می‌توان گفت که الگوهای تمایزی گنادی جدا از طبقه‌بندی‌های سیستماتیک است و احتمالاً در هر گونه براساس شرایط فیزیولوژیکی و ژنتیکی همان گونه رفتار می‌گردد.

نشان دادند که در لاروهای به‌طور ژنتیکی نر، ائوسیت‌های تخمدان تشکیل شده از مرحله G37 شروع به دژنره شدن کردند و بعداً در اوج دگرذیسی و بعد از آن در نهایت گناد جنسی نر جایگزین گردید. در کار تحقیقی حاضر و با مشاهده درجاتی از تکوین تخمدان در مراحل بین G40 تا G44 به‌نظر می‌رسد از طرح اصلی نیمه‌تمایزیافته (semidifferentiated) که گنادها صرف‌نظر از این‌که فرد به لحاظ ژنتیکی نر یا ماده باشد به تخمدان متمایز می‌شود تبعیت می‌کند (Witschi, 1921; Gramapurohit *et al.*, 2000).

از بین لاروهای مورد مطالعه در این تحقیق، احتمالاً لارو مورد مطالعه در مرحله G43 به لحاظ ژنتیکی نر باشد. در مطالعه بافتی این گناد آثاری از دژنره شدن ائوسیت‌ها در تخمدان مشاهده می‌شود که به نظر می‌رسد سپس بافت بیضه‌ای جایگزین گردد. با توجه به ظاهر لوبوله‌بودن تخمدان و وجود ائوسیت‌های پیشرفته در لارو مورد مطالعه در مرحله ۴۴، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این لارو به لحاظ ژنتیکی احتمالاً ماده است. گزارشات قبلی در ارتباط با مطالعه تمایزی گنادهای جنسی در بسیاری از گونه‌های دوزیستان بدون دم نشان داد که در مرحله G44 قانداً گناد جنسی تا حدود زیادی تمایز خود را به سمت جنس نر یا ماده باید نشان داده باشد (Phuge & Gronap, 2013; Kotusz & Ogielska, 2004).

از مشاهدات بافتی تخمدان در لاروهای G42 و G43 می‌توان نتیجه گرفت که با استناد به گزارش محققان قبلی لارو به لحاظ ژنتیکی ماده است و سیر تکوین تخمدانی ادامه دارد و یا لارو به لحاظ ژنتیکی نر است و دژنره شدن ائوسیت‌ها در مقایسه با الگوهای گزارش شده از گونه‌های دیگر با تاخیر انجام می‌شود.

لذا با توجه به این‌که در تمامی گنادهای مورد مطالعه در این تحقیق از لاروهای مراحل بعد از G35 می‌باشد و از طرفی در تمامی گنادها

REFERENCES

- Amanat-Behbahani, M.; Nokhbatolfoghahai, M.; Esmaili, H. R. (2014) Intraspecific variation in *Pelophylax ridibunda* (*Rana ridibunda*) in southern Iran: life history and developmental patterns. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*; 10: 11-28.
- Badpayman Jahromi, M.; Nokhbatolfoghahai, M.; Esmaili, H. R. (2016) Intra-specific variation in *Pseudepidalea viridis* in Fars Province, Iran: Life history and development patterns. *Iran. J. SCI. Technol. Trans. Sci*; 995-016.
- Balleto, E.; Cherchi, M.A.; Gasperetti, J. (1985). Amphibians of the Arabian Peninsula. *Fauna of Saudi Arabia*; 7: 318-392.
- Bancroft, J. D. (1991) Theory and Practice of Histological Techniques. *Churchil Livingstone, New York*; 726P.
- Fahkarzadeh, F.; Darvish, J.; Kami, H.G.; Ghasemzadeh, F.; Rastegar-Pouyani, E. (2014) New karyological and morphometric data on poorly known *Bufo surdus* and *Bufo luristanicus* in comparison with data of diploid green toads of the *Bufo viridis* complex from south of Iran. *Asian Herpetological Research*; 5: 168-178.
- Falconi, R.; Petrini, S.; Quaglia, A.; Zaccanti, F. (2001) Fine structure of undifferentiated gonads in *Rana dalmatina* tadpoles. *Italian journal of zoology*; 68:15-21.
- Falconi, R.; Dalpiaz, D.; Zaccanti, F. (2004) Ultra structural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibian: Anura) sex differentiation. *Journal of Experimental Zoology*; 301A: 378-388.
- Falconi, R.; Dalpiaz, D.; Zaccanti, F. (2007) Morphological aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia: Anura): Bidder's organ differentiation. *The Anatomical record*; 290: 801-813.
- Frost, D. R. (2011) American Museum of Natural History: amphibian species of the world. *Herpetology*; 82: 55-56.
- Frost, D. R. (2014) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>, accessed 15 february 2015.
- Gosner, K. L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Journal of Herpetology*; 16: 183-190.
- Gramapurohit, N. P.; Shanbhag, B. A.; Saidapur, S. K. (2000) Pattern of gonadal sex differentiation development, and onset of steroidogenesis in the frog, *Rana curtipes*. *General and Comparative Endocrinology*; 119: 256-264.
- Gurr, E. (1962) Staining Animal Tissues – Practice and Theoretical 1. London Leonard Hill Limited; London 631P.
- Haczkieicz, K.; Ogielska, M. (2013) Gonadal sex differentiation in frogs: How testies become shorter than ovaries. *Zoological science*; 30(2):125-134.
- Hsu, CH. Y.; Liang, H. M. (2016) Sex *catesbiana* in Taiwan. *Herpetologists' League*; 20-38.
- IUCN (2014): The IUCN red list of threatened species. Available at <http://www.iucnredlist.org/details/54772/0>, accessed 03 february 2014.
- Javari, M.; Torki, F. (2009) Notes on morphology, ecology, behavior and systematic of *Bufo luristanicus* Schmidt, 1952 (Anura: Bufonidae). *Herpetozoa*; 21:171-178.
- Ogielska, M.; Kotusz, A. (2004) Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. *Journal of Morphology*; 259: 41-45.
- Parvaresh, Z., Seddighi, N., Roushenas, F., Rahimi, S.; Hasani, E.; Mossadeghi, Z.; Nokhbatolfoghahai, M. (2016) Reproductive strategy and embryonic development of *Bufo surdus annulatus* in Iran. *Salamandra*; 52: 230-242.

- Phuge, S. K.; Gramapurohit, N. P. (2012) Gonadal sex differentiation development up to sexual maturity and steroidogenesis in the skipper frog, *Euphlyctis cyanophlyctis*. *General and Comparative Endocrinology*; 181: 65-71.
- Piprek, R. P.; Kloc, M.; Kubiak, Z. (2014) Bidders organ- structure, development and function. *Developmental Biology*; 58: 819-827.
- Schmidtler, J. J.; Schmidtler, J. F. (1969) Uber *Bufo surdus*; mit einem schlussel und Anmerkungen zu den ubrigen krotten Irans und west-Pakistans. *Salamandra*; 5: 113-123.
- Witschi, E. (1921) Development of gonads and transformation of sex in the frog. *American Naturalist*; 641: 529-538.
- Zaccanti, F.; Petrini, S.; Rubatta, M. L.; Stagni, A. M.; Giorgi, P. P. (1994) Accelerated female differentiation of the gonad by inhibition of steroidogenesis in amphibian. *Com. Biochem. Physiol*; 107(1): 171-179.