

## مقایسه ترکیب سنی در دو جمعیت از گونه‌های دوزیست بی‌دم مخمل کوه با استفاده از روش اسکلتوکرونولوژی

صدیقه اشکانندی<sup>۱</sup>، احمد قارزی<sup>۱\*</sup> و محسن عباسی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۹

### چکیده

در طی این تحقیق ترکیب سنی نمونه‌های موجود در جمعیت‌های دو گونه دوزیست بی‌دم از دو جنس متفاوت شامل قورباغه *Rana ridibunda* و وزغ *Bufo viridis* با استفاده از روش اسکلتوکرونولوژی مورد مطالعه قرار گرفت. برای این کار تعداد ۲۰ نمونه قورباغه (۷ ماده و ۱۳ نر) و ۲۲ نمونه وزغ (۹ ماده و ۱۳ نر) در طول سال از محل زندگی آن‌ها در مخمل کوه خرم‌آباد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آنجا پس از بررسی‌های بیومتریک، نمونه‌ها تشریح و استخوان‌های اندام‌های حرکتی آن‌ها جدا و از مراحل کلسیم‌گیری، آبگیری، شفاف‌سازی، قالب‌گیری، مقطع‌گیری و رنگ آمیزی عبور داده شد. مقاطع تهیه شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی واقع شده و با توجه به تعداد خطوط توقف رشد در برش‌های عرضی استخوان، سن تک تک نمونه‌ها تعیین گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که محدوده سنی برای نمونه‌های *R. ridibunda* ۱۱-۳ سال و برای نمونه‌های *B. viridis* ۸-۱ سال می‌باشد. همچنین، به منظور تعیین رابطه بین سن و طول پوزه تا مخرج، اطلاعات حاصله با استفاده از روش‌های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی‌ها نشان داد که در هر دو گونه مورد مطالعه، به ویژه در سنین بالا، رابطه مستقیمی بین دو مولفه طول پوزه تا مخرج و سن مشاهده نمی‌شود. این یافته هم در مورد جنس نر و هم در جنس ماده صدق می‌کند. با توجه به نتایج حاصله می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در جمعیت‌های مورد مطالعه، نمونه‌ها پس از رسیدن به بلوغ رشد مشخصی از خود نشان نمی‌دهند.

واژه‌های کلیدی: تخمین سن، طول عمر، خطوط توقف رشد، قورباغه، وزغ

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۳۶۷۰۳۹۷، پست الکترونیکی: ahgharzi@yahoo.com

### مقدمه

دوباره بوده است، اما همان‌طور که آشکار است این روشی بسیار سخت و طولانی مدت است، ضمن اینکه برای موارد فسیلی نیز کاربرد ندارد. در میان روش‌های توسعه یافته غیرمستقیم کنونی که برای تعیین سن استفاده می‌شود اسکلتوکرونولوژی روش معتبری محسوب می‌شود که بر پایه آنالیز نشانه‌های موجود در بافت استخوان طرح ریزی شده است (۸، ۱۲، ۱۴ و ۱۷). به طور خاص این روش بیشتر در مورد گونه‌هایی کاربرد بهتری دارد که در بافت‌های

تاکنون، چندین روش مختلف برای تخمین سن دوزیستان و خزندگان پیشنهاد و اجرا شده است. این روش‌ها عمدتاً بر مبنای ضخامت عدسی چشم، لوب‌دار شدن بیضه، داده‌های مربوط به میزان باروری و نشانه گذاری-آزادسازی و دستگیری دوباره استوار بوده است (۱، ۳، ۴، ۱۳ و ۱۸). اولین کارهایی که روی تعیین سن گونه‌های مختلف صورت می‌گرفته و در آن‌ها مطالعه از بدو تولد نمونه شروع می‌شده روش نشانه گذاری-آزادسازی و دستگیری

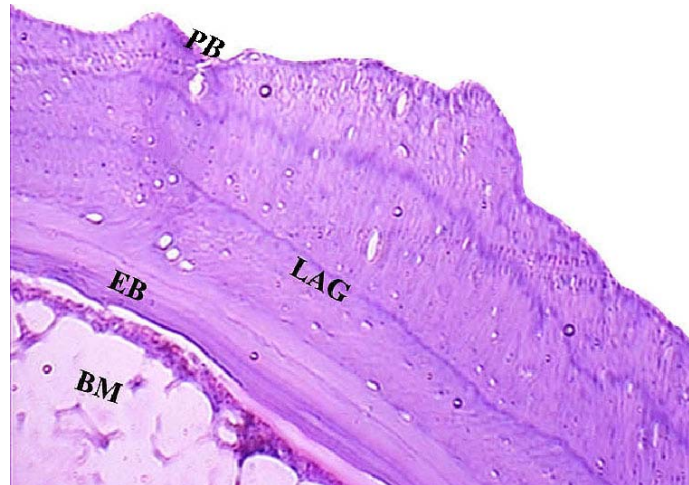
تاکنون نظر محققان داخلی را به خود جلب نکرده است و حداقل بنا بر جستجوهای به عمل آمده در منابع، تحقیقی در این رابطه صورت نگرفته است. با توجه به موارد مذکور ما بر آن شدیم که در این تحقیق بر روی جمعیت‌های گونه *Rana ridibunda* و *Bufo viridis* ساکن مخمل کوه واقع در حاشیه شهر خرم‌آباد با موقعیت جغرافیایی  $33^{\circ}5'N$  و  $48^{\circ}3'E$  و مطالعاتی انجام داده و با روش اسکلتوکرونولوژی سن افراد موجود در این جمعیت‌ها را تعیین نماییم.

### مواد و روشها

برای انجام این کار تعداد ۲۰ نمونه از گونه قورباغه *R. ridibunda* (مشمول بر ۷ ماده و ۱۳ نر) و ۲۲ نمونه از گونه وزغ *B. viridis* (شامل ۱۳ نر و ۹ ماده) از منطقه مخمل کوه خرم‌آباد در طی ماه‌های اسفند تا خرداد جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه جهت تثبیت شدن درون فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند و در مرحله بعد فاکتور طول پوزه تا مخرج (snout-to-vent length) یا SVL به همراه چند فاکتور دیگر (طول پا، طول سر، طول پوزه و طول ران) در مورد آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها تشریح و استخوان‌های مربوط به اندام‌های حرکتی آن‌ها جدا گردید. استخوان‌ها به منظور نرم شدن درون محلول اسید نیتریک ۵٪ برای کلسیم‌گیری قرار گرفتند. مدت زمان کلسیم‌گیری با توجه به نوع استخوان‌ها و طول عمر حیوان متفاوت بود، بطوریکه این مرحله برای استخوان‌های نازک حداکثر ۵ دقیقه و برای استخوان‌های ضخیم تا ۴۵ دقیقه طول می‌کشید. متعاقباً استخوان‌های نرم شده درون محلول‌های اتانول ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰٪ جهت آب‌گیری (هر کدام ۱/۵ ساعت) قرار داده شدند و بعد برای پشت سر گذراندن مرحله شفاف‌سازی به محلول گزبلول منتقل شدند. نمونه‌ها سپس در پارافین به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند تا پارافین به خوبی درون بافت نفوذ کند. کار تهیه برش‌های عرضی با ضخامت ۵-۷ میکرومتر با میکروتوم دوار صورت گرفت و در نهایت برش‌های

سخت استخوانی آن‌ها نشانه‌های میکروسکوپی ایجاد و تثبیت می‌شود که مبنای درست و قابل اتکایی برای تخمین سن، ویژگی رشد و سایر خصوصیات مرتبط با بیولوژی گونه‌ها محسوب می‌گردند (۱۸ و ۴). در دوزیستان شرایط اقلیمی در رشد استخوان مؤثر و تعیین‌کننده می‌باشد. در طول دوره استراحت و خواب زمستانی رشد استخوان نسبت به فصل تابستان کاهش و یا متوقف می‌شود و بافت استخوان ایجاد شده در فاصله فصل زمستان با بافت به وجود آمده در فصول فعال گونه از نظر میکروسکوپی فرق می‌کند. این اختلاف در ویژگی‌های رشد در دو فصل فعال و غیر فعال سبب می‌گردد که در مقطع عرضی بافت استخوانی این جانوران حلقه‌هایی شبیه حلقه‌های تنه درختان تشکیل شود. معمولاً حلقه بافت استخوانی که در طی فصل زمستان یا غیرفعال ایجاد می‌شود باریک‌تر بوده و همچنین به دلیل تراکم متفاوت مواد آلی و معدنی بستر بافت استخوان (نسبت به بافت ایجاد شده طی فصل فعال) بعد از رنگ آمیزی‌های معمول در آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی به صورت حلقه‌های تیره‌تری نمایان می‌شوند. به این حلقه‌ها اصطلاحاً خط توقف رشد ( Lines of arrested growth) یا LAGs گفته می‌شود که به صورت متمرکز خصوصاً در استخوان‌های دراز یا کوتاه (ران، بازو یا بند انگشت) ظاهر می‌شوند. وجود هر حلقه در بافت استخوانی به منزله گذشت یک سال از زندگی حیوان می‌باشد و لذا با شمارش تعداد حلقه‌ها می‌توان سن حیوان را تا لحظه جمع‌آوری مشخص نمود (۶ و ۷). قورباغه‌ها و وزغ‌ها با وجود اینکه از گونه‌های نام آشنا برای ما انسان‌ها هستند و در جوار محیط زندگی ما معمولاً یافت می‌شوند ولی اطلاع دقیقی از طول عمر آن‌ها در طبیعت وجود ندارد چرا که بسته به شرایط اقلیمی و نوع گونه‌ها طول عمر آن‌ها ممکن است در نقاط مختلف اختلافاتی را نشان دهد. در مورد تعیین سن در گونه‌های دوزیست با استفاده از روش اسکلت و کرونولوژی تحقیقاتی در خارج از کشور صورت گرفته (۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴) ولی این موضوع

گردید و بر مبنای آن‌ها سن قورباغه مورد مطالعه تعیین گردید. برای اینکه تعیین شود آیا از نظر این فاکتور (تعداد خطوط توقف رشد) بین نمونه‌های نر و ماده تفاوتی وجود دارد یا خیر، اطلاعات بدست آمده بوسیله نرم‌افزار Excel مورد تجزیه و تحلیل آماری واقع گردید.



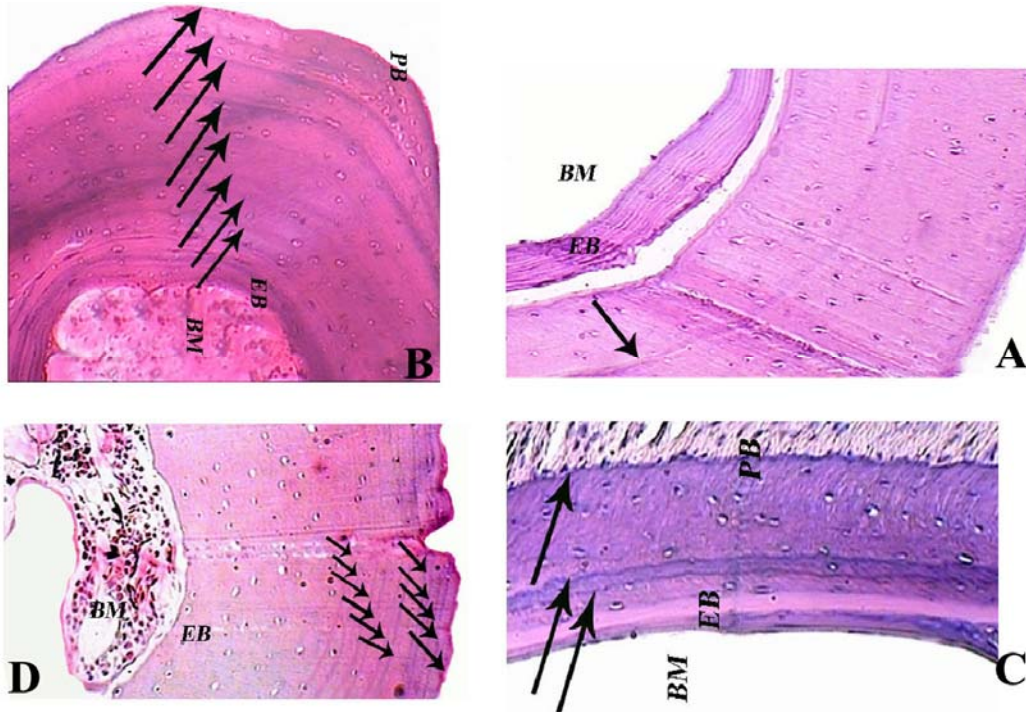
شکل ۱- برشی از بافت استخوانی که قسمت‌های مختلف در آن مشاهده میشود. مغز استخوان (BM)، آندوست استخوان (EB)، پریوست استخوان (PB)، حلقه یا خط توقف رشد (LAG). بزرگنمایی  $\times 200$ ، H&E.

آندوست وجود دارد که در آن سلول‌های استخوانی یا استئوسیت‌ها در لاکوناها مشاهده می‌شوند (شکل ۱). لاکوناها درون تیغه‌های مربوط به سیستم هاورس قرار گرفته‌اند، درون این سیستم‌ها مجاری هاورس نیز دیده می‌شود. در اغلب لاکوناها یک سلول دیده می‌شود ولی در بعضی موارد چند سلول نیز با هم درون یک لاکونا مشاهده می‌شوند. این قسمت از بافت استخوانی شامل حلقه‌هایی (LAG) می‌باشد که تعداد این حلقه‌ها بر حسب سن نمونه فرق می‌کند (شکل ۱). این حلقه‌ها نسبت به دیگر نواحی بافت استخوانی به صورت تیره‌تری نمایان می‌شوند به طوری که به راحتی از نواحی اطراف خود قابل تشخیص هستند. در زیر این بخش، بافت استخوانی آندوست قرار گرفته که نسبت به بافت اصلی استخوان دارای ضخامت کم‌تری می‌باشد (شکل ۱)، اگر بافت با بزرگنمایی بالاتر و دقت بیشتری مطالعه شود آشکار می‌گردد که در این قسمت نیز حلقه‌هایی مشاهده می‌شوند ولی بر طبق قرارداد این حلقه‌ها برای تعیین سن لحاظ نمی‌شوند.

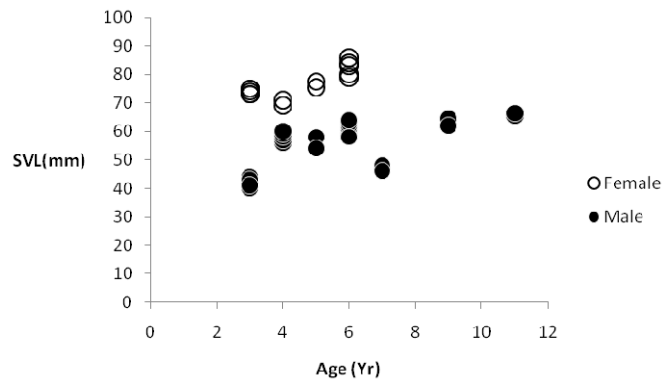
تهیه شده با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شدند (۱۹). مقاطع بافتی آماده شده در زیر میکروسکوپ جهت بررسی‌های بافت‌شناسی مورد بررسی‌های دقیق واقع شدند. در بافت استخوانی متراکم موجود در مقاطع تهیه شده، خطوط توقف رشد شناسایی و تعداد آن‌ها شمارش

## نتایج

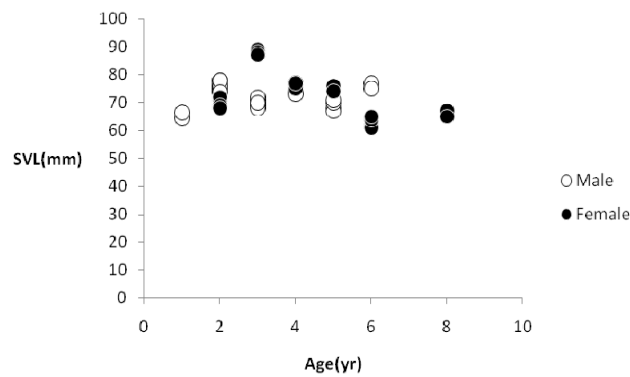
مطالعات بیومتری نشان داد که در گونه *R. ridibunda* میانگین SVL در جنس ماده  $8/875 \pm 72/102$  میلی‌متر و در جنس نر  $5/142 \pm 71/47$  میلی‌متر می‌باشد. اندازه‌گیری همین صفت در مورد گونه *B. viridis* به ترتیب اعداد  $5/66 \pm 76/03$  و  $11/78 \pm 53/93$  میلی‌متر را برای جنس ماده و نر نشان داد. بررسی‌های بافت‌شناسی مقاطع تهیه شده از نمونه‌های استخوان‌های دراز (ران) نشان داد که این استخوان‌ها در مقطع عرضی ظاهری گرد و مدور دارند. در این مقاطع به طور مشخص دو ناحیه قابل تشخیص است، مغز استخوان در داخل که عمدتاً شامل بافت خون‌ساز است و بافت استخوانی متراکم در پیرامون که به صورت حلقه‌ای بخش داخلی را احاطه می‌کند. در بافت استخوانی متراکم، ناحیه پریوست استخوان در بیرونی‌ترین قسمت به صورت لایه نازکی قرار گرفته است. بافت اصلی استخوان با ضخامتی بسیار بیشتر از بقیه قسمت‌ها، بین پریوست و



شکل ۲- فتوگراف‌های حاصل از بافت استخوانی گونه‌های (A, B) *B. viridis* و (C, D) *R. ridibunda*. در تصویر A فقط یک حلقه مشاهده می‌شود در حالیکه بافت استخوانی نمونه B تعداد هشت حلقه را نشان می‌دهد. در تصویر C تنها سه حلقه دیده می‌شود ولی بافت استخوانی در تصویر D شامل ۱۱ حلقه می‌باشد. بزرگنمایی A برابر ۱۰۰× و B, C, D معادل ۲۰۰×. H&E



نمودار ۱- ارتباط بین SVL (میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد) و سن افراد نر و ماده گونه *R. ridibunda*



نمودار ۲- ارتباط بین SVL (میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد) و سن افراد نر و ماده گونه *Bufo viridis*

ابتدا بین SVL و سن افراد در دو جنس نر و ماده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از این بررسی‌ها در نمودارهای ۱ و ۲ منعکس شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بجز جنس ماده گونه *R. ridibunda* هیچ رابطه مشخصی بین SVL و تعداد حلقه‌های شمارش شده مشاهده نمی‌شود. به ترتیبی که به طور مثال دو نمونه نر یکی از نمونه‌ها تعداد ۹ و در دیگری ۱۱ حلقه شمارش شد. در مورد جنس ماده گونه *R. ridibunda* یک رابطه اندکی بین این دو پارامتر مشاهده می‌شد ولی با توجه به تعداد محدود نمونه‌ها و اختلاف ناچیز این ارتباط معنی‌دار نمی‌باشد، لیکن در مورد جنس ماده گونه *B. viridis* حتی این ارتباط ناچیز نیز ملاحظه نمی‌شود.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به تعداد نمونه‌ها (S.N) تعداد خطوط

توقف رشد شمارش شده (L.N) و درصد فراوانی گونه‌های جمع

آوری شده (%) از دو گونه *R. ridibunda* و *B. viridis*

<i>B. viridis</i>			<i>R. ridibunda</i>		
S. N	L. N	%	S.N	L.N	%
۱	۱	۴/۵	۵	۳	۲۵
۶	۲	۲۷/۳	۴	۴	۲۰
۴	۳	۱۸/۲	۲	۵	۱۰
۴	۴	۱۸/۲	۶	۶	۳۰
۳	۵	۱۳/۶	۱	۷	۵
۳	۶	۱۳/۶	۱	۹	۵
۱	۸	۴/۵	۱	۱۱	۵

### بحث و نتیجه گیری

اسکلتوکرونولوژی دیر زمانی است که به عنوان یک روش استاندارد برای تخمین سن گونه‌های مختلف دوزیستان و خزندگان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳ و ۲۵). در مورد دوزیستان نواحی معتدل، یک LAG معمولاً به عنوان یک سال سن تفسیر می‌شود (۲ و ۱۹). بر مبنای این تفسیر، هر LAG نشانگر وجود یک دوره غیر فعال در زندگی حیوان است (۵). فعالیت‌های زیستی دوزیستان اساساً به وسیله

شمارش حلقه‌های موجود در بافت اصلی استخوان که به نام خطوط توقف رشد یا LAGها شناخته می‌شود نشان داد که در مورد هر دو گونه مورد مطالعه تعداد آن‌ها در نمونه‌های مختلف با یکدیگر فرق می‌کند. به عنوان مثال، در نمونه‌ای از *B. viridis* که در آن SVL برابر با ۶۶/۸۸ میلی-متر بود، در بافت استخوانی تعداد یک حلقه مشاهده شد (شکل ۲A)، در حالی که در نمونه‌ای دیگر از همین گونه با SVL برابر با ۷۷/۶۱ میلی‌متر تعداد ۸ حلقه LAG در بافت استخوانی مشاهده شد (شکل ۲B). وجود این تفاوت‌ها در بین افراد گونه *R. ridibunda* نیز به روشنی آشکار شد. به عنوان نمونه، در یکی از نمونه‌ها که SVL اندازه‌گیری شده برای آن برابر با ۴۴/۵۶ میلی‌متر بود در بافت استخوانی آن سه عدد LAG تشکیل شده بود (شکل ۲C)، ولی در نمونه دیگری از این گونه با SVL برابر با ۶۰/۱۷ میلی‌متر تعداد ۱۱ حلقه LAG شمارش شد (شکل ۲D). خلاصه نتایج حاصل از این اندازه‌گیری‌ها به همراه درصد فراوانی هر یک از گروه‌های سنی (با توجه به تعداد حلقه‌های شمارش شده) در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود حداکثر تعداد حلقه‌های شمارش شده در گونه *R. ridibunda* برابر ۱۱ عدد می‌باشد. بر طبق عقیده رایج و شواهد موجود اگر بپذیریم که هر حلقه در بافت استخوانی معادل یک سال زندگی می‌باشد در آن صورت پیرترین نمونه ۱۱ سال سن و جوانترین نمونه ۳ سال سن داشته است. به علاوه در مورد این گونه فراوان‌ترین افراد جمعیت را افراد با سن ۶ سال تشکیل می‌دادند درحالی‌که کم‌ترین فراوانی در نمونه‌های بالای ۷ سال مشاهده گردید. همین مطالعات در مورد گونه *B. viridis* نشان داد که مسن‌ترین فرد جمعیت ۸ سال و جوانترین آن‌ها یک سال داشت، ضمن اینکه افراد دو ساله بیشترین و افراد یک ساله و ۸ ساله از کم‌ترین فراوانی در بین جمعیت مورد مطالعه برخوردار بودند. پس از بررسی‌های بافت‌شناسی و شمارش حلقه‌های توقف رشد در بافت استخوانی، با استفاده از آنالیزهای آماری ارتباط

به نواحی جنوبی و پست‌تر معمولاً بیشتر است (۲۷). اما، با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه و دیگران نمی‌توان این نظریه را پذیرفت چرا که خرم‌آباد از نظر موقعیت جغرافیایی نسبت به تمام نواحی گزارش شده در بالا، جنوبی‌تر بوده و ارتفاع این منطقه از سطح دریا ۱۱۴۷ متر می‌باشد. به علاوه، اگر نظریه مذکور درست باشد باید انتظار داشت که نمونه‌های مناطق گرمسیری طول عمر خیلی کمتری داشته باشند در حالی که مشاهده می‌شود که حداکثر طول عمر در یکی از گونه‌های جنس *Rana* بنام *R. nigrovittata* که ساکن جنگل‌های گرمسیری و پست کشور تایلند است ۹ سال گزارش شده است (۱۶). بنابراین با توجه به شواهد موجود نمی‌توان با قطعیت گفت نمونه‌های ساکن مناطق شمالی و مرتفع طول عمر بیشتری نسبت به نمونه‌های مناطق جنوبی و پست دارند. در مورد تخمین سن گونه *B. viridis* تحقیقات نسبتاً کمی صورت گرفته است. با این وجود نتایج بدست آمده در این تحقیق با اطلاعات ارائه شده توسط دیگران مطابقت می‌کند. کوترپ و همکاران (۲۱) حداکثر طول عمر جمعیتی از این گونه را که در استان گیسون ترکیه یافت می‌شوند هشت سال گزارش کرده‌اند. جمعیت‌های گرجستانی این گونه که در نواحی رودخانه کورا (در ارتفاع ۱۲۰۰-۹۰۰) این کشور وجود دارند حداکثر سنی معادل ۱۲ سال را نشان می‌دهند (۱۰). مطالعات تعیین سن در گونه‌های دیگر جنس *Bufo* نیز انجام شده و تفاوت‌های در طول عمر گونه‌های مختلف مشاهده می‌شود. به عنوان نمونه حداکثر سن در گونه *B. japonicus* هشت سال (۲۸)، در گونه *B. verrucosissimus* دوازده سال (۱۰) و در گونه *B. bufo* دوازده سال (۱۳) و گونه *B. melanostictus* چهار سال (۹) گزارش شده است. با این وجود همان‌طور که در مورد گونه *R. ridibunda* ذکر شد، به نظر نمی‌رسد که ارتباطی بین ارتفاع زیستگاه و طول عمر وجود داشته باشد (۲۱). یکی از دلایلی که برای تفاوت طول عمر در جمعیت‌های مختلف قورباغه و وزغ ذکر می‌شود فراوانی

دما و رطوبت محیطی تنظیم می‌شود. در نتیجه، در زمستان به دلیل شرایط سخت محیطی این جانوران قادر نیستند به فعالیت خود ادامه دهند و به خواب زمستانی فرو می‌روند. از اینرو LAGها معرف آن قسمت از بافت استخوانی است که طی زمستان خوابی ایجاد می‌شود و چون در این دوره از نظر مواد غذایی قابل دسترس تفاوت‌هایی با دوره فعال وجود دارد در نتیجه ترکیب بافت استخوانی ساخته شده متفاوت از دوره فعال بوده و به همین دلیل است که پس از رنگ آمیزی به راحتی از بافت‌های اطراف قابل تشخیص می‌باشد (۲۴ و ۲۶). با توجه به مطالعات دیگران و توضیحات فوق اگر بپذیریم که هر LAG معرف گذشت یک سال از عمر حیوان می‌باشد در آن صورت افراد موجود در جمعیت گونه‌های *R. ridibunda* و *B. viridis* ساکن مخمل کوه خرم‌آباد به ترتیب بین ۱۱-۳ و ۸-۱ سال سن داشته‌اند. بر همین مبنای فراوان‌ترین افراد را در گونه *R. ridibunda* نمونه‌های شش ساله و در گونه *B. viridis* نمونه‌های دو ساله تشکیل می‌داده‌اند. در گونه *R. ridibunda* حداکثر طول عمر مشاهده شده در جمعیت ساکن مخمل کوه ۱۱ سال بود. نتایج تقریباً مشابهی از ترکیب سنی جمعیت‌های مختلف این گونه در نقاط اطراف ایران گزارش شده است. بطوری که، حداکثر طول عمر در جمعیت ساکن منطقه حفاظت شده ولگا-کامزکی روسیه به ۱۱ سال و در جمعیت اطراف دریاچه سوان ارمنستان (با ارتفاع ۱۹۰۰ از سطح دریا) به ۱۰-۹ می‌رسد (۲۷). لدنتسوف و ملکومیان (۲۲) حداکثر طول عمر این گونه را در جمعیتی دیگر از کشور ارمنستان که در ارتفاع ۲۵۰۰ ساکن هستند ۱۱ سال گزارش کرده است. گزارشات دیگری نیز وجود دارد که حداکثر طول عمر این گونه را کمتر ذکر کرده‌اند. به عنوان مثال، حداکثر سن در جمعیتی از *R. ridibunda* در کشور تاجیکستان ۴ سال و در جمعیت‌های ناحیه تولگا (روسیه مرکزی) شش سال گزارش شده است (۲۰). بر طبق نظر یکی از کارشناسان طول عمر این گونه در نواحی شمالی و کوهستانی نسبت

متعددی از این گونه‌ها و نیز سایر گونه‌ها هماهنگی و تطابق نشان می‌دهد. اگر به نمودارهای ۱ و ۲ که ارتباط بین SVL و سن را نشان می‌دهد دقت نماییم، ملاحظه می‌شود که در هر دو جنس نر و ماده این گونه‌ها، برخلاف سنین بالا که هیچ رابطه‌ای بین این دو شاخص دیده نمی‌شود، در سنین کم (زیر ۴-۳ سال) تقریباً یک همسویی بین این دو مؤلفه دیده می‌شود. لذا با توجه به این نتایج و شواهد حاصل از کارهای دیگران می‌توان نتیجه‌گیری کرد که دوزیستان بعد از رسیدن به بلوغ جنسی که معمولاً در ۲-۳ سالگی اتفاق می‌افتد (۲۱)، در فاصله سال‌های بلوغ تا مرگ رشد چندانی از خود نشان نمی‌دهند، هرچند که اثبات این فرضیه با اطلاعات حاضر امکان‌پذیر نمی‌باشد. به طور خلاصه، در این تحقیق نشان داده شد که میانگین سنی و حداکثر طول عمر نمونه‌های موجود در جمعیت گونه‌های *R. ridibunda* و *B. viridis* تقریباً مشابه اطلاعاتی است که از مناطق پیرامون ایران در مورد این گونه‌ها گزارش شده و اینکه در هیچ یک از گونه‌ها بنظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین SVL و سن در جنس نر و ماده وجود ندارد.

دشمنان طبیعی یا شکارگران است، به عبارتی در هر اکوسیستمی که شکارگران بیشتری باشند طول عمر دوزیستان ساکن آن کوتاه‌تر می‌باشد (۱۶). اما برای اثبات این موضوع نیاز است که تحقیقات بیشتری انجام گیرد.

در این تحقیق، ما در مورد هیچ یک از گونه‌ها و تقریباً در هیچ کدام از جنس‌های نر و ماده به ارتباط مشخصی بین SVL و سن گونه‌ها دست پیدا نکردیم. این نتایج با برخی از گزارشات موجود مطابقت ندارد، به طوری که در برخی از آن‌ها نشان داده شده که یک رابطه مستقیمی بین این دو فاکتور در گونه‌های دوزیست مشاهده می‌شود (۱۶ و ۲۱). از طرفی نتایج تحقیق اخیر، شواهد مثبتی بر عدم وجود ارتباط بین این دو فاکتور را تایید می‌کند. کوتروب و همکاران (۲۰) نشان دادند که در مورد گونه *R. ridibunda* موجود در ناحیه تراپوزان ترکیه، بین این دو مؤلفه حداقل در جنس ماده هیچ گونه رابطه‌ای دیده نمی‌شود. به همین ترتیب در مورد دوزیست دم‌دار *Tylototriton verrucosus* نیز چنین ارتباطی یافت نشده است (۱۶). در جنس نر *B. bufo* نیز ارتباط مثبتی بین این دو فاکتور به چشم نمی‌خورد (۱۵). بنابراین یافته‌های این تحقیق با شواهد

## منابع

1. Acker, P. M., Kruse, K. C., and Prehbiel, E. B., 1986. Aging *Bufo americanus* by skeletochronology. *J. Herpetol.* 20: 570-574
2. Alcobendas, M., and Castanet, J., 2000. Bone growth plasticity among populations of *Salamandra salamandra*: interactions between internal and external factors. *Herpetologica.* 56: 14-26
3. Augert, D., and Joly, P., 1993. Plasticity of age at maturity between two neighbouring populations of the common frog (*Rana temporaria*). *Can. J. Zool.* 71: 26-33
4. Bastein, H., and Leclair, R., 1992. Aging wood frogs (*Rana sylvatica*) by skeletochronology. *J. Herpetol.* 26: 222-225
5. Castano, M. H., and Castanet, J., 1987. Experimental data on bone growth and age in *Triturus marmoratus* (Amphibia, Urodela). In *Proc. 4<sup>th</sup> Ord. Gen. Mtg. Soc. Eur. Herpetol. J.* 87-90
6. Castanet, J., and Smirina, E., 1990. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Ann Sci Nat Zool.* 11: 191-196
7. Castanet, J., Francillon-Vieillot, H., Meunier, F. J., and De Ricqles, A., 1993. Bone and individual aging. In *bone (Bone growth-B)*. B. K. Hall, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.: 245-283
8. Castanet, J., Francillon-Vieillot, H., and Bruce, R. C., 1996. Age estimation in Desmognathine salamanders assessed by skeletochronology. *Herpetologica.* 52: 160-171
9. Dixit, P. K., Andia, B. N., Behera, S., and Behera, H. N., 2010. Age determination in common Indian toad, *Bufo melanostictus*, by

- skeletochronology, The IUP Journal Sci. Tech., 4(3): 42-46
10. Gokhelaşvili, R. K., and Tarkhnişvili, D. N., 1994. Age structure of six Georgian anuran populations and its dynamics during two consecutive years. *Herpetozoa* 7(1/2): 11-18
  11. Halliday, T. R., and Verrell, P. A., 1988. Body size and age in amphibians and reptiles. *J Herpetol.* 22: 253-265
  12. Hemelaar, A. S. M., 1981. Age determination of male *Bufo bufo* (Amphibian, Anura) from the Nether lands, based on year rings in phalanges. *Amphibia- Reptilia*. 3/4: 223- 233
  13. Hemelaar, A., 1985. An improved method to estimate the number of year rings resorbed in phalanges of *Bufo bufo* (L.) and its application to populations from different latitudes and altitudes. *Amphi- Reptil.* 6: 323-341
  14. Hemelaar, A. S. M., and Van Gelder, J. J., 1980. Annul growth rings in phalanges of *Bufo bufo* (Anura, Amphibia) from the Netherlands and their use for age determination. *Netherland J Zool.* 30, 129:135
  15. Hogland, H., and Saterberg, L., 1989. Sexual selection in common toads: correlates with age and body size. *J. Evol. Biol.* 2(5): 367-372
  16. Khonsue, W., Matusui, M., and Misawa, Y., 2000. Age determination of *Rana nigrovittata*, a frog from tropical forest of Thailand. *Zoological Science*, 17: 253-257
  17. Kleinenberg, S. E., and Smirina, E. M., 1969. A contribution to the method of age determination in amphibians. *Zool J.* 48: 1090-1094
  18. Kusano, T., Fukuyama k., and Miyashita, N., 1995. Age determination of the stream frog. *Rana sakuraii* by skeletochronology. *J Herpetol.* 29: 625-628
  19. Kusano, T., Fukuyama k. and Miyashita, N., 1995. Body size and age determination by skeletochronology of the brown frog *Rana tagoi* in southwestern kanto. *Jpn. J. Herpetol.* 16: 29-34
  20. Kutrop, Y. N., Cobanoglu, U., and Ozoran, Y., 2005. Age determination and some growth parameters of a *Rana ridibunda* population in turkey. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 51(1): 67-74
  21. Kutrup, B., Cakir, E., Colak, Z., Bulbul, U., and Karaoglu, H., 2011. Age and growth of green Toad, *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) from and island and a mainland population in giresun, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(11): 1469-1472
  22. Ledentsov, A. V., and Mekkumyan, L. S., 1986. On longevity and growth rate in amphibians and reptiles in Armenia. *Proc. Zool. Inst. Acad. Sci. USSR.* 158: 105-110. [in Russian]
  23. MacCoy, E. D., Mushinsky, H. R., Shockley, W. J., and Alvarez, M. R., 2010. Skeletochronology of the threatened Florida sand skink, *Plestiodon (Neoseps) reynoldsi*. *Copeia* 1: 38-40
  24. Peabody, F. E., 1961 Annual growth zones in vertebrates (living and fossils). *J. Morphol.* 108: 11-62
  25. Schroeder, E. E., and Baskett, T. S., 1968. Age estimation, growth rates and population structure in Missouri bullfrogs. *Copeia*. 1968: 583-592
  26. Smirina, E. M., 1974. Prospects of age determination by bone layers in Reptilia, *Zool. Zh.* 53: 111-117
  27. Smirina, E. M., 1994. Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology.* 40: 133-146
  28. Tamotsu, K., Kazuko, M., and Shingenori, K., 2010. Body size and age structure of a breeding population of the Japanese common toad, *Bufo japonicus formosus* (Amphibia: Bufonidae). *Current Herpetology*, 29(1): 23-31



## Comparison of age structure in two Makhmalkoh's anuran populations by means of skeletochronology

Ashkavandi S.<sup>1</sup>, Gharzi A.<sup>1</sup> and Abbasi M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Basic Science Dept., Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

### Abstract

In this research age structure in populations of two anuran species: a frog *R. ridibunda* and a toad *Bufo viridis* was studied using skeletochronological method. To perform this task, 20 individuals of the frog (13 male and 7 female) and 22 individuals of the toad (13 male and 9 female) were collected during different seasons of year from their natural habitat in Khorramabad and transferred to the laboratory where they were killed and their femur bones were dissected out from their legs. The bones were then decalcified, dehydrated, cleared, embedded, cut, stained and observed under a light microscope. The age was estimated for individuals by counting the number of lines of arrested growth (LAG) in cross-sections taken from femurs. On the basis of observations, the age range was 3-11 and 1-8 for *R. ridibunda* and *B. viridis*, respectively. Moreover, to find any relation between snout-to-vent length (SVL) and age, we analyzed the data using statistical methods. Results obtained from this analysis indicated that there is no positive relation between these two characters neither in *R. ridibunda* nor in *B. viridis*. This is true for both males and females. According to these finding we can come to the conclusion that these species do not show a significant growth after puberty.

**Key words:** Age estimation, Longevity, Lines of arrested growth, Frog, Toad