

## بررسی بافت‌شناسی پوست قورباغه آبی (*Pelophylax bedriagae*) و رابطه ساختارشناسی آن با شرایط اکولوژیکی مختلف در استان‌های گلستان و مازندران

یوسف تازیکی، علی‌اکبر باقریان یزدی، حاجی‌قلی کمی و زهرا نظری\*

ایران، گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۸

### چکیده

دوزیستان بیش از ۳۰۰ میلیون سال است بر روی کره زمین زندگی می‌کنند. به نظر برخی محققان دو گونه از جنس *Pelophylax Fitzinger, 1843* در ایران وجود دارد. در این تحقیق ساختار پوست ۴۸ قورباغه آبی شامل *Pelophylax bedriagae* (Camerano, 1882) از چهار جمعیت مختلف در شمال ایران مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌گیری از مناطق گرگان، آلاگل، ساری و تنکابن، این نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و بخشی از پوست سطح پشتی و شکمی آنها جدا شد. پس از انجام مراحل آماده‌سازی بافت و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، چهار ویژگی پوست آنها شامل ضخامت اپیدرم، ضخامت درم، ضخامت کل پوست و تعداد غدد موکوسی در یک میلی‌متر مربع از پوست، در زیر میکروسکوپ نوری بررسی و داده‌های به‌دست آمده آنالیز شد. نتایج آزمون‌های t و Mann-Whitney برای همه صفات بین گروه‌های نر و ماده تفاوت معنی‌داری نشان داد. نتایج آزمون‌های پارامتری ANOVA و ناپارامتری Kruskal-Wallis نشان داد که میان جمعیت‌های مورد بررسی در همه صفات تفاوت معنی‌دار وجود دارد. آزمون آنالیز واریانس‌های چندمتغیره (MANOVA) نشان داد که جدایی جمعیت‌ها کاملاً معنی‌دار است. نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای، نمونه‌ها را بر اساس فاصله به دو گروه تقسیم کرد که گروه اول شامل نمونه‌های گرگان و ساری و گروه دوم شامل نمونه‌های آلاگل و تنکابن بود. نتایج تحلیل کانونیکال نشان داد که ۸۹/۵۸٪ نمونه‌ها در دسته‌بندی خودشان قرار می‌گیرند. به طور کلی، این تحقیق نشان داد که می‌توان از صفات پوستی در تحلیل‌های تشخیصی استفاده کرده و این گروه از جانوران را از هم جدا کرد.

واژه‌های کلیدی: قورباغه مردابی، پوست، بررسی بافت‌شناسی، غدد موکوسی.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ، پست الکترونیکی: Z.Nazari83@yahoo.com

### مقدمه

بین تنها دوزیستان بدون دم و دوزیستان دم دار را در ایران می‌توان یافت (۸-۲).

دو گونه از جنس *Pelophylax* شامل *Pelophylax bedriagae* در ایران گزارش شده است. *Pelophylax bedriagae* اکنون در استان‌های گیلان، مازندران، گلستان، خراسان شمالی و رضوی، سمنان، تهران، البرز، قم و قزوین گزارش شده است. اما پراکنش گونه *Pelophylax ridibundus* عمدتاً در غرب

دوزیستان گروهی از جانوران مهره‌دار هستند که نقش مهمی در تعادل اکوسیستم ایفا می‌کنند. تا به امروز ۸۶۸۹ گونه از دوزیستان توسط جانورشناسان توصیف شده‌اند (بر طبق Amphibian web). اما متأسفانه جمعیت جهانی آنها به سرعت رو به کاهش است که دانشمندان علت این کاهش را تغییر شرایط آب و هوایی کره زمین ذکر می‌کنند (۲۰). دوزیستان امروزی در سه راسته دوزیستان بی دم (*Anura*)، دوزیستان دم‌دار (*Caudata*) و دوزیستان بدون دست و پا (*Gymnophiona*) قرار داده می‌شوند که از این

در ایران ساختار و بافت‌شناسی پوست دوزیستان و تغییرات جغرافیایی آن به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی مقایسه‌ای ضخامت اپیدرم، ضخامت درم، ضخامت کل پوست و تعداد غدد موکوسی در پوست قورباغه آبی نر و ماده در چهار زیستگاه مختلف گرگان، آلاگل، ساری و تنکابن می‌باشد.

## مواد و روشها

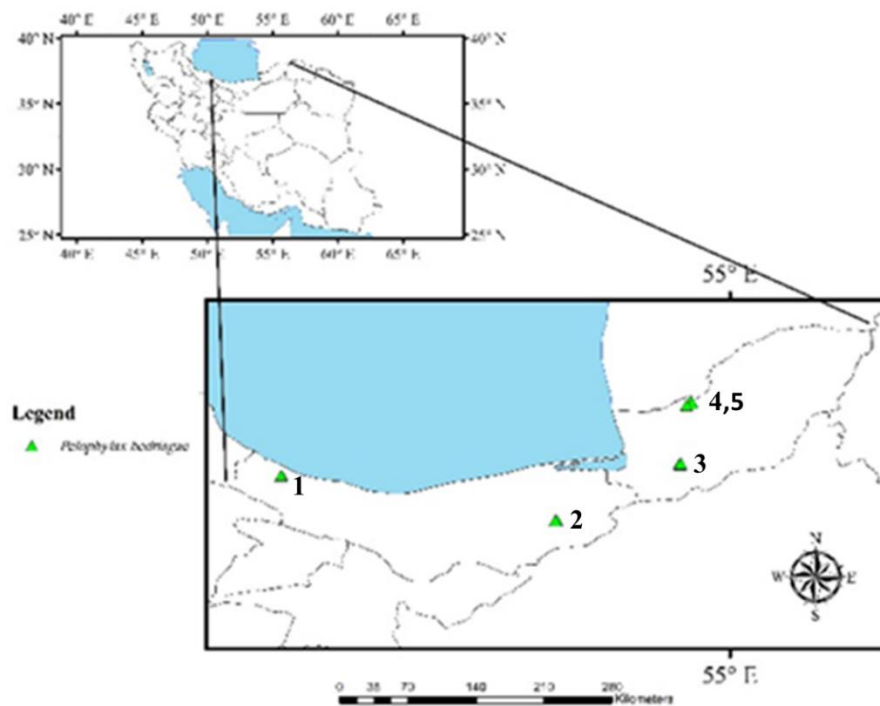
در این مطالعه تجربی، ۴۸ قورباغه آبی شامل ۲۴ نمونه ماده و ۲۴ نمونه نر مورد استفاده قرار گرفت. کلیه اصول اخلاقی کاربر روی حیوانات آزمایشگاهی مطابق با مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه گلستان رعایت گردید (کد اخلاق: IR.GU.REC.1401.001).

**جمع آوری نمونه:** جهت جمع آوری نمونه، قورباغه‌ها از ارتفاعات مختلف با شرایط آب و هوایی متفاوت در دو استان گلستان و مازندران جمع‌آوری شدند. موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه برداری در شکل ۱ نشان داده شده است. برای تعیین مناطق نمونه‌گیری، ابتدا با مراجعه به ادارات هواشناسی دو استان گلستان و مازندران، داده‌های هواشناسی با موضوع دما، میزان بارش و رطوبت از تمام ایستگاه‌های هواشناسی این دو استان جمع‌آوری شدند. سپس با بررسی این داده‌ها و همچنین میزان ارتفاع مناطق مختلف، چهار منطقه‌ی جلین- گرگان (به عنوان نزدیک‌ترین و در دسترس‌ترین)، آلاگل- گنبد کاووس (خشک‌ترین)، کیاسر- ساری (مرتفع‌ترین) و گرم‌پشته- تنکابن (مرطوب‌ترین) به عنوان مناطق نمونه‌گیری انتخاب شدند (جدول ۱). در طی ماه‌های خرداد و تیر ۱۴۰۱، جمع‌آوری نمونه‌ها با استفاده از تور دستی مخصوص صید قورباغه انجام شد و نمونه‌ها به طور زنده به آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه گلستان منتقل شدند.

ایران از استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و غربی، زنجان، کردستان، کرمانشاه، همدان، مرکزی، اصفهان، لرستان، خوزستان، ایلام، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویر احمد، فارس، بوشهر، هرمزگان، کرمان و سیستان و بلوچستان گزارش شده است (۲).

پوست دوزیستان از دو لایه اصلی تشکیل شده است که منشاء جنینی متفاوتی دارند. لایه بیرونی به نام اپیدرم که از اکتودرم منشاء گرفته و لایه داخلی به نام درم که از مزودرم مشتق شده است (۱۲، ۱۶ و ۲۲). بخش اپیدرم از بافت اپیتلیوم سنگفرشی مطبق شاخی شده می‌باشد (۹، ۱۴ و ۲۱) که از چهار لایه سلولی، به ترتیب از داخل به خارج شامل لایه زایا (*Stratum germinativum*)، لایه خاردار (*Stratum spinosum*)، لایه دانه‌دار (*Stratum granulosum*) و لایه شاخی (*Stratum corneum*)، تشکیل شده است (۹، ۱۹ و ۲۳). در زیر اپیدرم، لایه درم قرار گرفته که توسط غشاء پایه از اپیدرم جدا شده است (۱۵). درم خود از دو لایه اسفنجی (*Stratum spongiosum*) در بالا (چسبیده به غشاء پایه) و متراکم (*Stratum compactum*) در پایین تشکیل شده است (۹ و ۲۲). یکی از بارزترین ویژگی‌های مشترک در تمامی دوزیستان وجود غدد متعدد است که در تمام سطح پوست و یا نواحی خاصی از بدن پراکنده شده‌اند. غدد پوستی دوزیستان به طور کلی بر اساس مواد مترشحه به چهار دسته، مخاطی (موکوسی)، گرانولار (دانه‌دار)، مخلوط (سروموکوس) و غدد چربی تقسیم می‌شود (۱۱ و ۱۷).

پوست دوزیستان دارای نقش‌های گوناگونی است. از جمله وظایفی که برای پوست دوزیستان در نظر گرفته می‌شود می‌توان به مواردی همچون حفاظت مکانیکی (۹)، دریافت حس، دفاع شیمیایی، انتقال یون، جذب آب (۲۰)، تنفس و تنظیم مایعات بدن اشاره نمود (۱۰).



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه برداری شده. ۱: تنکابن، گرماپشته. ۲: ساری، کیاسر. ۳: گرگان، جلین. ۴ و ۵: آلاگل- گنبد.

جدول ۱- ویژگی‌های جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری و تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده قورباغه مردابی.

ردیف	محل جمع‌آوری	تعداد نمونه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع (متر)
۱	گرگان، جلین	۳	۵۴/۵۲۷۱۳۱	۳۶/۸۴۴۱۱۱	۱۴۴
۲	گرگان، جلین	۳	۵۴/۵۳۶۹۴۷	۳۶/۸۴۲۸۹۶	۱۶۵
۳	گرگان، جلین	۶	۵۴/۵۴۲۳۴۹	۳۶/۸۵۶۳۱۶	۱۴۰
۴	آلاگل، گنبد کاووس	۵	۵۴/۶۳۶۲۰۱	۳۷/۴۳۰۴۱۷	۱۲
۵	آلاگل، گنبد کاووس	۲	۵۴/۶۴۷۵۰۵	۳۷/۴۱۰۶۲۹	۸
۶	آلاگل، گنبد کاووس	۵	۵۴/۵۹۷۵۶۵	۳۷/۳۹۰۵۰۵	۵
۷	ساری، کیاسر	۶	۵۳/۳۸۶۹۲۹	۳۶/۳۳۰۱۲۳	۵۹۴
۸	ساری، کیاسر	۲	۵۳/۳۹۹۳۶۷	۳۶/۳۲۷۷۵۶	۶۶۷
۹	ساری، کیاسر	۴	۵۳/۳۸۳۰۳۳	۳۶/۳۲۸۵۵۴	۵۱۱
۱۰	تنکابن، گرماپشته	۷	۵۰/۸۵۹۵۰۸	۳۶/۷۳۵۲۴۴	۱۷۷
۱۱	تنکابن، گرماپشته	۵	۵۰/۸۴۸۷۳۴	۳۶/۷۴۳۰۶۳	۱۵۳

پس از بیهوشی، قطعات ۱ سانتی متر مربع از پوست ناحیه پشتی و شکمی تهیه شده و مراحل پردازش بافتی شامل تثبیت، آبیگری با استفاده از درجات صعودی اتانول، شفاف‌سازی با گزیرلول و آغشته‌سازی به پارافین انجام شد.

مطالعات بافت‌شناسی و بافت‌سنجی: برای بیهوش کردن حیوان ابتدا غلظت ۶۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر محلول تیوپتال سدیم (نوعی باربیتورات) را تهیه و با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن حیوان تزریق شد.

واریانس‌های چندمتغیره (MANOVA) انجام شد. برای یافتن گروه‌بندی میان نمونه‌ها بر اساس صفات مورد بررسی، آزمون خوشه‌بندی بر اساس فاصله (Ward) انجام شد. برای سنجش قدرت ممیزی صفات مورد مطالعه برای گروه‌بندی مناطق مورد مطالعه، از تحلیل کانونیکال CVA استفاده شد.

## نتایج

طی این مطالعه، ۴۸ قورباغه مردابی بالغ از چهار منطقه گرگان، آلاگل، ساری و تنکابن جمع‌آوری و بررسی شد که از این تعداد ۲۴ نمونه نر و ۲۴ نمونه ماده بودند. بررسی بافت‌شناسی پوست آنها نشان داد که نمونه‌های هر منطقه از حیث فاکتورهای مورد مطالعه شباهت زیادی به هم دارند. شکل ۲ تصویر میکروسکوپ نوری حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین بافت پوست سطوح پشتی و شکمی نشان می‌دهد. نتایج ریخت‌سنجی در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرند.

### آزمون نرمالیتت صفات

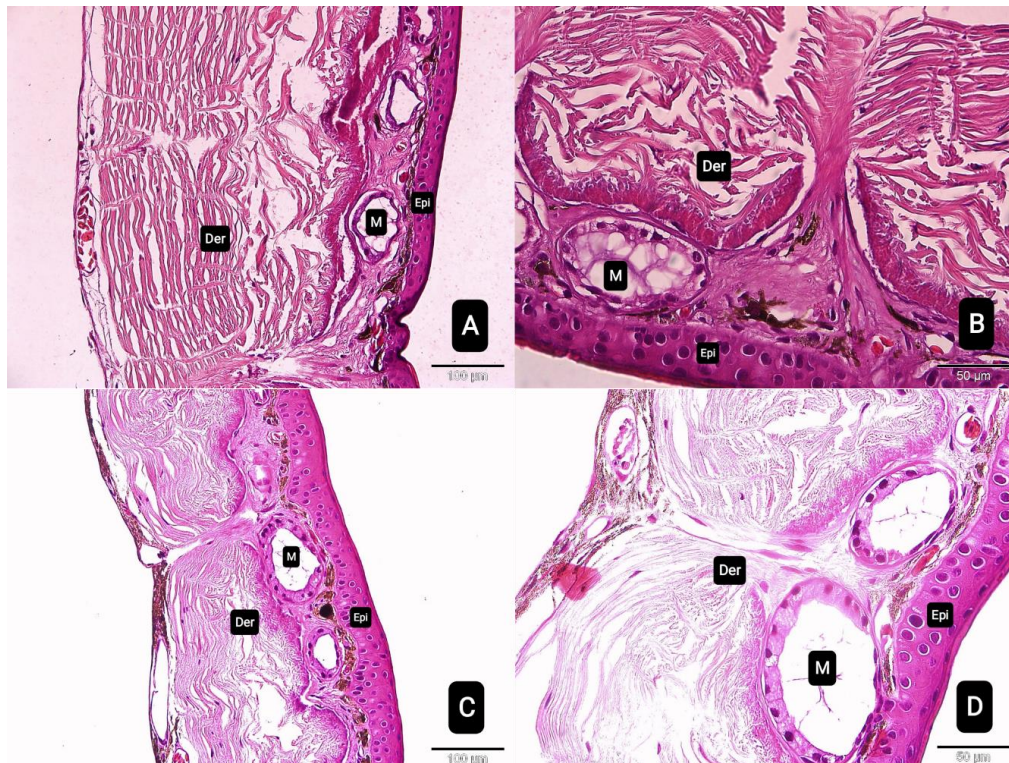
بر اساس آزمون Shapiro-Wilk، داده‌های حاصل از مقایسه میانگین‌های جفت‌شده برای صفات ضخامت اپیدرم پشتی، ضخامت اپیدرم شکمی، ضخامت درم پشتی، ضخامت درم شکمی، ضخامت پوست پشتی، ضخامت پوست شکمی، تعداد غدد موکوسی پشتی و تعداد غدد موکوسی شکمی همگی به صورت نرمال بودند (جدول ۲).

پس از برش‌گیری با دستگاه میکروتوم، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد و لام‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری Olympus-cx31 مورد بررسی قرار گرفتند و در ادامه با دوربین دیجیتال عکس‌برداری شدند. پارامترهای مورد بررسی شامل ضخامت اپیدرم (بر حسب میکرومتر)، ضخامت درم (بر حسب میکرومتر)، ضخامت کل پوست (بر حسب میکرومتر) و تعداد غدد موکوسی (در هر میلی متر مربع از پوست) ثبت شدند.

**آنالیز آماری:** ابتدا پراکنش نرمال صفات مورد بررسی با آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. علی‌رغم نتیجه این آزمون، تمامی آزمون‌های تک‌متغیره Univariate analysis با هر دو آزمون‌های پارامتریک و ناپارامتریک انجام شد. برای آزمون معنی‌داری میانگین صفات میان جنسیت‌های نر و ماده، از آزمون t مستقل استفاده شد. البته در کنار نتایج پارامتریک، نتایج آزمون ناپارامتریک (Mann-Whitney) هم ارائه شد تا نتایج دقیق‌تر مورد بررسی قرار گیرند. برای سنجش جدایی میانگین‌های صفات در جمعیت‌های مطالعه‌شده از آزمون مقایسه میانگین‌ها ANOVA و به شکل ناپارامتریک از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد. چهار شاخص اندازه‌گیری شده در پوست سطح پشتی یا شکمی توسط آزمون مقایسه میانگین‌های جفت‌شده (Two-sample paired test) مورد آزمون قرار گرفت. مقایسه میانگین چندمتغیره میان جنسیت نر و ماده و همچنین میان جمعیت‌ها، توسط آزمون تحلیل آنالیز

جدول ۲- نتایج آزمون Shapiro-Wilk برای نرمال بودن صفات در قورباغه آبی شامات *Pleophylax bedriagae*

صفات	تعداد	Shapiro-Wilk W	P(normal)
اپیدرم پشتی	۴۸	۰/۹۵۹۵	۰/۰۹۶۰۶
اپیدرم شکمی	۴۸	۰/۹۶۷۱	۰/۱۹۴۶
درم پشتی	۴۸	۰/۹۵۶۹	۰/۰۷۵۷۲
درم شکمی	۴۸	۰/۹۳۸۵	۰/۰۱۴۱۶
پوست پشتی	۴۸	۰/۹۴۱۴	۰/۰۱۸۳۸
پوست شکمی	۴۸	۰/۹۴۷۷	۰/۰۳۲۲۸
غدد موکوسی پشتی	۴۸	۰/۹۴۵۷	۰/۰۲۶۹۸
غدد موکوسی شکمی	۴۸	۰/۹۶۲۸	۰/۱۳۱۵



شکل ۲- نمونه‌ای از تصاویر میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین پوست سطوح پشتی و شکمی در قورباغه آبی شامات *Pleophylax bedriagae* مورد مطالعه. A: سطح پشتی بزرگنمایی ۴۰X، B: سطح پشتی بزرگنمایی ۱۰۰X، C: سطح شکمی بزرگنمایی ۴۰X، D: سطح شکمی بزرگنمایی ۱۰۰X. Epi (لایه اپیدرم)، Der (لایه درم)، M (غدد موکوسی).

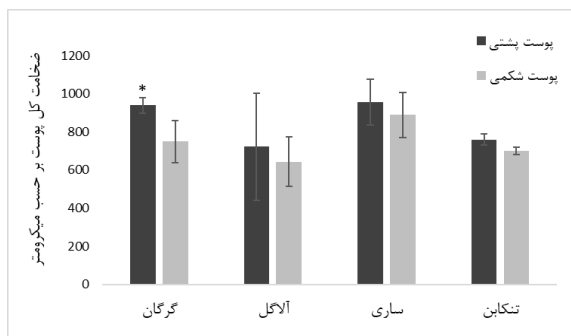
نتایج هر دو آزمون مقایسه میانگین صفات میان جنسیت‌ها با توجه به مقدار P تفاوت معنی‌دار نشان نداد (جدول ۳).

آزمون معنی‌داری میانگین صفات میان جنسیت‌ها: در ادامه معنی‌داری میانگین صفات میان جنسیت‌ها توسط دو آزمون t مستقل و Mann-Whitney انجام شد که بر اساس

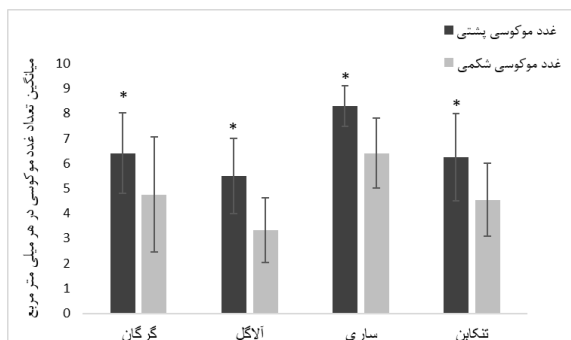
جدول ۳- نتایج آزمون‌های t test و Mann-Whitney برای معنی‌داری میانگین صفات بین دو جنس نر و ماده در قورباغه آبی شامات *Pleophylax bedriagae*

صفت	t test	Mann-Whitney
اپیدرم پشتی	P=۰/۵۹	P=۰/۹۱۵
اپیدرم شکمی	P=۰/۸۷۲۱	P=۰/۸۵۷۴
درم پشتی	P=۰/۹۲۵۹	P=۰/۹۱۵
درم شکمی	P=۰/۸۰۵۵	P=۰/۹۴۳۹
پوست پشتی	P=۰/۹۹۵۷	P=۰/۸۸۲۱
پوست شکمی	P=۰/۸۴۴۴	P=۰/۷۲۸۴
موکوسی پشتی	P=۰/۳۸۲۹	P=۰/۳۱۰۲
موکوسی شکمی	P=۰/۹۱۲۶	P=۰/۹۰۵۸

همچنین، میانگین تعداد غدد موکوسی در پوست پشتی نمونه‌های هر چهار منطقه به طور معنی‌داری بیشتر از سطح شکمی بود (شکل ۶).



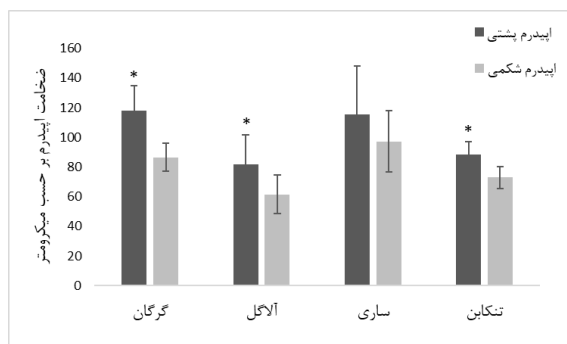
شکل ۵- مقایسه میانگین ضخامت کل پوست در نواحی پشتی و شکمی بدن قورباغه‌های مناطق مختلف. علامت \* نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف ضخامت پوست سطح پشتی نمونه‌های هر منطقه در سطح ۰/۰۵ نسبت به سطح شکمی نمونه‌های همان منطقه می‌باشد ( $p < 0.05$ ). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده‌اند.



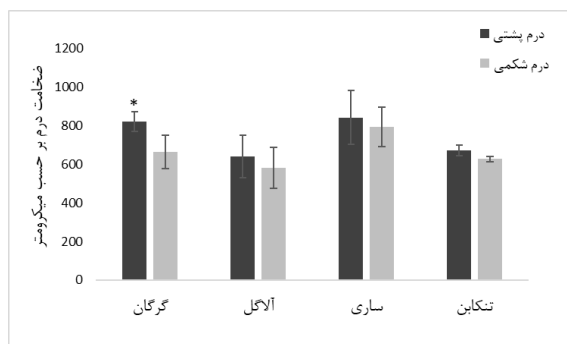
شکل ۶- مقایسه میانگین تعداد غدد موکوسی در نواحی پشتی و شکمی بدن قورباغه‌های مناطق مختلف. علامت \* نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف تعداد غدد موکوسی سطح پشتی نمونه‌های هر منطقه در سطح ۰/۰۵ نسبت به سطح شکمی نمونه‌های همان منطقه می‌باشد ( $p < 0.05$ ). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده‌اند.

آزمون معنی‌داری میانگین صفات میان جمعیت‌ها: نتایج آزمون آنالیز واریانس‌ها نشان می‌دهد که میان جمعیت‌های مورد بررسی در همه صفات برای آزمون پارامتری ANOVA و آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۴).

مطالعه هیستومتریک پوست نواحی پشتی و شکمی: مطالعه هیستومتریک پوست نواحی پشتی و شکمی بدن قورباغه‌های نر و ماده مناطق مورد نظر نشان داد که میانگین ضخامت اپیدرم پشتی نمونه‌های گرگان، آلاگل و تنکابن بالاتر از اپیدرم شکمی است (شکل ۳). علاوه بر این، در نمونه‌های تمامی مناطق ضخامت درم و همچنین ضخامت کل پوست ناحیه پشتی بیشتر از ناحیه شکمی بود که این اختلاف تنها در نمونه‌های منطقه گرگان معنی‌دار بود (شکل‌های ۴ و ۵).



شکل ۳- مقایسه میانگین ضخامت اپیدرم در نواحی پشتی و شکمی بدن قورباغه‌های مناطق مختلف. علامت \* نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف ضخامت اپیدرم سطح پشتی نمونه‌های هر منطقه در سطح ۰/۰۵ نسبت به سطح شکمی نمونه‌های همان منطقه می‌باشد ( $p < 0.05$ ). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده‌اند.



شکل ۴- مقایسه میانگین ضخامت درم در نواحی پشتی و شکمی بدن قورباغه‌های مناطق مختلف. علامت \* نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف ضخامت درم سطح پشتی نمونه‌های هر منطقه در سطح ۰/۰۵ نسبت به سطح شکمی نمونه‌های همان منطقه می‌باشد ( $p < 0.05$ ). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده‌اند.

جدول ۴- نتایج آزمون ANOVA و Kruskal-Wallis برای معنی‌داری میانگین صفات میان جمعیت‌ها در قورباغه آبی شامات *Pleophylax bedriagae*

صفات	ANOVA	Kruskal-Wallis
اپیدرم پشتی	$P=1/361E-14$	$P=4/561E-08$
اپیدرم شکمی	$P=1/1E-16$	$P=2/09E-08$
درم پشتی	$P=2/523E-19$	$P=1/223E-06$
درم شکمی	$P=1/793E-07$	$P=4/7E-06$
پوست پشتی	$P=1/473E-11$	$P=9/09E-07$
پوست شکمی	$P=3/851E-09$	$P=1/265E-06$
موکوسی پشتی	$P=1/802E-09$	$P=4/055E-06$
موکوسی شکمی	$P=1/391E-09$	$P=1/66E-06$

اساس صفات اندازه‌گیری تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۵). ولی همان تست برای آزمون چندمتغیره جدایی جمعیت‌ها کاملاً معنی‌دار می‌باشد (جدول ۶).

آزمون جدایی جنسیت‌ها و جمعیت‌ها به صورت چند متغیره: آزمون آنالیز واریانس‌های چندمتغیره (MANOVA) نشان داد که بین جنسیت‌های نر و ماده بر

جدول ۵- نتایج آزمون MANOVA بین جنسیت‌های نر و ماده در قورباغه آبی شامات *Pleophylax bedriagae*

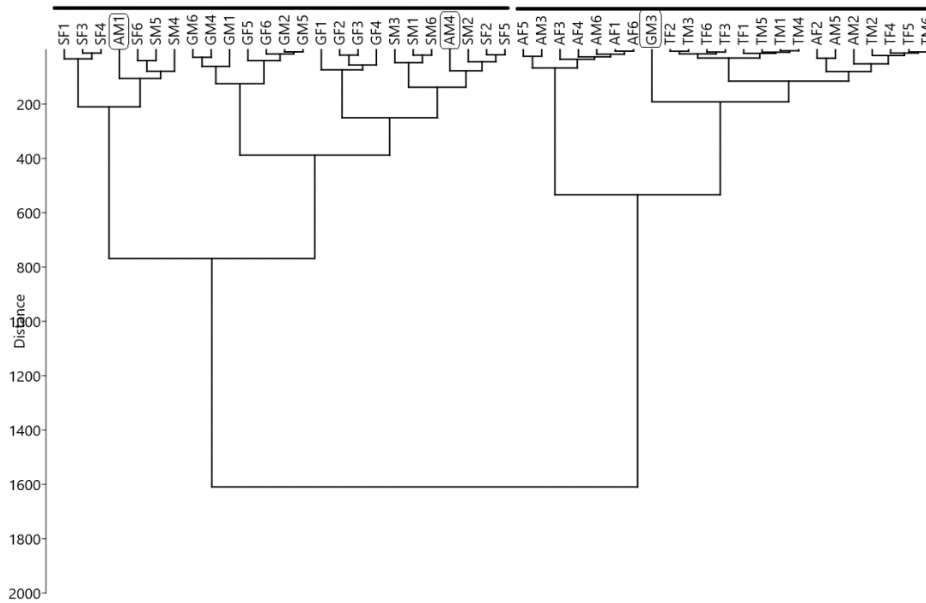
Wilks' lambda	$2/869E-66$	Pillai trace	$3/14$
df1	۱۰	df1	۱۰
df2	۳۷	df2	۳۷
F.	$1/29E-66$	F.	Big
P(same):	$0/758$	P(same):	$0/758$

جدول ۶- نتایج آزمون MANOVA برای جدایی جمعیت‌ها در قورباغه آبی شامات *Pleophylax bedriagae*

Wilks' lambda	$0/03309$	Pillai trace	$2/711$
df1	۳۰	df1	۳۰
df2	$103/4$	df2	۱۱۱
F.	$20/68$	F.	$34/71$
P(same):	$1/772E-31$	P(same):	$1/702E-43$

آلاگل و تنکابن بود. البته تنها ۳ نمونه به عنوان خطا در گروه‌های غیرمرتبط قرار گرفتند که تحلیل ما نشان می‌دهد ۹۳٪ خوشه‌بندی به شکل صحیح و درست انجام شده است (شکل ۷).

تحلیل خوشه‌ای (Clustering): نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای (Clustering) نمونه‌ها را بر اساس فاصله (Ward) به دو گروه تقسیم کرد که گروه اول شامل نمونه‌های گرگان و ساری و گروه دوم شامل نمونه‌های



شکل ۷- تصویر حاصل از تحلیل خوشه‌ای نمونه‌ها در قورباغه آبی شامات *Pleophylax bedriagae*

SF: Sari female, SM: Sari male, AF: Alagol female, AM: Alagol male, GF: Gorgan female, GM: Gorgan male, TF: Tonekabon female, TM: Tonekabon male.

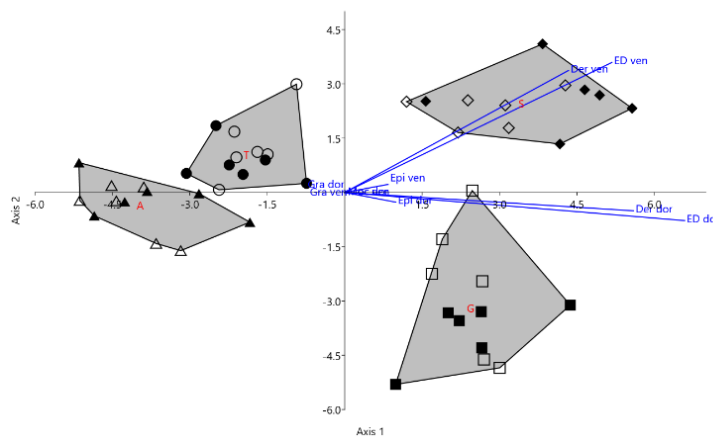
(خشک‌ترین زیستگاه) و تنکابن (مرطوب‌ترین زیستگاه) نسبت به نمونه‌های گرگان و ساری نتیجه جالبی است که احتمالاً نقش سایر مولفه‌های محیطی نظیر ارتفاع را مطرح می‌نماید (ارتفاع بیشتر در ساری و گرگان). اظهار نظر قطعی در این رابطه مستلزم انجام تحقیقات بیشتر است. در این گراف همچنین اهمیت صفات برای گروه‌ها به صورت خطوط آبی‌رنگ مشخص شده‌اند. بر این اساس نمونه‌های گرگان و ساری به علت پوست ضخیم‌تر (هم اپیدرم و هم درم) از نمونه‌های تنکابن و آلاگل جدا شده‌اند. همچنین در نمونه‌های بالای محور دوم (تنکابن و ساری) بخش شکمی پوست (هم اپیدرم و هم درم) ضخیم‌تر از بخش شکمی پوست در نمونه‌های گرگان و آلاگل می‌باشد، اما در نمونه‌های گرگان و آلاگل، بخش پشتی پوست (هم اپیدرم و هم درم) ضخیم‌تر از بخش پشتی آن در نمونه‌های ساری و تنکابن است. در کل این تحلیل نشان می‌دهد که بر اساس صفات پوستی می‌توان این گروه‌ها را از هم جدا کرد.

**تحلیل کانونیکال:** نتایج تحلیل کانونیکال نشان داد که ۸۹٪/۵۸ نمونه‌ها در دسته‌بندی خودشان قرار می‌گیرند. این تحلیل با آزمون رندوم‌سازی Jackknife اعتبارسنجی شده و اعداد جدول ۷ اعتبار آماری دارند. جدول ۷ نشان می‌دهد که از ۱۲ نمونه گرگان، ۱۱ نمونه در گروه خودشان و یک نمونه در گروه نمونه‌های ساری، از ۱۲ نمونه آلاگل ۱۰ نمونه در گروه خودشان و دو نمونه در گروه نمونه‌های تنکابن و از ۱۲ نمونه تنکابن ۱۰ نمونه در گروه خودشان، یک نمونه در گروه نمونه‌های آلاگل و یک نمونه در گروه نمونه‌های ساری طبقه‌بندی شده‌اند. البته باید ذکر کرد که نمونه‌های ساری تماماً در گروه خودشان دسته‌بندی شده‌اند.

شکل ۸ گراف حاصل از نتایج تحلیل کانونیکال بر اساس محورهای اول و دوم را نشان می‌دهد. محور اول گروه گرگان و ساری را از گروه آلاگل و تنکابن جدا می‌کند و محور دوم هر گروه را مورد تمایز قرار می‌دهد. این تحلیل نشان می‌دهد که بر اساس صفات پوستی می‌توان این گروه‌ها را از هم جدا کرد. قرار گرفتن دو گروه آلاگل

جدول ۷- نتایج تحلیل کانونیکال برای دسته بندی صفات.

مناطق	گرگان	آلاگل	ساری	تنکابن	کل نمونه‌ها
گرگان	۱۱	۰	۱	۰	۱۲
آلاگل	۰	۱۰	۰	۲	۱۲
ساری	۰	۰	۱۲	۰	۱۲
تنکابن	۰	۱	۱	۱۰	۱۲
کل نمونه‌ها	۱۱	۱۱	۱۴	۱۲	۴۸



شکل ۸- گراف حاصل از تحلیل کانونیکال. گروه‌های گرگان، ساری، آلاگل و تنکابن کاملاً از هم جدا شده‌اند.

## بحث و نتیجه گیری

در نمونه‌های ساری دیده می‌شوند که ممکن است به دلیل خشکی هوای بیشتر در منطقه آلاگل باشد. همچنین، بر اساس نتایج به دست آمده قطر درم به ترتیب در آلاگل، تنکابن، گرگان و ساری بیشتر می‌شود، یعنی می‌توان گفت که بیشترین ضخامت درم در نمونه‌های ساری و کمترین آن در نمونه‌های آلاگل دیده می‌شوند.

پوست ناحیه پشتی در نمونه‌های گرگان و آلاگل، ضخیم‌تر از پوست پشتی نمونه‌های ساری و تنکابن است، در حالی که پوست ناحیه شکمی در نمونه‌های ساری و تنکابن ضخیم‌تر از پوست شکمی نمونه‌های گرگان و آلاگل می‌باشد که ممکن است به علت میزان بارندگی کمتر در گرگان و آلاگل باشد. هرچقدر میزان بارندگی بیشتر و شرایط آب و هوایی سخت‌تر باشد، می‌توان گفت که پوست ضخیم‌تر است.

دوزیستان بی‌دم، شاخص بارزی از تنوع پذیری تحت شرایط مختلف محیطی می‌باشند. این جانوران مرتباً در معرض شرایط محیطی بی‌ثباتی هستند که باید با توان فیزیولوژیک بدن خود با آنها مواجه و آنها را به صورت مطلوبی درآورده تا قادر به ادامه حیات باشد (۲۴). تاکنون مشخص شده است که جمعیت‌های دوزیستان در شرایط اکولوژیکی مختلف دوره فعالیت، بازه زمانی تولیدمثلی و دوره لاروی متفاوتی دارند (۱، ۱۸، ۲۴).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که به ترتیب در آلاگل، تنکابن، گرگان و ساری قطر اپیدرم نسبت به کل پوست کمتر می‌شود، یعنی می‌توان گفت که بیشترین ضخامت اپیدرم نسبت به پوست در نمونه‌های آلاگل و کمترین آن

آمده در مورد تعداد غدد و ضخامت پوست، مشابه با نتایج تحقیق حاضر است.

در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۹ توسط Yang و همکاران انجام شد، ساختار پوست در چهار گونه از دوزیستان بی‌دم که در ارتفاعات بین ۱۰۰ متر تا ۴۵۰۰ متر زندگی می‌کنند مقایسه شد تا نوآوری‌های فنوتیپی در پوست *Nanorana parkeri* که در ارتفاعات بسیار بالا زندگی می‌کند، ارزیابی شود. نتایج نشان داد که میزان مورگ‌های اپیدرمی، رنگدانه‌های پوستی و غدد دانه‌ای، که با پاسخ به هیپوکسی و یا اشعه ماوراء بنفش مرتبط است، در گونه‌های موجود در ارتفاعات بالاتر، بیشتر است (۲۶).

در سال ۱۴۰۲ تحقیقی با موضوع دوشکلی جنسی در قورباغه‌ی سبز لوانت (*Pelophylax bedriagae*) در استان کهگیلویه و بویراحمد توسط فاطمه بام زر و همکاران انجام شد (۲). یافته‌های آنها نشان داد که برای ۱۲ صفت مورفومتریک بین جنس‌های نر و ماده تفاوت معنی‌دار وجود دارد. در این تحقیق بین جنس‌های نر و ماده از نظر ضخامت پوست و لایه‌های مختلف آن و همچنین تعداد غدد موکوسی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. با اینکه در بسیاری از گونه‌ها تفاوتی بین نرها و ماده‌ها از نظر ساختار پوست وجود دارد، در مطالعاتی که بر روی گونه‌های *Rhinella marinus* و *Pelophylax esculentus* انجام شده است، تفاوت معنی‌داری بین ساختار پوست نر و ماده مشاهده نشده است (۱۳ و ۲۵). در ارتباط با چرایی عدم تفاوت بین نرها و ماده‌ها به نظر می‌رسد که دو عامل را می‌توان در نظر گرفت. ۱- عامل درونی: ظاهراً سلول‌های پوستی در نرها و ماده‌ها ساختار متفاوتی برای دریافت ترشحات جنسی ندارند که روی آنها اثر نمایند. ۲- عامل بیرونی: زیستگاه نر و ماده در کنار هم است. بنابراین، نه عامل درونی و نه عامل بیرونی در رابطه با پوست، تفاوتی ندارند.

نتایج مطالعات نشان داد که تعداد غدد موکوسی در سطح پشتی پوست قورباغه‌های هر چهار منطقه بیشتر از سطح شکمی پوست می‌باشد اما اختلاف معنی‌داری بین جنسیت‌های نر و ماده مشاهده نشد. تعداد غدد موکوسی در سطح پشتی و شکمی پوست، در نمونه‌های ساری بیشتر از همه و در نمونه‌های آلاگل کمتر از همه نمونه‌های بررسی شده است (ساری < گرگان < تنکابن < آلاگل).

پس از بررسی نتایج بدست آمده از این تحقیق و با توجه به شاخص‌های اکولوژیکی مثل رطوبت، دما، بارندگی و ارتفاع می‌توان گفت که نمونه‌های آلاگل به دلیل بارندگی و رطوبت کمتر و دمای بیشتر این ناحیه، لایه‌های پوستی نازک‌تر و غدد پوستی کمتری دارند، اما نمونه‌های ساری به دلیل ارتفاع بیشتر این منطقه، لایه‌های پوستی ضخیم‌تر و غدد پوستی بیشتری دارند. این اختلافات مشاهده شده در پوست بین جمعیت‌های مناطق مختلف ممکن است نقش سازشی داشته باشد.

پژوهشی با عنوان بررسی ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی، بافت‌شناسی و بافت‌سنجی قورباغه مردابی *ridibundus* در شهر اهواز (منطقه گرم) و مقایسه آن با شهر شهرکرد (منطقه سرد) توسط پاپهن و همکاران (۱۳۹۵) انجام شد. بررسی صفات زیست‌سنجی نشان داد که میانگین اندازه‌های زیست‌سنجی قورباغه‌های نر و ماده منطقه سرد از منطقه گرم به طور معنی‌داری بیشتر است. همچنین نتایج نشان داد میانگین ضخامت کلی پوست، ضخامت اپیدرم و ضخامت درم ناحیه شکمی بدن قورباغه‌های نر و ماده منطقه سرد (شهرکرد) از منطقه گرم (اهواز) بیشتر می‌باشد ولی میانگین ضخامت کلی پوست در نواحی پشتی و شکمی بدن قورباغه‌های نر و ماده در هر منطقه اختلاف معنی‌داری نداشت. علاوه بر این، میانگین تعداد غدد موکوسی در نواحی پشتی و شکمی بدن قورباغه‌های نر و ماده متعلق به منطقه سرد به طور معنی‌داری بیشتر از منطقه گرم می‌باشد (۱). نتایج بدست

دارند، لذا با قطعیت نمی‌تواند نتایج حاصل از تحقیق حاضر را به زیستگاه‌های با اقلیم متفاوت تعمیم داد.

### سیاسگزاری

مقاله حاضر مربوط به داده‌های پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای یوسف تازیکی به راهنمایی زهرا نظری می‌باشد. لذا نویسندگان این مقاله از دانشگاه گلستان به خاطر حمایت‌های مالی قدردانی می‌نمایند.

بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر، زیستگاه و شرایط اکولوژیکی روی ضخامت پوست و لایه‌های آن و تعداد غدد پوستی تأثیرگذار است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که می‌توان از صفات پوستی در تحلیل‌های تشخیصی استفاده کرده و این گروه از جانوران را از هم جدا کرد. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به تعداد کم زیستگاه‌های مورد بررسی اشاره نمود. از آنجایی که زیستگاه‌های مورد بررسی همگی در شمال کشور قرار

### منابع

- ۱- پاپهن ف. اسمعیلیان ا. درست‌قول م. دژمان م (۱۳۹۵). بررسی مورفولوژیک، مورفومتریک، هیستولوژیک و هیستومتریک قورباغه مردابی (*Rana ridibunda*) Pallas 1771 در شهر اهواز (منطقه گرم) و مقایسه آن با شهر شهرکرد (منطقه سرد)، فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، شماره ۳.
- ۲- بام زر فاطمه، فتاحی نیا بهزاد، شفایی پور آریا (۱۴۰۲). دوشکلی جنسی در قورباغه‌ی سبز لوانت، (*Pelophylax bedriagae*) (Camerano, 1882)، در استان کهگیلویه و بویراحمد. پژوهش‌های جانوری (زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۳، شماره ۲.
- ۳- صفائی مهر ب. غفاری ه (۱۳۹۹)، دوزیستان ایران. راهنمای جامع زیست‌شناسی، بوم‌شناسی و حفاظت. انتشارات دانشگاه کردستان. صفحات ۱۸۵-۱۶۰.
- ۴- کمی ح (۱۳۷۶). دوزیستان و خزندگان پارک ملی گلستان. اولین کنفرانس جانورشناسی ایران. دانشگاه تربیت معلم تهران، ۲۳ صفحه.
- ۵- کمی ح (۱۳۷۸). گزارش جدیدی از پراکنش دوزیستان و خزندگان در ایران. اولین همایش دیرینه‌شناسی و تنوع زیستی ایران - کرمان. ۴-۷ خرداد، ۱ صفحه.
- ۶- کمی ح. ابراهیمی م (۱۳۸۳). مطالعه ریزساختارهای سطحی دهان لارو قورباغه جنگلی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره. دوازدهمین کنفرانس سراسری زیست‌شناسی ایران. دانشگاه بوعلی سینای همدان، ۸۶ صفحه.
- ۷- محمدی آلوچه ر. کمی ح. شجیعی ه. داداشی ع (۱۳۸۸). بررسی فون دوزیستان رودخانه بالخلو استان اردبیل. فصلنامه علمی پژوهشی زیست‌شناسی جانوری، سال ۲، شماره ۱.
- ۸- یوسفی سیاه کلرودی س. سعیدی ه. بهفر م. ا. فلاحی ر. ایزدیان م (۱۳۹۲). اطلس دوزیستان ایران، ۱۵ صفحه.
- 9- Azevedo R, de Jesus Santana A, de Brito Gitirana L (2006). Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (Anuran, Amphibian) under the evaluation of laser confocal microscopy. *Micron*, 37: 223-228.
- 10- Azevedo R, Pelli A, Ferreira-Pereira A, Santana A, Felseburgh F, de Brito- Gitirana L (2005). Structural aspects of the Eberth- Katschenko layer of *Bufo ictericus* integument: histochemical characterization and biochemical analysis of the cutaneous calcium (Bufonidae). *Micron*, 36: 61-65.
- 11- Brizzi R, Delfino G, Jantra S, Alvarez BB, Sever DM (1993). The amphibian cutaneous glands: some aspects of their structure and adaptive role, 23: 26-38.
- 12- Clarke BT (1997). The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical application. *Biol Rev*, 72: 365-379.
- 13- Vanburen C. S, Norman D.B, Fröbisch N. B (2019). Examining the relationship between sexual dimorphism in skin anatomy and body size in the white-lipped treefrog, *Litoria infrafrenata* (Anura: Hylidae), *Zoological Journal of the Linnean Society*, 186 491-500.
- 14- Felseburgh F, Carvalho-e-Silva S, de Brito-Gitirana L (2007). Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys* and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anuran, Leptodactylidae). *Micron*, 38: 439-445.

- 15- Felseburgh F, de Almeida P, de Carvalho E, de Brito- Gitirana L (2009). Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. *Micron*, 40: 198-205.
- 16- Fox H (1986). *Dermal glands: Topics in functional and ecological vertebrate morphology*. Germany: Shaker Publishing. pp: 153-190.
- 17- Moreno-Gómez F, Duque T, Fierro L, Arango J, Peckham X, Asencio -Santofimio H (2014). Histological Description of the Skin Glands of *Phyllobates bicolor* (Anura: Dendrobatidae) Using Three Staining Techniques. *International Journal of Morphology* pp:882-888.
- 18- Morrison C, Hero J.M (2003). Geographic variation in life history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology*, 36: 630-636.
- 19- Nagai H, Hillyard H (2001). The spinal nerves innervate putative chemosensory cells in the ventral skin of desert toads, *Bufo alvarius*. *Springer-Verlag*. 304: 185-192.
- 20- Radik G (2009). *Assessing Risks of Amphibian Declines Using Multiple Stressors*. Ohio University, 54p.
- 21- Rigolo J, Almeida J, Ananias F (2008). Histochemistry of skin glands of *Trachycephalus aff. venulosus* Laurenti, (Anura, Hylidae). *Micron*, 39: 56-60.
- 22- Schwinger G, Zanger K, Greven H (2001). Structural and mechanical aspects of the skin of *Bufo marinus* (Anura, Amphibia). *Tissue and Cell*, 33: 541-547.
- 23- Sengezer I. M, Kaptan E, Sancar S, Murathanoglu O, Suren C. S (2010). Localization of prolactin receptor in the dorsal and ventral skin of the frog (*Rana ridibunda*). *Biologia*, 65: 157-163.
- 24- Sinsch U, Lehr E (2010). Geographical Variation in the High Andean Frog *Telmatobius carrillae* Morales, 1988 Size, Skin Texture and Coloration. *Journal of Herpetology*, 44: 461-101.
- 25- Toledo RC, Jared C (1995). Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp Biochem Physiol*, pp: 1-29.
- 26- Yang C, Fu T, Lan X, Zhang Y, Nneji L.M, Murphy R.W, Sun Y, Che J (2019). Comparative skin histology of frogs reveals high-elevation adaptation of the tibetan *Nanorana parkeri*. *Asian Herpetological Research*, 10: 79-85.

# Histological structure of skin in *Pelophylax bedriagae* and its relationship with ecological factors in Golestan & Mazandaran provinces

**Brief title: Histological study of *Pelophylax bedriagae* skin in different ecological conditions**

**Taziki Y., Bagherian Yazdi A.A., Kami H.Gh. and Nazari Z.**

**Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, I.R. of Iran**

## Abstract

Amphibians have lived on Earth for more than 300 million years. Two species of *Pelophylax* have been reported in Iran, which are *Pelophylax bedriagae* and *Pelophylax gigas*. In the present study, the skin structure of 48 water frogs (*Pelophylax bedriagae*) in four different regions has been investigated. After taking specimens from Gorgan, Alagol, Sari, and Tonekabon regions, these specimens were transferred to the laboratory, and a part of their dorsal and ventral surface skin was separated. After tissue preparation and Hematoxylin-Eosin staining, four skin characteristics, including epidermis thickness, dermis thickness, total skin thickness, and the number of mucous glands in one mm<sup>2</sup> of skin, were examined under a light microscope and the obtained data were analyzed. The results of T and Mann-Whitney tests for all traits did not show significant differences between male and female groups. The results of parametric ANOVA and non-parametric Kruskal-Wallis tests showed that there is a significant difference between the investigated populations in all traits. The multivariate analysis of variance (MANOVA) test showed that the separation of populations is completely significant. The results of the cluster analysis divided the specimens into two groups based on the distance; the first group included the samples of Gorgan and Sari and the second group included the specimens of Alagol and Tonekabon. The results of the canonical analysis showed that 89.58% of the specimens fall into their categories. In general, this research showed that skin traits can be used in diagnostic analyzes and separate this group of animals.

**Key words:** *Pelophylax bedriagae*, Skin, Histologic examination, Mucous gland.