

Application of Skeletochronology in Studying the Histological Structure and Age of the Marsh Frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) in Khuzestan Province

Fahimeh Saberi¹, Ashraf Jazayeri^{1, *}, and Tayebbeh Mohammadi²

1- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

Received: 3 September 2024

Accepted: 12 January 2025

Key words

Marsh frog,
Lines of Arrested
Growth,
Bone structure,
Age determination,
Khuzestan

Abstract

This study investigates the bone tissue structure and growth patterns of the marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) populations in the northern and southern regions of Khuzestan Province using skeletochronology. This precise method analyzes Lines of Arrested Growth (LAGs) in long bones to accurately estimate the age and growth dynamics of individuals and populations. Twenty adult frogs, both males and females, were sampled during spring and autumn. Following preparation of histological sections and hematoxylin-eosin staining, four main bone regions—including the bone marrow, endosteal bone, periosteum, and LAGs—were carefully examined. Results showed a maximum lifespan of up to 12 years for females and 7 years for males, with the highest frequency observed in the 2- to 4-year age groups. A positive and significant correlation was found between age and both total body weight and eye lens weight, whereas the relationship between age and snout–vent length (SVL) was not significant, indicating that changes in body length were not clearly correlated with age. These findings highlight the influence of local climatic and ecological conditions on growth patterns and age structure in this species and emphasize the value of skeletochronology in ecological and conservation research on amphibians. By combining detailed morphometric and histological analyses, this study offers new insights for the sustainable management and protection of marsh frog populations in Khuzestan's diverse habitats.

*Corresponding Author: Jazayeriashraf@ymail.com

کاربرد اسکلتوکرونولوژی در مطالعه ساختار بافت شناسی و سن قورباغه مردابی *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 در استان خوزستان

فهیمة صابری^۱، اشرف جزایری^{۱*} و طیه محمدی^۲

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

پذیرش: ۲۳ دی ۱۴۰۳

دریافت: ۱۳ شهریور ۱۴۰۳

واژه‌های کلیدی	چکیده
قورباغه مردابی، خطوط توقف رشد، ساختار استخوان، سن سنجی، خوزستان	مطالعه حاضر به بررسی ساختار بافت استخوانی و الگوهای رشد قورباغه مردابی (<i>Pelophylax ridibundus</i>) در نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان با استفاده از روش اسکلتوکرونولوژی می‌پردازد. این روش با تحلیل خطوط توقف رشد (LAGs) در استخوان‌های دراز، سن و الگوی رشد فردی و جمعیتی را با دقت بالا تعیین می‌کند. نمونه‌برداری از ۲۰ قورباغه بالغ، شامل نر و ماده، در دو فصل بهار و پاییز انجام شد و پس از تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، ساختار چهار ناحیه اصلی استخوان شامل مغز استخوان، استخوان اندوست، پریوست و خطوط LAG به دقت بررسی گردید. نتایج نشان داد که بیشینه عمر گزارش شده برای ماده‌ها تا ۱۲ سال و برای نرها تا ۷ سال متغیر است، با بیشترین فراوانی در سنین ۲ تا ۴ سال. تفاوت معناداری در میانگین طول بدن نرها بین نواحی شمالی و جنوبی مشاهده شد، در حالی که طول بدن ماده‌ها در هر دو منطقه مشابه بود. همبستگی مثبت و معناداری بین سن با وزن کل و وزن عدسی چشم وجود داشت، اما رابطه سن با طول پوزه تا مخرج غیرمعنادار بود، به این معنی که تغییرات طول بدن به‌طور واضح با سن افراد همبستگی نداشت. یافته‌ها نشان‌دهنده تاثیر شرایط اقلیمی و زیستی منطقه بر الگوهای رشد و ساختار سنی این گونه است و اهمیت کاربرد اسکلتوکرونولوژی در مطالعات اکولوژیک و حفاظتی دوزیستان را تأکید می‌کند. این پژوهش با تکیه بر داده‌های دقیق و تجزیه و تحلیل مورفومتریک و بافت‌شناسی، افق‌های جدیدی را برای مدیریت پایدار و حفاظت از قورباغه مردابی در زیستگاه‌های متنوع خوزستان فراهم می‌آورد.

* پست الکترونیکی: Jazayeriashraf@ymail.com

مقدمه

در زمینه زیست‌شناسی و اکولوژی، تعیین دقیق ساختار سنی و مطالعه مورفولوژی استخوانی از اهمیت حیاتی برخوردار است، زیرا اطلاعات دست‌یافتنی از طریق این مطالعات می‌تواند نقش مهمی در درک فرآیندهای رشد، الگوهای جمعیتی و واکنش گونه‌ها به تغییرات محیطی ایفا کند (Agarwal, 2016). قورباغه مردابی (*Pelophylax ridibundus*) گونه‌ای گسترده در استان خوزستان است که با توجه به تنوع زیستگاهی و شرایط اقلیمی خاص این منطقه، فرآیندهای رشد و بلوغ آن ممکن است تفاوت‌های قابل توجهی داشته باشد (Gül et al., 2024). در این میان، اسکلتوکرونولوژی به عنوان یک روش دقیق و غیرمخرب، امکان تعیین سن فردی و تحلیل ساختار جمعیت را از طریق شمارش خطوط متوقف شده رشد (LAGs) در استخوان‌های دراز فراهم می‌آورد (Szekely et al., 2025). این خطوط که معمولاً نمایانگر دوره‌های رکود یا کاهش رشد استخوانی در دوره‌های زمستانی یا شرایط نامساعد است، به طور گسترده در پژوهش‌های دوزیستان برای تعیین سن واقعی و بررسی روندهای رشدی به کار می‌رود (Marangoni et al., 2018; McCraney et al., 2020).

از منظر تشریحی، در دوزیستان بی‌دم مانند قورباغه مردابی، هر نیمه از کمر بند لگنی شامل سه استخوان اصلی تهیگاهی (*ilium*)، نشیمن‌گاهی (*ischium*) و شرم‌گاهی (*pubis*) است (Soliz et al., 2018). استخوان تهیگاهی با ساختار کشیده و اتصال گسترده به استخوان خاجی و یوروستیل، نقش مهمی در انتقال و جذب شوک‌های مکانیکی ناشی از فرود پس از جهش ایفا می‌کند (Sherstiuk et al., 2020). این ویژگی‌های تقسیم‌بندی و اتصال استخوان‌ها در کنار تخصص اندام‌های حرکتی عقبی، که شامل استخوان‌های درشت‌نی و نازک‌نی با جوش خوردگی‌های خاص برای افزایش استحکام و کارایی جهش و شنا هستند، نمایانگر سازگاری‌های مورفولوژیکی قابل توجه این گونه است.

(Leavey, 2023). مطالعات متعددی با بهره‌گیری از روش اسکلتوکرونولوژی بر گونه *P. ridibundus* انجام شده است که هر یک جنبه‌های متفاوتی از زیست‌شناسی این گونه را آشکار کرده‌اند. این پژوهش‌ها علاوه بر تعیین سن و بررسی ساختار سنی جمعیت، اطلاعات ارزشمندی در زمینه الگوهای رشد، تفاوت‌های جنسی و نقش شرایط اقلیمی در پویایی جمعیت فراهم ساخته‌اند. به عنوان نمونه، مطالعه‌ای در منطقه Gölbaşı ترکیه نشان داد که میانگین سن نرها و ماده‌ها به ترتیب حدود ۳,۷۷ و ۳,۷۲ سال است و اختلاف معناداری از نظر سنی میان دو جنس وجود ندارد. این پژوهش همچنین تفاوت وزنی قابل توجهی بین جنس‌ها گزارش کرد، در حالی که طول بدن تفاوت چشمگیری نشان نداد (Alkaya & Şereflişan, 2024). علاوه بر این، پژوهشی در کریمه نشان داد که سن کرونولوژیک همواره با سن بیولوژیکی منطبق نیست و تفاوت‌های قابل توجهی در الگوهای رشد مورفومتريک بین جنسیت‌ها مشاهده می‌شود (Peskov et al., 2019). مطالعات دیگری در اروپا، قفقاز و ایران نیز نشان داده‌اند که بافت استخوانی قورباغه مردابی دارای پیچیدگی‌ها و تنوع ساختاری قابل توجه است که تحت تأثیر شرایط اکولوژیکی و اقلیمی هر منطقه قرار دارد (Lyapkov et al., 2021; Safaei-Mahroo et al., 2023). به طور خاص، پژوهش‌ها تأکید کرده‌اند که استفاده از استخوان‌های بلند مانند استخوان‌های انگشت در تعیین سن با استفاده از روش اسکلتوکرونولوژی به دلیل وضوح بالای خطوط رشد نسبت به استخوان‌های تخت، دقت و قابلیت اطمینان بیشتری دارد (Clarkson et al., 2025).

با وجود این پیشرفت‌ها، در استان خوزستان که زیستگاه‌های منحصربه‌فرد و تنوع زیستی بالایی دارد، تاکنون مطالعات جامعی درباره ساختار استخوان دراز و روندهای سنی قورباغه مردابی با بهره‌گیری از روش‌های اسکلتوکرونولوژی انجام نشده است. شناخت دقیق سن، الگوهای رشد و ویژگی‌های مورفولوژیکی استخوانی این گونه در منطقه می‌تواند نقش مهمی در برنامه‌های حفاظتی، مدیریت جمعیت و درک بهتر فرآیندهای زیستی ایفا کند.

1. Lines of Arrested Growth

از این رو، انجام پژوهش‌های تخصصی با رویکرد اسکلتوکرونولوژی بر روی استخوان دراز *P. ridibundus* در استان خوزستان ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش کار

روش تهیه مقاطع بافتی از استخوان، به دلیل ماهیت سخت و متراکم این بافت، فرآیندی تخصصی و نیازمند به کارگیری روش‌های تکمیلی و تجربه کافی است. در این مطالعه، ۲۰ نمونه قورباغه مردابی شامل ۵ نمونه نر و ۳ نمونه ماده از نواحی شمالی، و ۵ نمونه نر و ۷ نمونه ماده از نواحی جنوبی استان خوزستان به صورت انتخابی و در فصول بهار و پاییز سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ جمع‌آوری شدند (تعداد نر و ماده در هر منطقه متفاوت بوده است، چرا که فراوانی طبیعی گونه و دسترسی به نمونه‌ها در هر منطقه متفاوت بود و نمونه‌ها به صورت انتخابی جمع‌آوری شدند تا نمایانگر واقعی شرایط طبیعی جمعیت باشند)، (شکل ۱). آنها پس از بی‌حس‌سازی با کلروفرم، برای انجام مراحل بعدی آماده‌سازی شدند و ابتدا اندازه طول پوزه تا مخرج (SVL) و دیگر شاخص‌های مورفومتریک نمونه‌ها به دقت اندازه‌گیری شدند. با توجه به شرایط فصلی جمع‌آوری و دقت در تهیه مقاطع استخوانی، ممکن است خطاهای جزئی در شمارش LAGها رخ دهد، اما تا حد امکان تلاش شد این خطاها به حداقل برسند و نتایج معتبر باقی بمانند.



شکل ۱. نقشه جغرافیایی استان خوزستان و نواحی نمونه برداری

در مرحله بعد، استخوان‌های ران و درشت‌نی گرفته شده از اندام‌های حرکتی خلفی جدا شدند و پس از حذف بافت‌های نرم اطراف، در محلول فرمالین ۱۰ درصد برای

فیکساسیون به مدت دو هفته قرار گرفتند. سپس برای نرم‌سازی و حذف کلسیم موجود در بافت استخوان به منظور تسهیل در برش‌دهی، نمونه‌ها در محلول اسید نیتریک ۵ درصد با دقت زمانی متناسب با ضخامت استخوان قرار گرفتند؛ به طوری که استخوان‌های نازک‌تر حدود ۱۰ دقیقه و استخوان‌های ضخیم‌تر تا حدود ۵۰ دقیقه در این محلول باقی ماندند. پس از تایید نرمی بافت‌ها به کمک ابزارهای دقیق، نمونه‌ها برای خنثی‌سازی اسید، در محلول قلیایی سولفات لیتیم ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس با دقت شستشوی کامل شدند (Harry et al., 2008; Roberts et al., 2020; Savi et al., 2017). نمونه‌ها برای کاهش رطوبت به صورت تدریجی در محلول‌های اتانول با غلظت‌های افزایشی ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد قرار گرفتند، به طوری که هر مرحله حدود یک و نیم ساعت به طول انجامید. پس از آن، برای شفاف‌سازی و افزایش وضوح بافت‌ها در مراحل میکروسکوپی، نمونه‌ها به ترتیب در محلول‌های گزیلین I و گزیلین II به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در پارافین غوطه‌ور شدند تا نفوذ کامل پارافین به بافت‌ها صورت بگیرد (Kusano et al., 1995; Slaoui et al., 2017; Zhanmu et al., 2020). برش‌های عرضی این مقاطع با ضخامت ۵ تا ۷ میکرومتر با استفاده از میکروتوم دوار تهیه شدند و برای مشاهده جزئیات بافتی، مقاطع به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع رنگ‌آمیزی شده تحت میکروسکوپ نوری مورد بررسی دقیق مورفولوژیکی و بافت‌شناسی قرار گرفتند (Abbasi et al., 2019). برای بررسی تفاوت‌های احتمالی در تعداد خطوط توقف رشد استخوانی بین نمونه‌های نر و ماده، داده‌های به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند که این تحلیل‌ها توسط نرم‌افزار SPSS V 26 انجام شد تا الگوهای رشد و تغییرات احتمالی براساس جنسیت مورد ارزیابی قرار گیرد. بدین ترتیب، روش استاندارد دقیق در آماده‌سازی بافت‌های استخوانی برای مطالعات اسکلتوکرونولوژی امکان تحلیل دقیق ساختار استخوان و

بافتی استخوان دراز *P. ridibundus* ساختار پیچیده و منظم بافت استخوان را نشان داد. با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) تهیه شده و بخش‌های مختلفی از بافت استخوان را قابل شناسایی می‌سازد. چهار ناحیه اصلی در این مقاطع مشاهده شد: مغز استخوان (BM)، استخوان اندوست (EB)، پریوست (PB) و خطوط توقف رشد یا LAGها (شکل ۲).

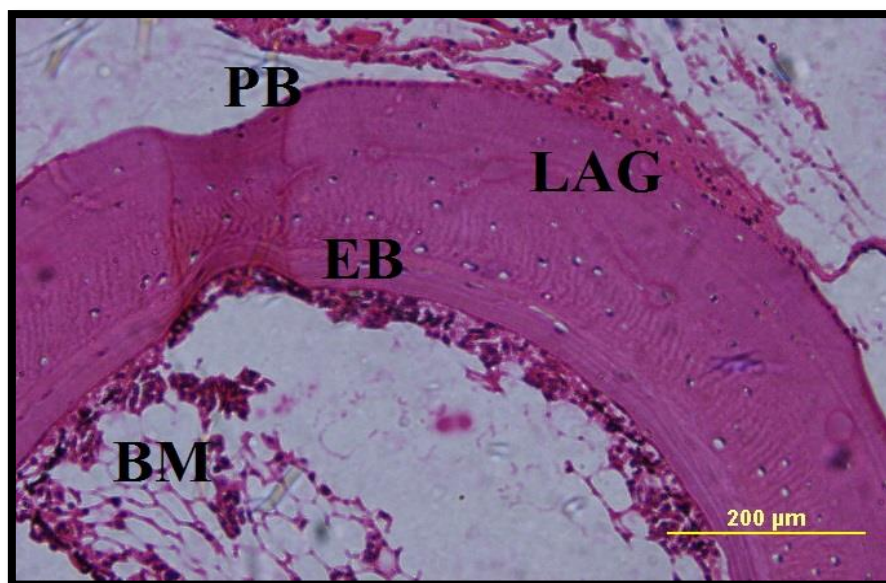
تعیین سن تخمینی را، با حفظ کیفیت نمونه‌های بافتی، فراهم می‌آورد (Andronowski & Cole, 2021; McCreary et al., 2008; Zhang et al., 2024).

نتایج

مطالعات مورفومتریک انجام شده بر گونه *P. ridibundus* نشان داد که میانگین طول پوزه تا مخرج (SVL) در نرهای نواحی شمالی استان خوزستان برابر با ۶۳٫۲۳ میلی‌متر بوده که به تفکیک برای نرها ۵۴٫۲۳ میلی‌متر و برای ماده‌ها ۶۲٫۵۹ میلی‌متر گزارش شد. در نواحی جنوبی این مقدار برای نرها ۶۴٫۰۹ میلی‌متر و برای ماده‌ها ۶۲٫۷۴ میلی‌متر بود. بنابراین، نرهای شمالی به طور قابل توجهی کوتاه‌تر از نرهای جنوبی هستند، اما میانگین SVL ماده‌ها در هر دو منطقه تقریباً مشابه باقی ماند (جدول ۱). بررسی‌های مقاطع

جدول ۱. اطلاعات مربوط به وزن افراد نر و ماده، در نواحی شمالی استان متعلق به گونه *P. ridibundus*

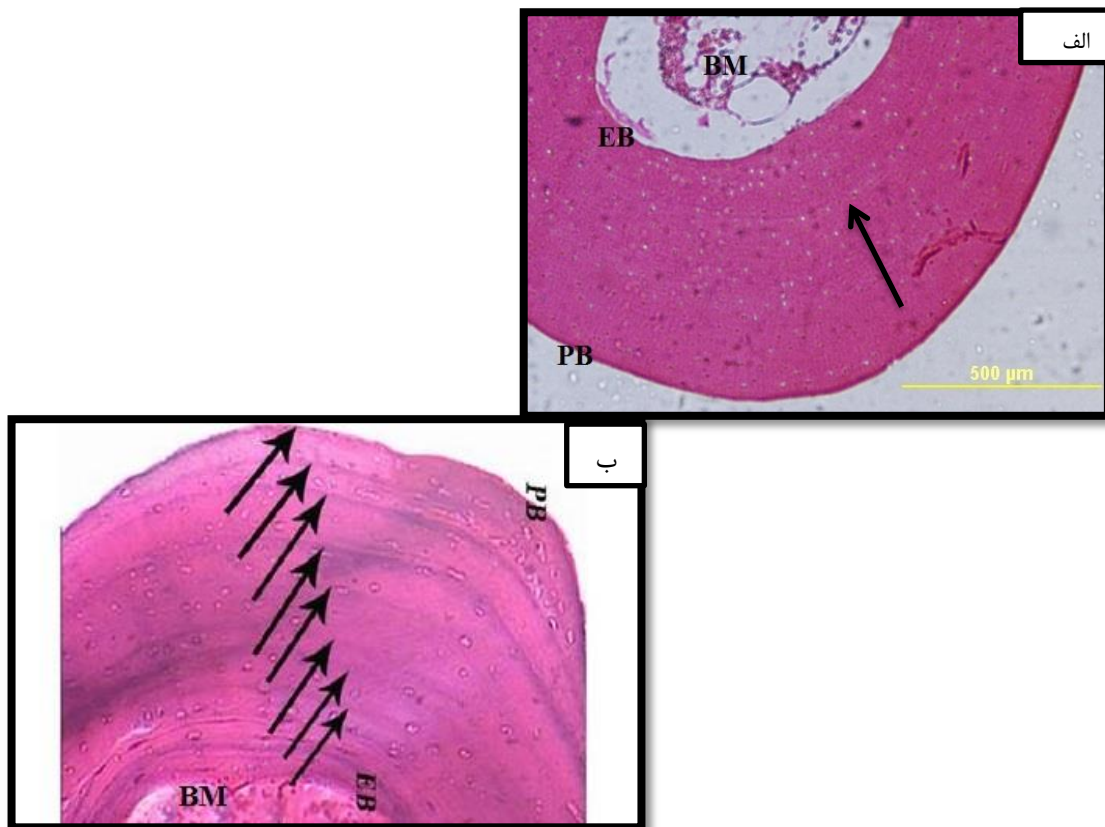
Gender	W(gr)	SVL	Age
Male	۲۸/۲۵	۵۵/۹۴	۳
Male	۴۰/۲۱	۷۷/۷۹	۵
Male	۲۰/۴۰	۵۴/۳۰	۲
Male	۴۳/۷۶	۸۳/۱۵	۴
Male	۸/۰۲	۴۵/۲۵	۱
Female	۵۶/۵۹	۵۳/۲۱	۷
Female	۳۴/۵۸	۷۴/۴۷	۳
Female	۱۹/۹۳	۶۰/۱۱	۲
Mean	۳۱/۴۶	۶۲/۹۹	~۴



شکل ۲. برشی از قسمت‌های تشکیل دهنده بافت استخوان. مغز استخوان BM، آندوست استخوان EB، پریوست استخوان PB، حلقه یا خطوط توقف رشد LAG، رنگ آمیزی H&E.

یکی از ویژگی‌های برجسته این بافت، خطوط هم‌مرکز متراکم و تیره رنگ هستند که به نام خطوط توقف رشد یا LAGs شناخته می‌شوند. این خطوط حکایت از توقف‌های دوره‌ای در فرآیند استخوان‌سازی و رشد دارند که معمولاً ناشی از شرایط نامساعد محیطی مانند تغییرات فصلی است. تعداد این خطوط به طور مستقیم با سن زیستی نمونه‌ها مرتبط بوده و امکان تخمین سن دقیق با استفاده از روش اسکلتوکرونولوژی را فراهم می‌کند. این حلقه‌ها در تصویر با رنگی متفاوت و خطوط مشخص قابل رویت هستند. در واقع هر LAG نمایانگر یک دوره توقف رشد استخوان در طول سال یا دوره زمانی مشخص است (شکل ۳).

مغز استخوان که در مرکز مقطع قرار دارد، شامل بافت خون‌ساز بوده و با ظاهری متخلخل و دارای تراکم کمتر نسبت به سایر بخش‌ها قابل تشخیص است. این ناحیه نقش حیاتی در تولید سلول‌های خونی و تغذیه بافت استخوان ایفا می‌کند. پیرامون مغز استخوان، بافت استخوانی متراکم (EB) قرار داشته که ساختار سخت و مستحکمی دارد و ترکیبی از ماتریکس‌های کلسیمی و سلول‌های استخوانی است که در لاکوناها (فضاهای کوچک) جای گرفته‌اند. این لاکوناها محل زندگی استئوسیت‌ها هستند که سلول‌های تخصصی در حفظ و بازسازی استخوان‌اند. پریوست (PB) که در لایه خارجی‌تر استخوان قرار دارد، لایه‌ای نازک و نسبتاً منعطف است. این بخش با تغذیه و محافظت از بافت استخوانی، نقش عمده‌ای در ترمیم و رشد استخوان ایفا می‌کند. همچنین، پریوست محل اتصال عروق خونی و عصبی به استخوان است که به تامین مواد مغذی و اکسیژن کمک می‌کند.



شکل ۳. فتومیکروگراف‌های حاصل از بافت استخوانی، در تصویر الف، تنها یک خط مشاهده می‌شود. در حالیکه بافت استخوانی تصویر ب، تعداد ۸ هشت حلقه مشاهده می‌شود. بزرگنمایی تصویر ۲ برابر ۱۰۰×. رنگ آمیزی H&E.

بیولوژیکی این جمعیت‌ها است. علاوه بر آن، بیشینه تعداد حلقه‌های سالیانه شمارش شده در این مطالعه به ۱۲ حلقه رسید که نشانگر افزایش طول عمر و سن بافتی برابر با ۱۲ سال برای نمونه‌های خاص می‌باشد. پیرترین نمونه‌ها در میان نرهای مناطق شمالی و جنوبی ۵ سال و جوان‌ترین‌ها ۱ سال سن داشتند. در حالی که در ماده‌ها، پیرترین نمونه‌ها ۱۲ ساله و جوان‌ترین نمونه‌ها ۲ ساله بودند. تراکم فراوانی نمونه‌ها نیز در سنین ۲ و ۳ سال در نواحی شمالی و سن ۴ سال در نواحی جنوبی بیشتر گزارش شد، در حالی که نمونه‌های سنین بالای ۵ سال کمترین فراوانی را داشتند که می‌تواند ناشی از عوامل طبیعی و زیستی خاص این گونه باشد (جدول ۲).

در بخش داخلی تر استخوان، ناحیه آندوست دیده می‌شود که نسبت به بافت اصلی استخوان نازکتر است و شامل حلقه‌هایی است که بر اساس عرف علمی، به عنوان حلقه‌های سالیانه محسوب نمی‌شوند و تأثیر کمتری در تعیین سن دارند.

شمارش دقیق LAG ها در نمونه‌های مختلف نشان داد که تعداد این خطوط در نمونه‌های جمع‌آوری شده از نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان با یکدیگر تفاوت قابل توجهی دارد. مثلاً در یک نمونه نر با SVL 45.25 میلی‌متر از نواحی شمالی، تنها یک حلقه LAG ثبت شد، در حالی که نمونه ماده‌ای با SVL 54.18 میلی‌متر از نواحی جنوبی، دارای هشت حلقه LAG بود. چنین تفاوت‌هایی نشان‌دهنده تنوع ساختاری در الگوی رشد استخوانی و سن

جدول ۲. اطلاعات مربوط به تعداد نمونه‌ها (S.N)، تعداد خطوط توقف رشد شمارش شده (L.N) و درصد فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده (%) در نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان متعلق به گونه *Pridibundus*

نواحی جنوبی			نواحی شمالی		
درصد فراوانی (%)	خطوط توقف رشد (L.N)	شماره نمونه (S.N)	درصد فراوانی (%)	خطوط توقف رشد (L.N)	شماره نمونه (S.N)
کل	ناحیه		کل	ناحیه	
۱۰	۱۶/۶۶	۲	۵	۱۲/۵	۱
۱۰	۱۶/۶۶	۳	۱۰	۲۵	۲
۲۵	۶۲/۵	۴	۱۰	۲۵	۳
۵	۸/۳۳	۸	۵	۱۲/۵	۴
۵	۸/۳۳	۱۱	۵	۱۲/۵	۵
۵	۸/۳۳	۱۲	۵	۱۲/۵	۷

میانگین سن در نرهای هر دو منطقه تقریباً یکسان و برابر با ۳ سال بود، اما نرهای شمالی دارای دامنه سنی بیشتر و تنوع گسترده‌تری بودند. میانگین سن ماده‌ها در نواحی شمالی ۴ سال و در نواحی جنوبی ۶ سال برآورد شد. همبستگی مثبت و معنادار بین سن نمونه‌ها با وزن کل بدن و وزن عدسی چشم وجود داشت که نشان‌دهنده رشد تدریجی و تجمع مواد در بدن با افزایش سن است، اما رابطه معناداری بین سن و SVL در بیشتر نمونه‌ها مشاهده نشد. ارتباط سن و وزن بدنی در هر دو ناحیه مشابه بود، اما همبستگی بین سن و وزن عدسی چشم در نمونه‌های شمالی کمتر از نمونه‌های جنوبی بود.

بحث و نتیجه گیری

هدف اصلی مطالعه حاضر، بررسی و تحلیل بافت استخوانی گونه قورباغه مردابی (*P. ridibundus*) و مقایسه پارامترهای مرتبط با طول عمر، ساختار سنی و الگوی رشد در جمعیت‌های مختلف این گونه در نواحی شمالی و جنوبی استان خوزستان بود؛ تا تأثیر شرایط اقلیمی و اکولوژیکی بر رشد و بقاء این گونه مهم بررسی شود. اهمیت بررسی‌های بافت‌شناسی استخوان در این مطالعات ناشی از نقش کلیدی آن در تعیین سن دقیق، الگوهای رشد و شناخت ویژگی‌های زیستی مهره‌داران است.

دوزیستان مانند بسیاری از مهره‌داران، در طول عمر خود رشد می‌کنند؛ این رشد اغلب در سنین پایین‌تر با سرعت بیشتری انجام می‌شود و بسته به شرایط محیطی مانند فراوانی غذا و تغییرات فصلی، ممکن است سرعت آن متغیر باشد (Burrow & Maerz, 2022; Hjernquist et al., 2012). روش‌های متعددی برای تعیین سن در مهره‌داران وجود دارد که برخی از آنها در شرایط آزمایشگاهی و برخی در محیط طبیعی کاربرد دارند؛ اما یکی از دقیق‌ترین و قابل اعتمادترین روش‌ها در دوزیستان، استفاده از اسکلتوکرونولوژی است که بر اساس تحلیل خطوط توقف رشد (LAGs) در بافت استخوانی استوار است (Lyapkov, 2025; Sinsch, 2015; Zhang et al., 2024).

مطالعات مشابه نشان داده‌اند که خطوط LAG به عنوان شاخصی از دوره‌های توقف رشد که معمولاً در اثر شرایط نامساعد محیطی مانند زمستان‌خوابی اتفاق می‌افتند، عمل می‌کنند (Wells et al., 2022). همچنین در دوره دگردیسی، رشد بافت استخوانی متوقف می‌شود و خطوط LAG نمایانگر دوره‌های پس از این رویداد هستند؛ هرچند در افراد مسن ممکن است تعدادی از این خطوط در فرآیند جذب استخوان حذف شوند، اما این موضوع تأثیر چشم‌گیری بر تعیین سن ندارد (Birkhold et al., 2014). نتایج این مطالعه حاکی از طول عمر متغیر جمعیت *P.*

شرایط محیطی و تغییرات فصلی می‌توانند تأثیر عمده‌ای بر رشد و توسعه فردی دوزیستان داشته باشند.

مطالعات انجام شده بر گونه *Pelophylax pleurade* در منطقه سیچوان چین نشان داده است که بین افزایش ارتفاع و اندازه بدن رابطه چشمگیری وجود ندارد و سرعت رشد پس از دگردیسی تحت تأثیر ارتفاع نبوده است. در این مطالعه ماده‌ها سریع‌تر از نرها رشد کردند که این روند با یافته‌های مطالعه حاضر که نشان‌دهنده وزن بالاتر ماده‌ها در هر دو منطقه بود، همخوانی دارد (Gül et al., 2024). نگاهی به الگوی قانون برگمان، که بیان می‌کند گونه‌ها در مناطق سردتر معمولاً از نظر اندازه بزرگ‌تر هستند، در مطالعات مختلف دوزیستان، از جمله *P. ridibundus*، نتایج متناقضی ارائه کرده است. بعضی تحقیقات این قانون را تأیید و برخی دیگر آن را رد می‌کنند. مطالعه حاضر نیز نشان داد که میانگین اندازه بدن در جمعیت‌های جنوبی بزرگ‌تر از شمالی‌ها بود، که با فرضیه برگمان مغایرت داشت، اما توسط یافته‌های جدیدتر که نشان از پیچیدگی و استثنا در این قانون ویژه دوزیستان دارد، پشتیبانی می‌شود (Olalla et al., 2009).

از نظر کلی، تفاوت‌های مشاهده شده در سن، ابعاد و الگوی رشد جمعیت‌های *P. ridibundus* در استان خوزستان به عوامل متعددی از جمله شرایط محیطی، منابع غذایی و رقابت درون‌جمعیتی بستگی دارد. این یافته‌ها اهمیت مطالعات جمعیتی و بافت‌شناسی را در فهم بهتر روندهای زیستی گونه‌های دوزیست در اکوسیستم‌های مختلف افزایش می‌دهد و کاربرد روش‌های دقیق و علمی مانند اسکلتوکرونولوژی را در تحقیقات اکولوژیک و حفاظتی برجسته می‌سازد.

منابع

Abbasi, S., Le, M., Sonier, B., Dinakaran, D., Bigras, G., Bell, K., Mackey, J. R., & Haji Reza, P. (2019). All-optical reflection-mode microscopic histology of unstained human tissues. *Scientific reports*, 9(1), 13392.

ridibundus در خوزستان است؛ به طوری که سن جوان‌ترین و پیرترین نمونه‌ها در نواحی شمالی بین ۱ تا ۷ سال و در نواحی جنوبی بین ۲ تا ۱۲ سال برآورد شد. بیشترین فراوانی نمونه‌ها در مناطق شمالی مربوط به گروه‌های سنی ۲ و ۳ ساله و در مناطق جنوبی گروه ۴ ساله بود. تفاوت سنی مشاهده شده بین دو ناحیه احتمالاً ناشی از تفاوت‌های زیست‌محیطی و شرایط اقلیمی هر منطقه است، که می‌تواند بر رشد، طول عمر و الگوهای جمعیتی گونه تأثیر بگذارد. همچنین سن بلوغ جنسی برای نرها در هر دو منطقه ۲ سالگی و برای ماده‌ها ۲ تا ۳ سالگی تخمین زده شد. این نتایج هم‌راستا با یافته‌های مطالعاتی مانند آنچه توسط Guarino et al. (2008) در گونه *Rana temporaria* در شمال ایتالیا مشاهده شده است که میانگین سن نرها ۳ سال و ماده‌ها ۶ سال، با حداکثر عمر ۱۰ سال بود. همچنین در این مطالعه، سن بلوغ جنسی ماده‌ها در سال دوم و نرها در سال سوم گزارش شده است که مشابه الگوهای مشاهده شده در *P. ridibundus* می‌باشد (Guarino et al., 2008). مطالعات دیگری در ژاپن در ارتباط گونه *Rana nigromaculata* نشان داد که سن بلوغ جنسی برای نرها در سال سوم و برای ماده‌ها در سال دوم است؛ همچنین نمونه‌هایی از این گونه در مناطق مختلف با تفاوت‌های قابل توجهی در اندازه بدن و ساختار سنی گزارش شدند که این تفاوت‌ها بیشتر تحت تأثیر رقابت‌های درون‌جمعیتی و شرایط زیستی قرار دارند (Khonsue et al., 2001). این موضوع با نتایج مطالعه حاضر همگرایی دارد که در آن میانگین اندازه بدن نرها از ماده‌ها بیشتر بود و تفاوت‌هایی در ویژگی‌های جمعیتی مشاهده شد. علاوه بر این، بررسی‌های انجام شده بر گونه *Rana perezii* در جنوب غربی اسپانیا نشان داد که الگوی رشد و ساختار استخوانی این گونه می‌تواند به شدت متأثر از شرایط اقلیمی محلی باشد. این مطالعه بیان می‌کند که برخی نرها در سال اول و برخی ماده‌ها در سال سوم به بلوغ جنسی می‌رسند و طیف وسیعی از اندازه‌ها در بین افراد یک ساله به دلیل طولانی شدن دوره دگردیسی مشاهده شده است (Peso Fernández, 2018). این یافته‌ها تأکید می‌کنند که

- geographic gradient in an ectothermic vertebrate. *Oecologia*, 170(3), 641–649 .
- Khonsue, W., Matsui, M., Hirai, T., & Misawa, Y. (2001). A comparison of age structures in two populations of a pond frog *Rana nigromaculata* (Amphibia: Anura). *Zoological Science*, 18(4), 597-603 .
- Kusano, T., Fukuyama, K., & Miyashita, N. (۱۹۹۵) . Body size and age determination by skeletochronology of the brown frog *Rana tagoi tagoi* in southwestern Kanto. *Jpn J Herpetol*, 16, 29-34 .
- Leavey, A. C. H. (2023). *The Evolution of musculoskeletal anatomy and locomotor mode in frogs* UCL (University College London) .[(
- Lyapkov, S. (2025). Skeletochronology of Amphibians and Reptiles: Fundamentals of Methodology, Variety of Problems, and Prospects. *Biology Bulletin*, 52(4), 109 .
- Lyapkov, S. M., Kondratova, T. E., Ivolga, R. A., Kidova, E. A., & Kidov, A. A. (2021). Growth layers and its complex structure in a common species under uncommon conditions: *Pelophylax ridibundus* in the Talysh Mountains. *Russian Journal of Herpetology*, 28(5), 242-248 .
- Marangoni, F., Stănescu, F., Courtis, A., Piñeiro, J. M., del Rosario Ingaramo, M., Cajade, R., & Cogălniceanu, D. (2018). Coping with aridity: life history of *Chacophrys pierottii*, a fossorial anuran of Gran Chaco. *South American Journal of Herpetology*, 13(3), 230-237 .
- McCrane, W. T., Thacker, C. E., & Alfaro, M. E. (2020). Supermatrix phylogeny resolves goby lineages and reveals unstable root of Gobiaria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 151, 106862 .
- McCreary, B., Pearl, C. A., & Adams, M. J. (2008). *A protocol for aging anurans using skeletochronology*– (1258-2331).
- Olalla-Tárraga, M. Á., Diniz-Filho, J. A. F., Bastos, R. P., & Rodríguez, M. Á. (2009). Geographic body size gradients in tropical regions: water deficit and anuran body size in the Brazilian Cerrado. *Ecography*, 32(4), 581-590 .
- Peskov, V., Petrenko, N., & Reminnyi, V. Y. (2019). Size-at-age variability and sexual dimorphism of morphometric
- Agarwal, S. C. (2016). Bone morphologies and histories: Life course approaches in bioarchaeology. *American journal of physical anthropology*, 159, 130-149 .
- Alkaya, A., & Şereflişan, H. (2024). A Study on Age Determination and Life Cycle of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) by Skeletochronology Method. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(5), 1999-2009 .
- Andronowski, J. M., & Cole, M. E. (2021). Current and emerging histomorphometric and imaging techniques for assessing age-at-death and cortical bone quality. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, 3(2), e1399 .
- Birkhold, A. I., Razi, H., Duda, G. N., Weinkamer, R., Checa, S., & Willie, B. M. (2014). The influence of age on adaptive bone formation and bone resorption. *Biomaterials*, 35(34), 9290-9. ۳۰۱
- Burrow, A., & Maerz, J. (2022). How plants affect amphibian populations. *Biological Reviews*, 97(5), 1749-1767 .
- Clarkson, P., Randall, C., Jenkins, E., & Hambleton, E. (2025). A Novel Sizing Method for Analysing Amphibians from Archaeological Sites :A Case Study from the Medieval Manor Site at Lower Putton Lane, Dorset, England. *Environmental Archaeology*, 1-13 .
- Guarino, F., Di Già, I., & Sindaco, R. (2008). Age structure in a declining population of *Rana temporaria* from northern Italy. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 54(1), 99-112 .
- Gül, S., Dursun, C., Tabak, C., Büyüksöfuğlu, S., & Özdemir, N. (2024). Age Structure, Body Size, and Sexual Dimorphism in a High-Altitude Population of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771). *Animals*, 14(22), (3230 .
- Harry, L. E., Sandison, A., Paleolog, E. M., Hansen, U., Pearce, M. F., & Nanchahal, J. (2008). Comparison of the healing of open tibial fractures covered with either muscle or fasciocutaneous tissue in a murine model. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(9), 1238-1244 .
- Hjernquist, M. B., Söderman, F., Jönsson, K. I., Herczeg, G., Laurila, A., & Merilä, J. (2012). Seasonality determines patterns of growth and age structure over a

- amphibians. *The Herpetological Journal*, 25(1), 5-13 .
- Slaoui, M., Bauchet, A.-L., & Fiette, L. (2017). Tissue sampling and processing for histopathology evaluation. In *Drug safety evaluation: Methods and protocols* (pp. 101-114). Springer .
- Soliz, M. C., Ponssa ,M. L., & Abdala, V. (2018). Comparative anatomy and development of pectoral and pelvic girdles in hylid anurans. *Journal of Morphology*, 279(7), 904-924
- Szekely, D., Stănescu, F., Szekely, P., Telea, A. E., & Cogălniceanu, D. (2025). A review of age estimation methods in non-avian reptiles by growth marks in hard tissues. *Integrative Zoology*, 20(1), 15-32 .
- Wells, C. P., Barbier, R., Nelson, S., Kanaziz, R., & Aubry, L. M. (2022). Life history consequences of climate change in hibernating mammals: a review. *Ecography*, 2022(6), e06056 .
- Zhang, Y., Bi, J., Ning, Y., & Feng, J. (2024). Methodology advances in vertebrate age estimation. *Animals*, 14(2), 343 .
- Zhanmu, O., Yang, X., Gong, H., & Li, X. (2020). Paraffin-embedding for large volume bio-tissue. *Scientific reports*, 10(1), 12639 .
- characteristics in the late ontogenesis of the marsh frog, *Pelophylax ridibundus* (Anura, Ranidae), from Territory of Crimea. *Zoodyversity*, 53(4), 325–334 .
- Peso Fernández, M. (2018). Conservation Planning of the Endangered Pyrenean frog by integrating natural history, landscape and population genomics under Global Changes Scenarios .
- Roberts, J. L., Kinter, C. W., & Drissi, H. (2020). Generation and experimental outcomes of closed femoral fracture in mice. In *Osteoporosis and Osteoarthritis* (pp. 205-222). Springer .
- 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), 1-112 .
- Savi, F. M., Brierly, G. I., Baldwin, J., Theodoropoulos, C., & Woodruff, M. A. (2017). Comparison of different decalcification methods using rat mandibles as a model. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 65(12), 705-722 .
- Sinsch, U. (2015). Skeletochronological assessment of demographic life-history traits in