

تبارشناسی و تنوع ژنتیکی لاک پشت برکه‌ای خزری (*Mauremys*)

caspiaca Gmelin, 1774) در استان چهارمحال و بختیاری

بهنام جزایری^۱؛ محمدرضا اشرف‌زاده^{۲*}؛ روح‌اله رحیمی^۱ و ایرج هاشم‌زاده سقرلو^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بوم‌شناسی آبریان دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین دانشگاه شهرکرد

۲- استادیار گروه شیلات و محیط زیست دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین دانشگاه شهرکرد

۳- دانشیار گروه شیلات و محیط زیست دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین دانشگاه شهرکرد

(تاریخ دریافت ۹۷/۱۱/۱۹-تاریخ پذیرش ۹۸/۰۱/۱۸)

چکیده:

لاک‌پشت‌ها از قدیمی‌ترین خزندگان هستند که از حدود ۲۱۵ میلیون سال پیش در زمین حضور داشته‌اند. تاکنون ۳۵۱ گونه لاک‌پشت در جهان گزارش شده است که حدود ۴۰ درصد آنها در فهرست سرخ IUCN به عنوان گونه‌های در تهدید معرفی شده‌اند. لاک‌پشت برکه‌ای خزری (*Mauremys caspiaca*) در شمال و غرب ایران پراکنش به نسبت گسترده‌ای دارد. ادامه حیات این گونه در بسیاری از زیستگاه‌های کشور به واسطه عوامل متعددی از جمله تخریب زیستگاه، آلودگی‌ها و نابسامانی در مدیریت منابع آب به شدت در معرض تهدید است. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی و تبارشناسی لاک‌پشت برکه‌ای خزری در استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، بخشی از توالی ژن سیتوکروم *b* (به طول ۱۰۴۰ جفت باز) در ۱۲ فرد از این استان برای بررسی روابط تبارشناختی و تنوع ژنتیکی استفاده شد. همچنین، ۱۵ توالی لاک‌پشت برکه‌ای خزری و هشت توالی لاک‌پشت برکه‌ای بالکان (*M. rivulata*) از بانک ژن استخراج و در تحلیل‌ها استفاده شدند. یافته‌های حاصل نشان دادند که لاک‌پشت‌های خزری دو کلاذ مجزا (کلاذ شرقی و کلاذ غربی) تشکیل داده و با بوت استرپ و احتمال پسین بالا از لاک‌پشت‌های بالکان جدا می‌شوند. همچنین، نمونه‌های متعلق به این استان همگی در کلاذ شرقی قرار گرفته و فقط به یک هاپلوتایپ (MCE2) اختصاص داشتند. بر اساس تحلیل AMOVA، اختلاف ژنتیکی بین کلاذهای شرقی و غربی (۸۲/۱۲ درصد) بیش از اختلاف ژنتیکی در داخل این کلاذها (۱۷/۸۸ درصد) برآورد شد. نشانه‌های معنی‌داری از گسترش جمعیت‌شناختی ناگهانی در کلاذهای غربی و شرقی لاک‌پشت خزری برآورد نشد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که بر اساس توالی‌های ژن سیتوکروم *b*، لاک‌پشت برکه‌ای خزری در این استان به یک واحد حفاظتی تعلق داشته و می‌تواند برای حفاظت بهتر از گونه در دستور کار مدیران حفاظت از محیط زیست استان قرار گیرد.

کلید واژگان: *Mauremys caspiaca*، سیتوکروم *b*، هاپلوگروپ، فاصله ژنتیکی، تنوع ژنتیکی

۱. مقدمه

پراکنش امروزی گونه‌ها و همچنین ساختار و تنوع ژنتیکی آنها نتیجه عملکرد فرآیندهای زمین‌شناسی و تکاملی بلندمدت بوده است (Ricklefs & Schluter, 1993; Ashrafzadeh & Avise, 2000; et al., 2016). بر این اساس، جمعیت‌های حیات وحش که توزیع جغرافیایی به نسبت پیوسته‌ای دارند ممکن است تنوع ژنتیکی در آنها نمایشگر یک ساختار جغرافیایی باشد (Avise, 2000; Ashrafzadeh et al., 2018). لاک‌پشت‌ها به عنوان قدیمی‌ترین گروه خزندگان زمین شناخته می‌شوند که از دوران دوم زمین‌شناسی یعنی از حدود ۲۰۰ میلیون سال پیش تاکنون با تغییری اندک به زندگی خود ادامه داده‌اند. تاکنون حدود ۳۵۱ گونه لاک‌پشت در جهان گزارش شده است که حدود ۴۰ درصد آنها در فهرست سرخ IUCN به عنوان گونه‌های در تهدید قرار دارند. در ایران ۱۰ گونه از لاک‌پشت‌ها شناسایی شده است که در برگیرنده پنج گونه دریایی و دو گونه خشک‌زی، یک گونه لاک‌پشت لاک‌نرم و دو گونه لاک‌پشت برکه‌ای است (Mozaffari et al., 2016). لاک‌پشت‌ها، اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های حفاظت از اکوسیستم‌های مختلف دارند. لاک‌پشت‌های آبی نقش مهمی در پاک‌سازی اکوسیستم‌های خشکی و آبی ایفا می‌کنند و در پالایش آلودگی آب نقش دارند (Yadollahvand & Kami, 2014). لاک‌پشت‌های برکه‌ای اغلب همه‌چیزخوار هستند و از منابع غذایی مختلف شامل گیاهان، جانوران و لاشه‌ها استفاده می‌کنند. جلبک‌ها، گیاهان آبی، میوه‌ها، کرم‌های خاکی، خرچنگ، میگو، ماهی‌ها، تخم، نوزاد و بالغ قورباغه‌ها و سنجاقک‌ها از جمله منابع غذایی این لاک‌پشت‌ها هستند (Noda & Kamata, 2016).

(Lovich et al., 2011, 2004) و بنابراین لاک‌پشت‌ها نقش مهمی در کنترل جمعیت آن‌ها دارند. لاک‌پشت‌های برکه‌ای اوراسیا پراکنش عمده‌ای در آسیای شرقی دارند. فقط سه گونه از جنس *Mauremys* در پالنارکتیک غربی پراکنش دارد (Barth et al., 2004). لاک‌پشت برکه‌ای خزری (*M. caspica*) از لاک‌پشت‌های ساکن آب شیرین و با اندازه متوسط است که پراکنش به نسبت گسترده‌ای در خاورمیانه، از جمله ایران دارد (Vamberger et al., 2013). حضور این گونه در سطح جهانی، در ارمنستان، روسیه، ترکیه، ترکمنستان، آذربایجان، بحرین، گرجستان، ایران و عراق گزارش شده است (Van Dijk et al., 2014). بر اساس Fritz و Wischuf (۱۹۹۷)، سه زیر گونه از این لاک‌پشت در سراسر گستره جهانی آن شناسایی شده است که به نظر می‌رسد هر سه زیر گونه در ایران حضور دارند. زیرگونه *M. c. caspica* توزیع گسترده‌ای در گلستان، مازندران، گیلان، اردبیل، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی دارد. زیرگونه دوم (*M. c. siebenrocki*) در بوشهر، فارس، خوزستان، چهارمحال و بختیاری، لرستان، ایلام، کرمانشاه و کردستان پراکنش دارد. زیرگونه *M. c. ventrimaculata* در استان‌های اصفهان و فارس گزارش شده است (Fritz & Wischuf 1997; Rastegar-Pouyani et al., 2008; Fritz et al., 2008; Safaei-Mahroo et al., 2015). پژوهش‌های ژنتیکی با استفاده از توالی سیتوکروم *b* تایید نمودند که جمعیت‌های هر سه زیرگونه یاد شده در دو کلاذ شرقی و غربی قرار می‌گیرند (Fritz et al., 2008; Vamberger et al., 2013). در ضمن، پراکنش این دو کلاذ توافق چندانی با توزیع

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. معرفی منطقه مورد مطالعه و نمونه‌برداری

مناطق نمونه‌برداری در استان چهارمحال و بختیاری شامل تالاب‌های چغاخور و گندمان، زاغ چشمه در نزدیکی روستای دهنو (از سرچشمه های رودخانه کیار)، آب‌بند دستگرد امام‌زاده (در نزدیکی روستای ایرانچه)، رودخانه کیار، آبگیرهای اطراف چلیچه، شهرستان فارسان و زیستگاه‌های پیرامون رودخانه کارون میانی است (شکل ۱). بررسی‌های صحرایی و نمونه‌برداری از لاکپشت‌ها با مجوز سازمان حفاظت محیط زیست (به شماره ۹۶/۸۵۵/ت) انجام شد. در این پژوهش، از تعداد ۱۲ فرد نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها از یک میلی‌متر بخش انتهایی نوک دم برداشت شدند. تمامی لاکپشت‌ها مدتی پس از نمونه‌برداری در همان محل اولیه رهاسازی شدند. نمونه‌های بافت تا زمان استخراج دی‌ان‌ای در الکل اتانول ۹۶٪ و در یخچال نگهداری شدند.

۲-۲. استخراج دی‌ان‌ای و توالی‌یابی

استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از کیت مخصوص بافت ساخت شرکت کیاژن و با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در هنگام استخراج دی‌ان‌ای یک میکروتیوب به عنوان نمونه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. از دی‌ان‌ای با غلظت ۲۰ تا ۸۰ نانوگرم به منظور تکثیر توالی‌ها استفاده شد. فرآیند PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از مسترمیکس‌های با غلظت ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ساخت شرکت امپلیکن دانمارک انجام شد. یک قطعه ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی و با تغییر جزئی در برخی جایگاه‌ها تکثیر شد:

جغرافیایی زیرگونه‌های یاد شده ندارد (Fritz *et al.*, 2008). بر اساس پژوهش‌ها، لاکپشت برکه‌ای بالکان (*M. rivulata*) به عنوان گونه خواهری لاکپشت خزری معرفی شده است (Vamberger *et al.*, 2013). در حال حاضر، با توجه به تجزیه و تخریب گسترده زیستگاه‌ها به‌ویژه رودخانه‌ها و تالاب‌ها، آلودگی‌های محیط زیستی، صید غیرقانونی و معرفی گونه‌های بیگانه بخش عمده‌ای از گستره تاریخی لاکپشت برکه‌ای خزری از بین رفته است (Yadollahvand & Vamberger *et al.*, 2013) و بسیاری از جمعیت‌های آن در خطر انقراض قرار دارند. به طور کلی، توسعه و گستردگی فعالیت‌های انسانی در ایران (به عنوان کشوری در حال توسعه) می‌تواند پیامدهای جبران‌ناپذیری بر جمعیت‌های خزندگان از جمله لاکپشت برکه‌ای داشته باشد. در حال حاضر، دانش چندانی درباره تنوع ژنتیکی و ارتباط تبارشناختی جمعیت‌های لاکپشت برکه‌ای خزری ساکن استان چهارمحال و بختیاری با سایر جمعیت‌های لاکپشت برکه‌ای وجود ندارد. از سوی دیگر، دستیابی به تصویری جامع از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی در ساختارهای جغرافیایی به‌عنوان یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر در راستای مدیریت و حفاظت از حیات وحش شناخته می‌شود (Avisé, 1994).

بنابراین، نمونه‌برداری و اجرای بررسی‌های علمی در این زمینه جهت معرفی واحدهای حفاظتی بر اساس مفهوم واحدهای تکاملی معنادار ضروری به‌نظر می‌رسد. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی و تبارشناسی لاکپشت برکه‌ای خزری در استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی قرار گرفت.

با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۶۰ دقیقه، بررسی شد. محصول PCR، پیش از توالی‌یابی، با استفاده از کیت ساخت شرکت ترمو و با استفاده از دستورالعمل‌های ویژه شرکت سازنده خالص‌سازی شد. محصول به دست آمده با استفاده از آغازگرهای زیر و با تغییر جزئی در برخی جایگاه‌ها توالی‌یابی شد:

Mt-cFor2:5'-TGAGGCCAAATATCATTCTGAG-3' (Fritz *et al.*, 2006)

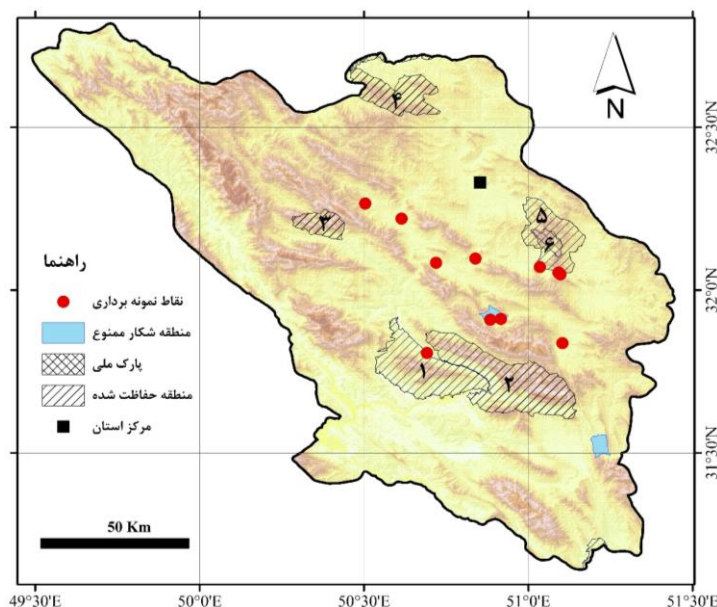
RI-neu:5'-GTGAAGTTGTCTGGGTCTCCTAG-3' (Vamberger *et al.*, 2013)

تمامی نمونه‌ها با استفاده از ABI3730xl و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی به صورت دو سویه خوانش شدند.

CytbG:5'-AACCATCGTTGTATTCAACTAC-3' (Spinks *et al.*, 2004)

Mt-fna:5'-AGGGTGGAGTCTTCAGTTTTTGGTTTACAAGACCAATG-3' (Fritz *et al.*, 2006)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در ۳۵ چرخه با واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد در پنج دقیقه، واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد. کیفیت محصول به دست آمده و تأیید تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در الکتروفورز افقی،



شکل ۱- موقعیت مکان‌های نمونه‌برداری (دایره‌های رنگی) در استان چهارمحال و بختیاری. شماره‌های ۱ تا ۶ به ترتیب مناطق حفاظت شده هلن، سبزکوه، قیصری، شیدا و تنگ صیاد و پارک ملی تنگ صیاد را نشان می‌دهند.

در ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) نرم‌افزار Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) استفاده شد. تعداد ۲۳ توالی متعلق به لاک‌پشت برکهای خزری (۱۵ توالی) و لاک‌پشت برکهای بالکان (*M. rivulata*) (هشت توالی) از بانک ژن استخراج شد. در مجموع، تعداد ۳۵ توالی (۱۲ توالی جدید در

۲-۳. ویرایش و تحلیل‌های اولیه داده‌ها

تعداد ۲۴ توالی رفت و برگشت مربوط به ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم b میتوکندریایی و متعلق به تعداد ۱۲ لاک‌پشت برکهای خزری به دست آمد. از نرم‌افزار Seqscape 3.0 برای ویرایش توالی‌ها استفاده شد. به منظور ردیف‌یابی توالی‌ها از شیوه

ترسیم جایگزینی‌های هم‌جنس و غیرهم‌جنس در برابر فواصل کیمورا استفاده شد. نرم افزار PartitionFinder 2.1.1 به منظور پارتیشن‌بندی و انتخاب مناسب‌ترین مدل‌های جایگزینی نوکلئوتیدی به کار رفت. انتخاب بهترین مدل‌های جایگزینی نوکلئوتیدی با کمک معیار اطلاعاتی بیزین (BIC) برای استنتاج بیزین و معیار آکایکه تصحیح شده برای احتمال بیشینه انجام شد. مدل‌های HKY+I+G و HKY+G به عنوان بهترین مدل جایگزینی برای کدون‌های مختلف با هر دو معیار بیزین و آکایکه تصحیح شده شناسایی شدند.

پژوهش حاضر و ۲۳ توالی استخراج شده از بانک ژن در تحلیل‌های تبارشناختی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). موقعیت کدون‌ها و کدون‌های توقف احتمالی در توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Mega 6 بررسی شد. توالی‌های متعلق به دو گونه لاک پشت *M. leprosa* (NC_031432 و KP100055) و *M. nigricans* (NC_029369 و KT951839) به عنوان برون‌گروه استفاده شدند. از نرم‌افزار DAMBE 5 (Xia, 2013) به منظور آزمون اشباع جایگزینی (Xia et al., 2003) دسته داده، قبل از اجرای تحلیل‌های تبارشناختی، استفاده شد. همچنین، برای بررسی اشباع احتمالی در سطوح واگرایی بالاتر از

جدول ۱- فهرست توالی‌های استخراج شده از بانک ژن

ردیف	شماره دسترسی	نام علمی	نام کلاد	موقعیت	منبع
۱	HE800435	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	ایران، گلستان	Vamberger et al., 2013
۲	HE800434	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	بحرین	Vamberger et al., 2013
۳	HE800433	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	بحرین	Vamberger et al., 2013
۴	AM905568	<i>M. caspica</i>	کلاد غربی	ایران، آذربایجان غربی	Fritz et al., 2008
۵	AM905567	<i>M. caspica</i>	کلاد غربی	ترکیه	Fritz et al., 2008
۶	AM905566	<i>M. caspica</i>	کلاد غربی	ترکیه	Fritz et al., 2008
۷	AM905565	<i>M. caspica</i>	کلاد غربی	ترکیه	Fritz et al., 2008
۸	AM905563	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	سوریه	Fritz et al., 2008
۹	AM905562	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	ایران، فارس	Fritz et al., 2008
۱۰	AM905561	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	ایران، خوزستان	Fritz et al., 2008
۱۱	AM905559	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	بحرین	Fritz et al., 2008
۱۲	AJ564454	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	بحرین	Barth et al., 2004
۱۳	AM110186	<i>M. caspica</i>	کلاد شرقی	ایران، کرمانشاه	Fritz et al., 2006
۱۴	AY434594	<i>M. caspica</i>	کلاد غربی	نامشخص	Spinks et al., 2004
۱۵	AJ564453	<i>M. caspica</i>	کلاد غربی	ترکیه	Barth et al., 2004
۱۶	AM905576	<i>M. rivulata</i>		یونان	Fritz et al., 2008
۱۷	AM905575	<i>M. rivulata</i>		ترکیه	Fritz et al., 2008
۱۸	AM905574	<i>M. rivulata</i>		ترکیه	Fritz et al., 2008
۱۹	AM905573	<i>M. rivulata</i>		ترکیه	Fritz et al., 2008
۲۰	AM905572	<i>M. rivulata</i>		یونان	Fritz et al., 2008
۲۱	AM905571	<i>M. rivulata</i>		کروواسی، ترکیه	Fritz et al., 2008
۲۲	AM905570	<i>M. rivulata</i>		بلغارستان، کروواسی، ترکیه	Fritz et al., 2008
۲۳	AM905569	<i>M. rivulata</i>		یونان، اردن، ترکیه	Fritz et al., 2008

۲-۴. تحلیل‌های تبارشناختی

درخت‌های تبارشناختی با استفاده از الگوریتم‌های احتمال بیشینه (ML) و استنتاج بیزین (BI) برآورد شدند. به منظور تحلیل بیزین، نرم‌افزار MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)، بر اساس چرخه زنجیره مارکوف (MCMC) با چهار اجرای هم‌زمان و تعداد ۲۰ میلیون تکرار اجرا شد. نمونه‌برداری‌ها در هر ۱۰۰ تکرار انجام و ۲۰ درصد درخت‌های به دست آمده به عنوان Burn-in کنار گذاشته شدند. بهترین درخت با استفاده از قانون اکثریت برآورد شد. تحلیل‌های احتمال بیشینه با استفاده از IQTree 1.6 (Nguyen *et al.*, 2014)، با ۱۰۰۰۰ هزار تکرار انجام شد. شبکه هاپلوتایپی، بر اساس تحلیل اتصال میانه (Bandelt *et al.*, 1999) و با استفاده از نرم‌افزار PopART 1.7 (http://popart.otago.ac.nz) برآورد شد. علاوه بر این، تحلیل شبکه بیشینه پارسیمونی (در سطح ۰/۹۵) با استفاده از TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) به منظور استنتاج روابط تبارشناختی بین هاپلوتایپ‌های شناسایی شده به کار گرفته شد.

۲-۵. آماره‌های ژنتیکی و تاریخچه جمعیت

شناختی

تعداد هاپلوتایپ‌ها، تنوع هاپلوتایپی، تنوع نوکلئوتیدی و جایگاه‌های چندریختی با کمک نرم‌افزار DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009) محاسبه شد. برای دستیابی به برآوردی از شواهد احتمالی گسترش ناگهانی جمعیت در گذشته (Ramírez-Soriano *et al.*, 2008) از آزمون‌های Fu's FS و Tajima's D در نرم‌افزار Arlequin 3.5 استفاده شد. معنی‌داری آزمون‌های ذکر شده با ۱۰۰۰۰

شبیه‌سازی محاسبه شد. آماره R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) و F_{st} (Weir & Cockerham, 1984) و F_{st} (Excoffier & Lischer, 2010) برای بررسی تاریخچه جمعیت به کار گرفته شد. آماره R_2 بر اساس اختلاف‌های بین تعداد جهش‌های منفرد و میانگین تعداد اختلاف‌های نوکلئوتیدی در داخل یک جمعیت برآورد می‌شود (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). به منظور برآورد R_2 از نرم‌افزار DnaSP 5.10 استفاده شد. در آزمون‌های خنثی‌سازی فرض بر این است که جمعیت مورد بررسی در یک زمان طولانی تکاملی در تعادل جهش-رانس بوده است (Nei & Kumar, 2000). در زمانی که جمعیت فرض شده به دلیل گسترش ناگهانی در تعادل جهش-رانس نباشد، این آماره‌ها گرایش به ارزش‌های منفی معنی‌دار دارند (Ojeda, 2010; Kusza *et al.*, 2018; Ashrafzadeh *et al.*, 2018).

سطوح ساختار جمعیتی با استفاده از تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) و نمایه F_{st} (Weir & Cockerham, 1984) در نرم‌افزار Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) با ۱۰۰۰۰ تکرار برآورد شد. فاصله ژنتیکی (F_{st}) و جریان ژنی (Nm) بین کلادهای مختلف لاک‌پشت برک‌های با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 3.5، با ۱۰۰۰۰ تکرار، محاسبه شدند.

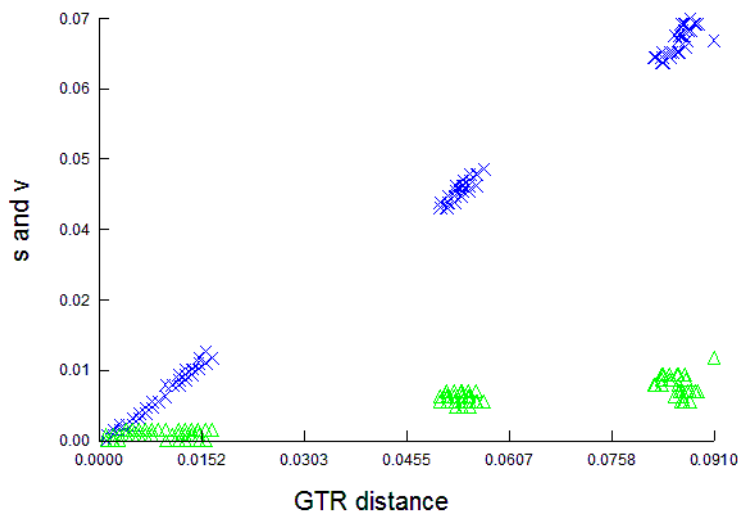
۳. نتایج

۳-۱. تحلیل‌های تبارشناختی

بر اساس تحلیل‌ها، دسته داده مورد بررسی دارای کمترین اشباع جایگزینی هستند (شکل ۲). ارزش نمایه اشباع جایگزینی (ISS) به طور معنی‌دار از ارزش نمایه بحرانی اشباع جایگزینی (ISSC) کمتر

M. rivulata با بالاترین بوتاسترپ و احتمال پسین از یکدیگر جدا شدند (شکل ۳). لاکپشت‌های برکهای خزری با احتمال پسین و ارزش‌های بوتاسترپ بالا به دو کلاذ شرقی و کلاذ غربی تفکیک شدند. بر این اساس، لاکپشت‌های برکهای خزری نمونه‌برداری شده از استان چهارمحال و بختیاری در کلاذ شرقی قرار گرفتند.

بود ($p < 0.01$). بنابراین، داده‌های به دست آمده برای اجرای تحلیل‌های تبارشناختی مناسب بودند. به منظور افزایش اطمینان از یافته‌های به دست آمده، تحلیل‌های تبارشناختی با استفاده از شیوه‌های مختلف انجام شد. در قطعه توالی مورد بررسی، بر اساس درخت‌های احتمال بیشینه و بیزین به طور مشابه گونه‌های لاکپشت برکهای *M. caspica* و



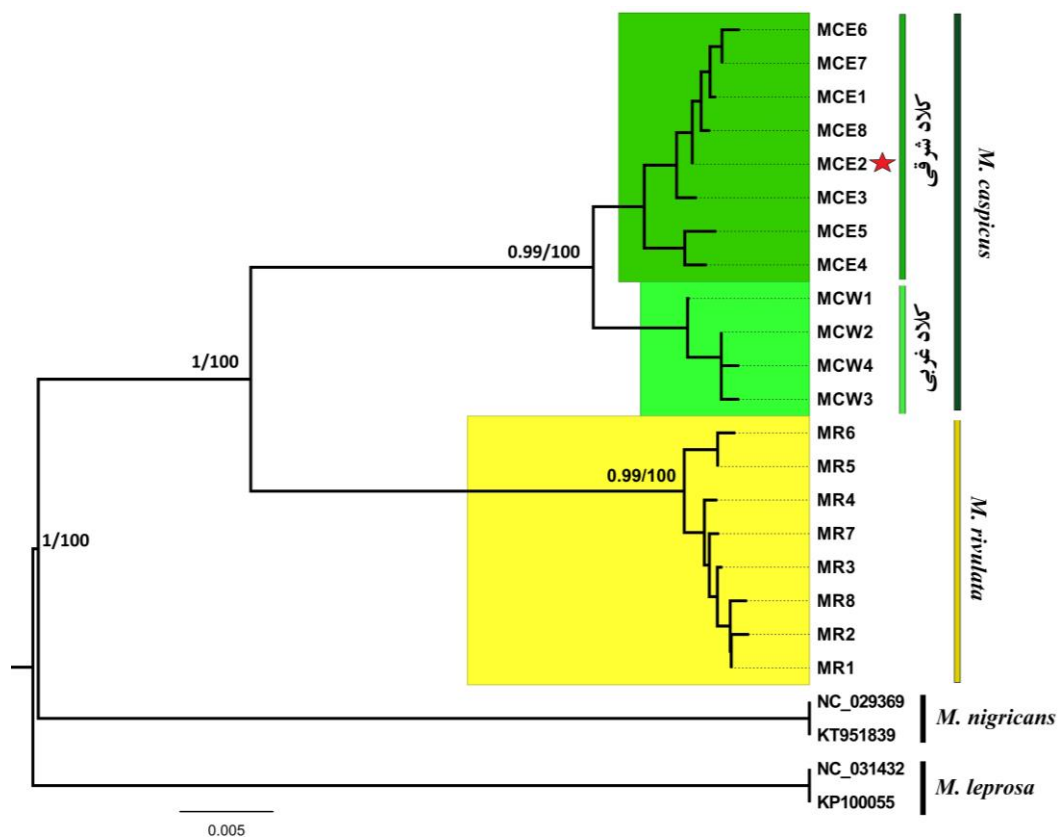
شکل ۲- جایگزینی‌های هم‌جنس و غیرهم‌جنس در برابر فاصله کیمورا برای توالی ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم b.

لاکپشت‌های برکهای خزری ساکن در زیستگاه‌های ایران در کلاذ شرقی قرار می‌گیرند. به هر حال، بر اساس تحلیل توالی‌های استخراج شده از بانک ژن، جمعیت‌هایی از کلاذ غربی در غرب ایران حضور دارند. اغلب توالی‌های متعلق به بخش غربی گستره پراکنش لاکپشت برکهای خزری از جمله ترکیه و سوریه به کلاذ غربی اختصاص دارند.

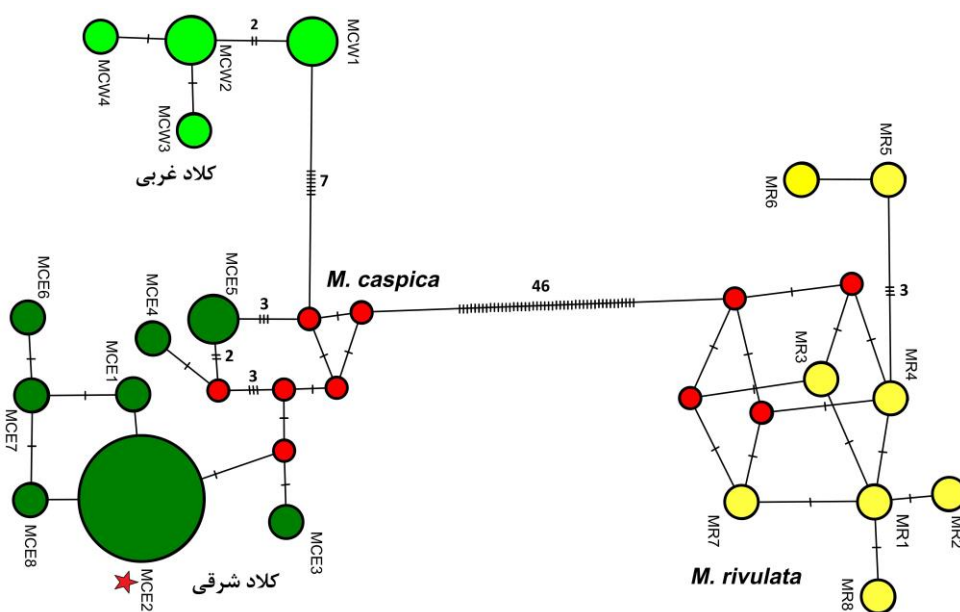
بر اساس تحلیل پارسیمونی (در سطح ۹۵ درصد) هاپلوتایپ‌های متعلق به لاکپشت برکهای *M. rivulata* و *caspica* در هاپلوگروپ‌های کاملاً مجزا از یکدیگر قرار گرفتند (شکل ۵). موقعیت کلاذهای شرقی و غربی متعلق به لاکپشت برکهای خزری نیز به راحتی قابل تایید است.

۳-۲. شبکه هاپلوتایپی و تحلیل پارسیمونی

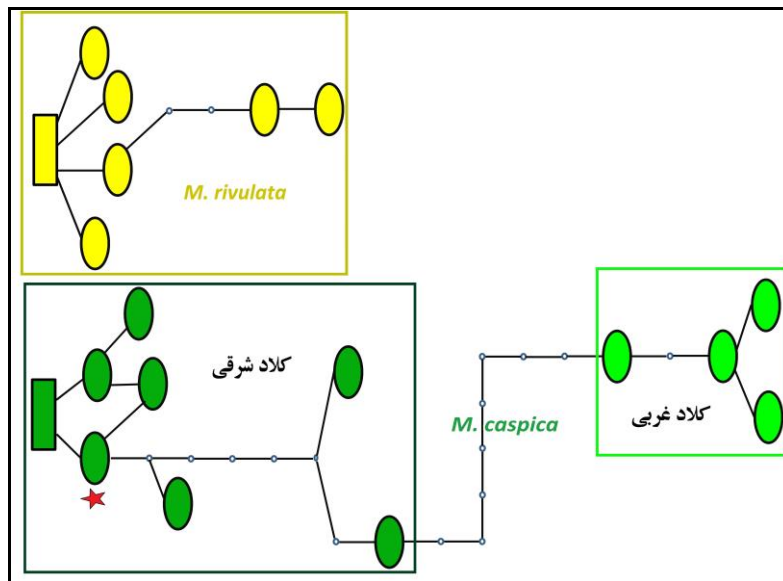
تحلیل شبکه هاپلوتایپی شکل ۴ نیز یافته‌های حاصل از درخت‌های تبارشناختی را تایید کرد. تعداد ۲۰ هاپلوتایپ در بین ۳۵ توالی شناسایی شد: هشت هاپلوتایپ در کلاذ شرقی، چهار هاپلوتایپ در کلاذ غربی و هشت هاپلوتایپ در *M. rivulata* قرار گرفتند. تمامی نمونه‌های لاکپشت برکهای خزری استان چهارمحال و بختیاری کمترین تنوع هاپلوتایپی را نمایش داده، به یک هاپلوتایپ (MCE2) اختصاص داشتند و در کلاذ شرقی قرار گرفتند. بر اساس تحلیل‌ها، لاکپشت برکهای خزری در گستره جهانی در دو کلاذ شرقی و غربی قرار می‌گیرد. اغلب



شکل ۳- روابط تبارشناختی لاک پشت برکه‌ای خزری استان چهارمحال و بختیاری با سایر جمعیت‌های لاک پشت برکه‌ای خزری و بالکانی (*M. rivulata*)، بر اساس توالی‌های ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* توالی‌های متعلق به گونه‌های *M. leprosa* و *M. nigricans* به‌عنوان برون‌گروه استفاده شدند. اعداد روی شاخه‌ها از چپ به راست مقدار احتمال پسین برای استنتاج بیزین و بوت استرپ برای احتمال بیشینه را نشان می‌دهند. ستاره قرمز هاپلوتایپ شناسایی شده در منطقه مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



شکل ۴- شبکه هاپلوتایپی لاک پشت‌های برکه‌ای (*M. rivulata* و *M. caspica*) با استفاده از روش اتصال میانه، بر اساس توالی‌های ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم *b*. ستاره قرمز، هاپلوتایپ شناسایی شده در استان چهارمحال و بختیاری را نشان می‌دهد.



شکل ۵- شبکه پارسیمونی هاپلوتایپ‌های لاکپشت برکه‌ای، بر اساس ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* هر خط اتصال‌دهنده بین هاپلوتایپ‌ها نشان‌دهنده یک جهش و هر دایره کوچک نشانگر یک هاپلوتایپ شناسایی نشده یا از دست رفته است. رنگ سبز، هاپلوتایپ‌های لاکپشت برکه‌ای خزری (*M. caspica*) و رنگ زرد، هاپلوتایپ‌های لاکپشت برکه‌ای بالکان (*M. rivulata*) را نشان می‌دهد. همچنین، ستاره قرمز هاپلوتایپ شناسایی شده در استان چهارمحال و بختیاری را نشان می‌دهد.

چهار هاپلوتایپ شناسایی شد. در بین توالی‌های متعلق به استان چهارمحال و بختیاری تنها یک هاپلوتایپ توصیف شد. در بین هشت توالی متعلق به *M. rivulata* تعداد هشت هاپلوتایپ شناسایی شد. شاخص‌های مختلف برای بررسی تاریخچه جمعیت‌شناختی استفاده شدند. بر اساس یافته‌ها، نشانه‌های معنی‌داری از گسترش جمعیت‌شناختی در کلادهای غربی و شرقی لاکپشت برکه‌ای خزری مشاهده نمی‌شود. اما، نشانه‌های مشخصی از یک گسترش جمعیت شناختی ناگهانی در لاکپشت برکه‌ای بالکان مشاهده می‌شود (جدول ۳).

۳-۵. فاصله ژنتیکی

فاصله ژنتیکی (Fst) معنی‌داری بین گروه‌ها وجود دارد ($p < 0.01$). آزمون‌های Fst و Nm احتمال وجود اختلاف‌های معنی‌دار را بین کلادهای لاکپشت برکه‌ای خزری و همچنین *M. rivulata* تأیید می‌کند (جدول ۴).

۳-۳. تحلیل واریانس مولکولی

در تحلیل AMOVA، بر اساس ۱۰۴۰ جفت باز از توالی ژن سیتوکروم *b*، اختلاف ژنتیکی در بین کلادهای شرقی و غربی (۸۲/۱۲ درصد) بیش از اختلاف ژنتیکی در داخل کلادها (۱۷/۸۸ درصد) برآورد شد. همچنین، نمایه F_{st} وجود یک ساختار ژنتیکی معنی‌دار را در بین کلادهای شناسایی شده لاکپشت برکه‌ای خزری تأیید نمود (جدول ۲).

۳-۴. آماره‌های ژنتیکی و تاریخچه جمعیت-شناختی

جدول ۳ آماره‌های ژنتیکی مربوط به قطعه ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* را بر اساس یک دسته داده شامل ۱۲ توالی از استان و ۲۳ توالی استخراج شده از بانک ژن ارائه می‌دهد. تعداد ۱۲ جایگاه متغیر و هشت هاپلوتایپ در بین ۲۱ توالی متعلق به کلاد شرقی (شامل ۱۲ توالی جدید و نه توالی بانک ژن) شناسایی شد. در بین شش توالی متعلق به کلاد غربی

جدول ۲- تحلیل واریانس مولکولی بین کلادهای لاک پشت برکه‌ای خزری (۱۵ توالی استخراج شده از بانک ژن و ۱۲ توالی جدید) بر

اساس ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم *b*

<i>p</i> -value	<i>Fst</i>	درصد تغییرات	درجه آزادی	منبع تغییرات
۰/۰۰۰۱	۰/۸۲۱	۸۲/۱۲	۱	بین کلادها
		۱۷/۸۸	۲۵	درون کلادها
			۲۶	کل

جدول ۳- آمار ژنتیکی برای لاک پشت برکه‌ای خزری بر اساس ۱۰۴۰ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* n: تعداد افراد؛ h: تعداد هاپلوتاایپ؛

Hd: تنوع هاپلوتاایپی؛ SD: انحراف معیار؛ Pi: تنوع نوکلئوتیدی به ازای هر جایگاه؛ K: متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی؛ P: تعداد

جایگاه‌های متغیر؛ انحراف معنی دار: **p*<0.05، انحراف بسیار معنی دار: ***p*<0.01.

گروه	<i>h</i>	<i>n</i>	<i>Hd</i> (SD)	<i>Pi</i> (SD)	<i>K</i>	<i>P</i>	Fu's <i>FS</i>	Tajima's D	Ramos-Onsins & Rozas' <i>R</i> ₂
کلاد شرقی	۸	۲۱*	(۰/۱۲۱) ۰/۶۲۴	(۰/۰۰۰۷) ۰/۰۰۰۲۴	۲/۵۱۴	۱۲	-۱/۲۹۶	-۰/۸۷۲	۰/۰۹۷۳
کلاد غربی	۴	۶	(۰/۱۲۹) ۰/۸۷۲	(۰/۰۰۰۳) ۰/۰۰۰۱۶	۱/۷۳۳	۴	-۰/۷۶۱	-۰/۰۵۷	۰/۱۷۸۰
لاک پشت بالکان	۸	۸	(۰/۰۶۳) ۱	(۰/۰۰۰۶) ۰/۰۰۰۲۹	۳/۰۷۱	۹	-۵/۵۳۱**	-۰/۵۶۴	۰/۱۱۴۶**

* منظور از ۲۱ توالی در کلاد شرقی، ۹ توالی بانک ژن و ۱۲ توالی جدید از استان چهارمحال و بختیاری است.

جدول ۴- اختلاف ژنتیکی بین کلادهای لاک پشت برکه‌ای خزری بر اساس ۱۰۴۰ جفت باز از سیتوکروم *b*: پایین، فاصله ژنتیکی (*Fst*) و

بالا، جریان ژنی (*Nm*)

<i>Nm</i> / <i>Fst</i>	کلاد شرقی	کلاد غربی	<i>M. rivulata</i>
کلاد شرقی		۰/۱۰۹	۰/۰۲۷
کلاد غربی	۰/۸۲۱		۰/۰۲۵
لاک پشت بالکان	۰/۹۴۸	۰/۹۵۳	

۴. بحث و نتیجه گیری

بررسی روابط تبارشناختی، تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها از مهم‌ترین اولویت‌ها به منظور تعیین وضعیت حفاظتی جمعیت‌ها و شناسایی واحدهای حفاظتی است (Lacy, 1997). لاک پشت برکه‌ای خزری از نظر جغرافیای زیستی جانوری، یک گونه مدیترانه‌ای به شمار می‌رود (Fritz & Wischuf,)

(1997). این گونه، توزیع به نسبت گسترده‌ای از شمال تا غرب و جنوب غربی ایران دارد (Fritz *et al.*, 2008). عوامل متعددی از جمله تخریب زیستگاه، آلودگی‌های محیط زیست، مدیریت نامناسب منابع آب و برداشت غیرقانونی از جمعیت از مهمترین عوامل تهدید کننده جمعیت‌های این لاک پشت به شمار می‌روند (Rogner, 2009؛ Yadollahvand & Vamberger *et al.*, 2013)

(Kami, 2014). در این میان، خشک شدن دریاچه‌ها و رودخانه‌ها در مناطق مختلف کشور پیامدهای قابل توجهی بر جمعیت‌های این گونه داشته است و حتی انقراض محلی برخی از جمعیت‌ها را در پی داشته است (Vamberger et al., 2013; Yadollahvand & Kami, 2014). با این وجود، پژوهش‌های بسیار اندکی در گستره حضور این لاکپشت برکهای خزری در ایران به انجام رسیده است. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی و تبارشناسی لاکپشت‌های برکهای خزری استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از توالی ژن سیتوکروم b مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌های حاصل، بر پایه درخت‌های با توپولوژی یکسان بر اساس شیوه‌های مختلف (احتمال بیشینه و بی‌زین)، نشان دادند که لاکپشت‌های برکهای *M. caspica* و *M. rivulata* با بالاترین بوت استرپ و احتمال پسین از یکدیگر مجزا شدند. لاکپشت‌های برکهای خزری در دو کلاذ مجزا (کلاذ شرقی و کلاذ غربی) قرار گرفتند. تمامی لاکپشت‌های نمونه‌برداری شده از استان چهارمحال و بختیاری به کلاذ شرقی اختصاص یافتند. تحلیل شبکه هاپلوتایپی نیز تمامی توالی‌های مورد بررسی (۳۵ توالی و ۲۰ هاپلوتایپ) را در دو هاپلوگروپ تفکیک نمود. تمامی توالی‌های لاکپشت برکهای خزری این استان در یک هاپلوتایپ (MCE2) قرار گرفتند. یافته‌ها، تنوع ژنتیکی پایین را در بین لاکپشت‌های برکهای نمونه‌برداری شده نشان دادند. علاوه بر این، بر اساس یافته‌های تحلیل پارسیمونی هاپلوتایپ‌های متعلق به لاکپشت‌های برکهای *M. caspica* و *M. rivulata* در هاپلوگروپ‌های کاملاً مجزا از یکدیگر قرار گرفته و نمونه‌های استان چهارمحال و بختیاری به هاپلوگروپ شرقی لاکپشت خزری اختصاص یافتند.

بر اساس تحلیل AMOVA، اختلاف ژنتیکی در بین کلاذهای شرقی و غربی (۸۲/۱۲ درصد) به طور معنی‌دار بیشتر از اختلاف ژنتیکی در داخل کلاذها (۱۷/۸۸ درصد) محاسبه شد. نمایه فاصله ژنتیکی (*Fst*) وجود یک ساختار ژنتیکی معنی‌دار را در بین کلاذهای شناسایی شده تأیید نمود. بر اساس شاخص‌های مرتبط با برآورد تاریخچه جمعیت‌شناختی، نشانه‌های مشخصی از یک گسترش جمعیت‌شناختی اخیر در لاکپشت برکهای بالکان برآورد شد. با این وجود، نشانه‌های معنی‌داری از گسترش جمعیت‌شناختی ناگهانی در کلاذهای غربی و شرقی لاکپشت خزری به دست نیامد. آزمون‌های *Fst* و *Nm* احتمال وجود اختلاف‌های معنی‌دار را بین کلاذهای لاکپشت برکهای خزری و همچنین لاک-پشت برکهای بالکان تأیید نمودند. Fritz و Wischuf (۱۹۹۷) سه زیرگونه برای *M. caspica* شامل یک زیرگونه شمالی (*M. c. caspica*) و دو زیرگونه جنوبی (*M. c. siebenrocki* و *M. c. ventrimaculata*)، شناسایی کردند که در رنگ آمیزی و الگوهای ریختی متفاوت بودند. بر این اساس، لاکپشت‌های برکهای خزری ساکن استان چهارمحال و بختیاری به عنوان زیرگونه *M. c. siebenrocki* توصیف شده‌اند (Yazarloo et al., 2017). به طور کلی، دو زیرگونه جنوبی به طور متمایزی کم‌رنگ‌تر از *M. c. caspica* شمالی هستند. Fritz و همکاران (۲۰۰۸) بر اساس تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی با استفاده از ژن سیتوکروم b، درخت‌های مونوفیلیتیک را برای *M. caspica* و *M. rivulata* برآورد نمودند. Fritz و همکاران (۲۰۰۸) دو کلاذ میتوکندریایی را در *M. caspica* شناسایی نمودند، که یکی در غرب و دیگری در شرق

می‌رسد کلاذ غربی پراکنش محدودی در غرب ایران دارد. علاوه بر این، همانند سراسر گستره جهانی حضور گونه، تنوع هاپلوتایپی به نسبت اندکی در ایران قابل مشاهده است. با این وجود، در یک محدوده به نسبت نزدیک در استان کرمانشاه حضور دو هاپلوتایپ از دو کلاذ شرقی (Cmt3) و غربی (Cmt8) گزارش شده است (Fritz *et al.*, 2008). یافته‌های این پژوهش، بر اساس توالی‌های ژن سیتوکروم *b*، پیشنهاد می‌کند که لاک‌پشت‌های برکه‌ای خزری در استان چهارمحال و بختیاری به یک واحد حفاظتی تعلق داشته و می‌تواند برای حفاظت بهتر از گونه در دستور کار مدیران حفاظت از محیط زیست قرار گیرد. با توجه به اهمیت حفاظت و مدیریت جمعیت‌های لاک‌پشت خزری و به منظور دستیابی به اطلاعات کامل‌تر در زمینه تنوع ژنتیکی، تبارشناسی، ساختار جمعیت و ساختارهای فیلوژئوگرافی پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های ژنتیکی آتی در استان و سایر مناطق کشور علاوه بر ژنوم میتوکندریایی از داده‌های ژنوم هسته‌ای نیز استفاده شود.

و جنوب پراکنش داشت. با این وجود، پراکنش این دو کلاذ با پراکنش هر یک از سه زیرگونه ذکر شده مطابقت نداشت. کلاذ جنوبی و شرقی از دو جمعیت *M. c. ventrimaculata* و *M. c. siebenrocki* همچنین جمعیت‌های تیره رنگ *M. c. caspica* از آناتولی و نواحی شرقی مجاور تشکیل شده است. Fritz و همکاران (۲۰۰۸) تعداد ۱۰ هاپلوتایپ را در میان نمونه‌های متعلق به لاک‌پشت برکه‌ای خزری از گستره جهانی حضور آن گزارش کردند. تعداد پنج نمونه هیبرید بین *caspica* × *rivulata* مشاهده شده است که در یک هاپلوتایپ (Cmt9) ثبت شده است. به استثنای این موارد هیچ هاپلوتایپ مشابه دیگری بین دو گونه یاد شده گزارش نشده است. بر اساس Fritz و همکاران (۲۰۰۸)، اغلب هاپلوتایپ‌های یافت شده به صورت دگرجا (Allopatric) و پیراجا (Parapatric) حضور دارند. به عبارت دیگر، تنها در چند منطقه محدود می‌توان بیش از یک هاپلوتایپ مشاهده نمود. بر اساس تحلیل‌های پیشین (Fritz *et al.*, 2008)؛ Vamberger *et al.*, 2013) کلاذ شرقی به طور گسترده در ایران پراکنش دارد، در حالی که به نظر

References

Ashrafzadeh, M.R., Kaboli, M., Naghavi, M.R., 2016. Mitochondrial DNA analysis of Iranian brown bears (*Ursus arctos*) reveals new phylogeographic lineage. *Mammalian Biology*, 81, 1–9.

Ashrafzadeh, M.R., Djan, M., Szendrei, L., Paulauskas, A., Scandura, M., Bagi, Z., Ilie, D.E., Kerdikoshvili, N., Marek, P., Soós, N., Kusza, S., 2018. Large-scale mitochondrial DNA analysis reveals new light on the phylogeography of Central and Eastern-European Brown hare (*Lepus*

europaeus Pallas, 1778). *PloS ONE*, 13, p.e0204653.

Avice, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, MA, USA.

Avice, J.C., 1994. *Molecular markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hill, New York.

Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific

- phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Barth, D., Bernhard, D., Fritzsich, G., Fritz, U., 2004. The freshwater turtle genus *Mauremys* (Testudines, Geoemydidae) – a textbook example of an east–west disjunction or a taxonomic misconception? *Zoologica Scripta*, 33, 213–221.
- Clement, M., Posada, D.C.K.A., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 657–1659.
- Excoffier, L., Lischer, H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Fritz, U., Wischuf, T., 1997. Zur Systematik westasiatischer „dosteuropanischer“ Bachschildkröten (Gattung *Mauremys*). *Zoologische Abhandlungen*, 49, 223–260.
- Fritz, U., Auer, M., Bertolero, A., Cheylan, M., Fattizzo, T., Hundsdörfer, A.K., Martín Sampayo, M., Pretus, J.L., Široký, P., Wink, M., 2006. A rangewide phylogeography of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia: Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. *Zoologica Scripta*, 35, 531–543.
- Fritz, U., Ayaz, D., Buschbom, J., Kami, H.G., Mazanaeva, L.F., Aloufi, A.A., Auer, M., Rifai, L., Šilić, T., Hundsdörfer, A.K., 2008. Go east: phylogeographies of *Mauremys caspica* and *M. rivulata*—discordance of morphology, mitochondrial and nuclear genomic markers and rare hybridization. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 527–540.
- Kusza, S., Ashrafzadeh, M.R., Tóth, B., Jávör, A., 2018. Maternal genetic variation in the northeastern Hungarian fallow deer (*Dama dama*) population. *Mammalian Biology*, 93, 21–28.
- Lacy, R.C., 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*, 78, 320–335.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Lovich, J.E., Yasukawa, Y., Ota, H., 2011. *Mauremys reevesii* (Gray 1831)—Reeves' turtle, Chinese three-keeled pond turtle. *Chelonian Research Monographs*, 5, 1–10.
- Mozaffari, O., Kamali, K., Fahimi, H., 2014. The Atlas of Reptiles of Iran. Iran Department of the Environment, Tehran, 362 p.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. USA, 333 p.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2014. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32, 268–274.
- Noda, H., Kamata, N., 2004. Relationships between population traits and food habits in aquatic turtles. *Bulletin of the Herpetological Society of Japan*, 2004, 123–133.
- Ojeda, A., 2010. Phylogeography and genetic variation in the South American rodent *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 91, 302–313.
- Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F., Navarro, A., 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, 179, 555–567.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 2092–2100.
- Rastegar-Pouyani, N., Kami, H., Rajabzadeh, M., Shafiei, S., Anderson, S.C., 2008. Annotated checklist of amphibians and reptiles of Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 4, 43–66.
- Ricklefs, R.E., Schluter, D., 1993. *Species diversity in ecological communities: historical and geographical perspectives*. University of Chicago Press, Chicago, 414 p.
- Rogner, M., 2009. European pond turtles. The genus *Emys*. *Chelonian Library*, Frankfurt am

Main, Germany, Edition Chimaira, 270 p.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.

Safaei-Mahroo, B., Ghaffari, H., Fahimi, H., Broomand, S., Yazdani, M., Najafi-Majd, E., Hosseinian Yousefkhani, S.S., Rezazadeh, E., Hosseinzadeh, M.S., Nasrabadi, R., Rajabizadeh, M., 2015. The herpetofauna of Iran: checklist of taxonomy, distribution and conservation status. *Asian Herpetological Research*, 6, 257–290.

Spinks, P.Q., Shaffer, H.B., Iverson, J.B., McCord, W.P., 2004. Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 164–182.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.

Vamberger, M., Stuckas, H., Ayaz, D., Graciá, E., Aloufi, A.A., Els, J., Mazanaeva, L.F., Kami, H.G., Fritz, U., 2013. Conservation genetics and phylogeography of the poorly known Middle Eastern terrapin *Mauremys caspica* (Testudines: Geoemydidae). *Organisms Diversity and Evolution*, 13, 77–85.

Van Dijk, P.P., Iverson, J.B., Rhodin, A.G.J., Shaffer, H.B. Bour, R., 2014. *Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status*. Páginas: 1–151. En: Rhodin, A. G. J., Pritchard, P. C. H., van Dijk, P. P., Saumure, R. A., Buhlmann, K. A., Iverson, J. B. y Mittermeier, R. A. (Eds.). *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. Chelonian Research Foundation.

Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.

Xia, X., Xie, Z., Salemi M., Chen, L., Wang, Y., 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26, 1–7.

Xia, X., 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 1720–1728.

Yadollahvand, R., Kami, H.G., 2014. Habitat changes and its Impacts on the Caspian Pond Turtle (*Mauremys caspica*) Population in the Golestan and Mazandaran Provinces of Iran. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5, 2–3.

Yazarloo, M., Kami, H.G., Bagherian Yazdi, A., 2017. Sexual dimorphism and morphometric study of Caspian pond turtle, *Mauremys caspica*, (Testudines: Geoemydidae) in Golestan Province, southeast of the Caspian Sea. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 15, 321–334.