

رابطه تبار شناختی و ساختار ژنتیکی درون گونه ای لاسرتای سبز خزری

ریحانه صابری پیروز^۱، حسن رجبی مهام^۲، بهرام کیابی^۳، فراهم احمدزاده^{۴*}

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۲۰

تاریخ تصویب: ۹۶/۰۳/۰۳

چکیده

جنس *Lacerta* یکی از جنس های خانواده *Lacertidae* می باشد که دارای هشت گونه است. مطالعات گذشته روی این جنس به این نکته اشاره دارد که موقعیت آرایه شناختی درون جنس لاسرتای سبز خزری هنوز بخوبی مشخص نشده است. از این رو در این پژوهش به بررسی مجدد روابط تبار شناختی درون جنس سوسمارهای سبز با بهره گیری از تعداد نمونه ی بیشتر پرداخته شد. همچنین ساختار ژنتیکی گونه سوسمار سبز خزری در محدوده توزیع جغرافیایی آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در مجموع ۲۰ نمونه از کشورهای ارمنستان، گرجستان و ایران جمع آوری شد. سپس به همراه توالی های بدست آمده از بانک ژن مجدداً مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام آنالیزهای تبار شناختی بر اساس ژن میتوکندریایی سیتوکروم *b* درخت بیشینه درست نمایی *Maximum Likelihood* و درخت بیزین *Bayesian* رسم شدند. نتایج نشان داد که گونه های موجود در جنس لاسرتا به صورت تک نیایی در کنار هم قرار گرفته و لاسرتای سبز خزری به عنوان گونه ای خواهری سایر لاسرتاها با ضریب

۱. دانش آموخته ی کارشناسی ارشد بیوسستماتیک جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

۲. استادیار گروه علوم و زیست فناوری جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

۳. دانشیار گروه زیست شناسی و زیست فناوری دریا و آبزیان، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

۴. استادیار گروه تنوع زیستی و مدیریت اکوسیستم ها، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی

(نویسنده مسئول مقاله: f_ahmadzade@sbu.ac.ir)

خلاصه پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان فیلو جغرافی لاسرتای سبز خزری، دانشگاه شهید بهشتی اساتید راهنما: دکتر حسن

رجبی مهام، دکتر بهرام کیابی، دکتر فراهم احمدزاده

احتمال بالایی از بقیه گونه ها مجزا شده است. درون این گونه نیز دو کلاد مجزا مشاهده شد که از لحاظ پراکنش جغرافیایی نیز از هم مجزا می باشند. این مطالعه با تایید نتایج مطالعات گذشته، بر جدایی لاسرتای سبز خزری از سایر گونه های جنس لاسرتا تاکید می کند.

واژه های کلیدی: *Lacerta*، سیتوکروم *b*، تبارشناختی، لاسرتای سبز خزری، تک نیایی.

مقدمه

خزندگان خانواده ی Lacertidae شامل یک کلاد از سوسمارها با جثه های کوچک هستند این خانواده گروه غالب خزندگان اروپا و یک بخش قابل توجهی از خزندگان آفریقا را تشکیل می دهد (Arnold et al., 2007; Hipsley et al., 2009; Mendes et al., 2016). توالی های DNA نشان می دهد که خانواده ی Lacertidae شامل دو زیرخانواده ی Lacertinae و Gallotiinae می باشد. زیرخانواده ی Lacertinae شامل ۴۱ جنس با ۳۰۸ گونه می باشد (Arnold et al., 2007; Mendes et al., 2016). این زیر خانواده از دو کلاد (قبیله) تک نیایی Lacertini پالئارکتیک و Eremiadini آفریقا تشکیل شده است (Arnold et al., 2007). اگرچه در دهه های اخیر محققان در تلاش بودند تا با استفاده از مطالعات مولکولی، مورفولوژی و بیوشیمیایی بتوانند روابط فیلوژنتیک گونه های موجود در این خانواده را مشخص کنند (Harris et al., 1998; Arnold et al., 2007; Hipsley et al., 2009; Cox et al., 2010; Mendes et al., 2016). اما با این وجود روابط تبارشناختی بعضی از گونه های قبیله Lacertini هنوز حل نشده باقی مانده است. در این قبیله ۱۹ جنس با ۱۲۴ گونه وجود دارد (Mendes et al., 2016). در گذشته شماری از گونه های قبیله Lacertini را براساس ویژگی های ریخشناختی، رفتاری و توزیع جغرافیایی به عنوان جنس *Lacerta senso lato* در نظر می گرفتند (Arnold, 1989). مطالعات نشان داد که گونه های موجود در این جنس نسبت به هم حالت پرانیایی (پارافیلی) دارند (Arnold et al., 2007). در کوشش های اخیر براساس ریختشناسی و ویژگی های مولکولی، جنس *Lacerta s. l.* به چندین واحد کوچک تکنیایی تقسیم شد. این جنس در سال ۱۹۷۳ توسط Arnold به دو گروه تقسیم شد: گروه اول شامل جنس لاسرتا (*Lacerta senso stricto*) سوسمارهای سبز (به همراه جنس *Timon* سوسمارهای خالدار) است. آنها بدنی بزرگ دارند و صفحات شکمی به شدت روی هم رفته و یقه در آنها مضرس شده است. معمولاً در مناطق با پوشش گیاهی انبوه زندگی

می‌کنند. گروه دوم، شامل سوسمارهای کوچک جثه می‌باشند (معمولا طول پوزه تا مخرج کمتر از ۱۲ میلی‌متر است) آن‌ها در طیف گسترده ای از آشیان اکولوژیک زندگی می‌کنند. بسیاری از آن‌ها صخره‌زی بوده و به زندگی روی صخره و در اطراف آن سازگار شده اند (Arnold, 1973). هفت گونه از هشت گونه‌ی موجود در جنس لاسرتا به جنوب اروپا و منطقه قفقاز محدود می‌شوند و تنها *Lacerta agilis* پراکندگی بیشتری داشته و تا محدوده ی آسیای مرکزی کشیده شده است. امروزه سوسماران سبز زیستگاه‌شان را در یک منطقه‌ی وسیع از اروپای غربی تا آسیای مرکزی گسترش داده اند. آن‌ها به راحتی از سایر سوسمارها به واسطه‌ی اندازه بزرگ و رنگ‌شان که غالباً درخشان است، قابل تشخیص هستند (Godinho et al., 2005).

سوسمارهای سبز جنس *Lacerta* عمدتاً سه گروه مشخص ریختشناسی را تشکیل می‌دهند. این گروه‌ها *Lacerta agilis* و *Lacerta viridis* و *Lacerta trilineate* می‌باشند (Peters, 1962). *Lacerta agilis* و *Lacerta strigata* گونه‌هایی هستند که رابطه‌ی نزدیک با یکدیگر داشته و در شرق قفقاز این دو گونه به طور گسترده پراکندگی هم جا دارند و اغلب با هم در زیستگاه‌های مشابه حضور دارند (Roytberg, 2011).

از میان سوسمارهای موجود در جنس *Lacerta* دو گونه‌ی *L. strigata* و *L. media* در ایران وجود دارند. لاسرتای سبز خزری *L. strigata* (Eichwald, 1987) گونه‌ای است که پراکنش آن در غرب به ترکیه و ارمنستان محدود شده و در شرق نیز حضور این گونه تا استان گلستان، ایران به اثبات رسیده است (Anderson, 1999; Smid et al., 2014). این گونه در ایران و اغلب در محدوده ی جنگل‌های هیرکانی شمال ایران و در اطراف برخی از رودخانه‌ها که به وسیله‌ی درختان انبوه پوشیده شده است (مانند رودخانه‌ی ارس) قابل مشاهده است (Ahmadzadeh et al., 2008). این گونه از لحاظ ریخت شناسی دارای ردیف‌های شکمی متقاطع است و شکاف‌هایی بین آن قرار دارد. سطح شکمی ۶ (یا به ندرت ۸) ردیف طولی دارد. یقه کاملاً دندانه دار شده است. معمولاً دوتا فلس عقبی بینی دارد. معمولاً ۲۵ تا ۲۹ صفحه تیغک مانند زیر انگشت چهارم دارد. معمولاً ۳۷ تا ۴۹ فلس در سمت پشت بدن در ناحیه‌ی میانی در این گونه وجود دارد. معمولاً پرده‌ی صماخ (Tympanic shield) و ۱۷ تا ۲۱ منفذ رانی دارد. این منافذ کاملاً تا زانو امتداد پیدا کرده‌اند. بندرت ۲۰ فلس گیجگاهی در آن مشاهده می‌شود. معمولاً پنجمین فلس زیر آرواره‌ی کاملاً توسعه یافته است. لاسرتاهای سبز خزری جوان معمولاً قهوه‌ای زیتونی روشن هستند. تقریباً همیشه نوارهای روشنی از ناحیه‌ی فوق آرواره‌ی تا پاهای عقبی کشیده شده است. این نوارهای روشن در ناحیه‌ی ستون مهره‌ها و قسمت‌های پشتی - جانبی وجود دارد (در مجموع پنج نوار روشن دارد). بالغ‌ها معمولاً بدون نوار یا لکه‌ها روشن هستند. ناحیه پشت سبز یک‌دست یا با لکه‌های سیاه است (Anderson, 1999).

Godinho و همکاران در سال ۲۰۰۵ براساس چندین ژن (هسته‌ای و میتوکندریایی) درخت تبارشناختی برای سوسمارهای سبز ارائه دادند، این درخت نشان داد که نرخ جایگزینی برای ژن سیتوکروم b در بین لاسرتاها زیاد بوده است و همچنین در این مطالعه اشاره شد که موقعیت *L. strigata* و *L. agilis*, *L. scheriberi* کاملاً از هم مجزا بوده است. آن‌ها در این مطالعه اشاره کردند که موقعیت سایر لاسرتاهای سبز بر اساس ژن سیتوکروم b بخوبی مشخص نشده است و موقعیت لاسرتای سبز خزری نیز مورد سؤال است (Godinho et al., 2005).

بدین منظور در پژوهش حاضر درخت تبارشناختی جنس *Lacerta* با تعداد نمونه‌های بیشتر از لاسرتای سبز خزری ترسیم شد. با توجه اینکه قسمت اعظم پراکنش لاسرتای سبز خزری در ایران می‌باشد در این پژوهش سعی شد تا با نمونه برداری گسترده بتوان موقعیت این گونه را در بین سوسمارهای جنس لاسرتا بدست آورد و همچنین ساختار ژنتیکی درون گونه‌ای آن را مورد بررسی قرار داد.

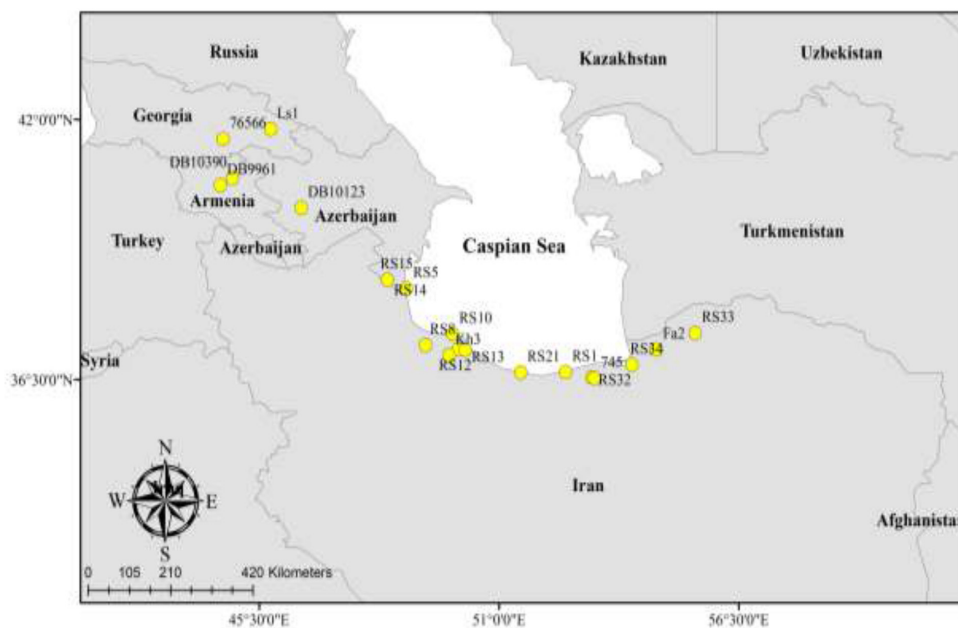
مواد و روشها

برای ترسیم درخت کلی جنس *Lacerta*، ۲۱ توالی بر اساس ژن سیتوکروم b گونه‌های موجود در این جنس از وبگاه بانک ژن اخذ و به توالیهای بدست آمده از لاسرتای سبز خزری در این پژوهش اضافه گردید. مشخصات این نمونه‌ها در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

جدول ۱: مشخصات نمونه های مورد مطالعه در این پژوهش و توالیهای استفاده شده از سایت NCBI

گونه	مختصات جغرافیایی			کد مجلی	Accession number
	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	کشور		
<i>L. strigata</i>	۴۶,۴۶۴۵۸	۴۰,۱۳۰۹۱	NKR	DB۱۰۱۲۳	MH۹۷۴۵۲۰
<i>L. strigata</i>	۴۹,۹۳۷۶۹	۳۷,۴۶۴۹	ایران	RS۱۰	MH۹۷۴۵۲۱
<i>L. strigata</i>	۵۰,۰۶۰۷۲	۳۷,۱۴۲۲	ایران	RS۱۲	MH۹۷۴۵۲۲
<i>L. strigata</i>	۵۰,۲۲۵۶۵	۳۷,۱۲۹۴۴	ایران	RS۱۳	MH۹۷۴۵۲۳
<i>L. strigata</i>	۴۸,۴۴۲۸۹	۳۸,۶۱۲۴۳	ایران	RS۱۴	MH۹۷۴۵۲۴
<i>L. strigata</i>	۴۸,۴۴۲۸۹	۳۸,۶۱۲۴۳	ایران	RS۱۵	MH۹۷۴۵۲۵
<i>L. strigata</i>	۵۲,۵۳۱۴۱	۳۶,۶۶۱۳۶	ایران	RS۱	MH۹۷۴۵۲۶
<i>L. strigata</i>	۴۴,۸۸۵۰۹	۴۰,۷۵۸۴۳	ارمنستان	DB۱۰۳۹۰	MH۹۷۴۵۲۷
<i>L. strigata</i>	۵۱,۵۰۰۹۸	۳۶,۶۵۱۶۸	ایران	RS۲۱	MH۹۷۴۵۲۸
<i>L. strigata</i>	۵۳,۱۳۲۱	۳۶,۵۴۷۸	ایران	RS۲۲	MH۹۷۴۵۲۹
<i>L. strigata</i>	۴۴,۶۰۸۹۶	۴۰,۶۰۹۵	ارمنستان	DB۹۹۶۱	MH۹۷۴۵۳۰
<i>L. strigata</i>	۵۵,۵۰۴۰۴	۳۷,۴۸۶۸۲	ایران	RS۳۳	MH۹۷۴۵۳۱
<i>L. strigata</i>	۵۴,۰۴۹۷۷	۳۶,۸۱۶۲۹	ایران	RS۳۴	MH۹۷۴۵۳۲
<i>L. strigata</i>	۴۸,۸۸۰۹۷	۳۸,۴۲۹۹۷	ایران	RS۵	MH۹۷۴۵۳۳
<i>L. strigata</i>	۵۳,۱۸۶۴۱	۳۶,۵۳۱۴۲	ایران	۷۴۵	MH۹۷۴۵۳۴
<i>L. strigata</i>	۴۴,۶۷۰۶۳	۴۱,۵۹۱۴۷	گرجستان	۷۶۵۶۶	MH۹۷۴۵۳۵
<i>L. strigata</i>	۴۵,۷۶۱۷۴	۴۱,۷۹۷۳۴	گرجستان	Ls۱	MH۹۷۴۵۳۶
<i>L. strigata</i>	۴۹,۳۱۸۳۵	۳۷,۳۳۱۳۵	ایران	RS۸	MH۹۷۴۵۳۷
<i>L. strigata</i>	۵۴,۶۱۳۳۸	۳۷,۱۳۷۱۶	ایران	Fa۲	MH۹۷۴۵۳۸
<i>L. strigata</i>	۴۹,۸۵۱۳۹	۳۷,۰۱۶۰۵	ایران	Kh۳	MH۹۷۴۵۳۹
<i>L. media</i>	—	—	—	—	KC۸۹۶۹۶۶
<i>L. media</i>	—	—	—	—	KC۸۹۶۹۶۷
<i>L. media</i>	—	—	—	—	KC۸۹۶۹۷۶
<i>L. media</i>	—	—	—	—	KC۸۹۶۹۷۷
<i>L. media</i>	—	—	—	—	KC۸۹۶۹۸۱
<i>L. media</i>	—	—	—	—	KC۸۹۶۹۸۲
<i>L. pamphylica</i>	—	—	—	—	KC۸۹۷۰۱۳
<i>L. trilineata</i>	—	—	—	—	KC۸۹۷۰۱۷
<i>L. trilineata</i>	—	—	—	—	KC۸۹۷۰۱۸
<i>L. trilineata</i>	—	—	—	—	KC۸۹۷۰۱۹
<i>L. trilineata</i>	—	—	—	—	KC۸۹۷۰۲۰
<i>L. viridis</i>	—	—	—	—	AF۳۷۳۰۳۴
<i>L. viridis</i>	—	—	—	—	EU۱۱۶۵۱۴
<i>L. schreiberi</i>	—	—	—	—	AF۳۸۶۷۸۵
<i>L. schreiberi</i>	—	—	—	—	AF۳۸۶۷۸۴
<i>L. bilineata</i>	—	—	—	—	AF۳۷۳۰۳۳
<i>L. bilineata</i>	—	—	—	—	AY۰۹۹۲۸۴
<i>L. bilineata</i>	—	—	—	—	AY۰۹۹۲۸۳
<i>L. bilineata</i>	—	—	—	—	AY۰۹۹۲۸۲
<i>L. agilis</i>	—	—	—	—	AY۱۶۴۳۱
<i>L. agilis</i>	—	—	—	—	AF۳۷۳۰۳۲
<i>Timon kurdestanicus</i>	—	—	—	—	JQ۴۲۵۸۳۶

در این پژوهش ۲۰ نمونه از لاسرتای سبزه خزری از ۱۹ ایستگاه بدست آمد (جدول ۱-شکل ۱). نمونه‌ها از نقاط مختلف پراکنش این گونه جمع‌آوری شدند. شماری از نمونه‌ها در محل جمع‌آوری با استفاده از اتر بیهوش و پس از تهیه ی بافت برای بررسی های ژنتیکی در همان منطقه رهاسازی شدند. بافت ها از قسمت انتهایی دم جانور تهیه شده و در الکل ۹۶٪ تثبیت شدند.



شکل ۱: نقشه‌ی مختصات ایستگاه‌های مورد مطالعه (برای مشاهده مختصات و نام هر ایستگاه به جدول ۱ مراجعه فرمایید).

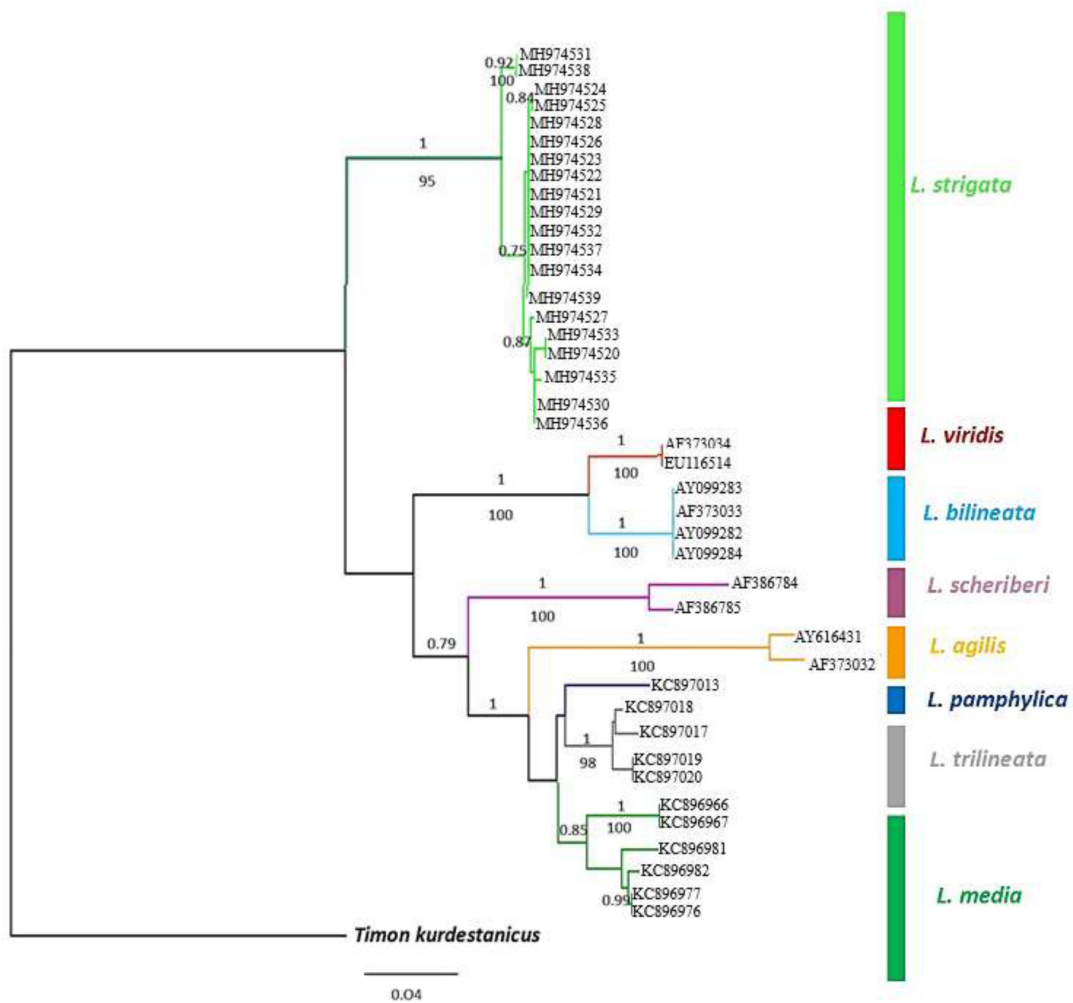
فرآیند استخراج DNA با استفاده از روش کلاسیک فنول-کلروفرم انجام شد (Sambrook et al., 1989) برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) روی ژن میتوکندریایی سیتوکروم b از آغازگرهای Peil و Glu-DG استفاده شد (Palumbi, 1991). فرآیند PCR در شرایط دمایی و اسرشت 94°C (۳۰ ثانیه)، دمایی اتصال 47°C (۴۰ ثانیه) و دمایی تکثیر 72°C (۶۰ ثانیه) طی ۳۵ چرخه، انجام شد. سپس محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت MacroGen کره جنوبی ارسال شد (MacroGen Korea). توالی‌ها با کمک نرم افزار X.6.0.2.Codoncode aligner v ویرایش شدند (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). سپس با استفاده از نرم افزار Mr.modeltest v ۲.۲ (Nylander, 2004) بهترین مدل تکاملی محاسبه شد و در ادامه همترازی توالیها با برنامه Clustal W قرار داده شده در نرم‌افزار Bioedit (Hall, 1999) بصورت خودکار انجام شد و در نهایت توالی ها به صورت چشمی کنترل شدند. نرم افزارهای RAXML (Stamatakis, 2006) v.7.2.X برای ترسیم درخت بیشینه احتمال

Maximum Likelihood (ML) با Bootstrap ۱۰۰۰ به کار برده شد. برای بدست آوردن درخت بیزین Bayesian از نرم افزار MrBayes v.3.2.X (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) استفاده شد. این آنالیز برای یک میلیون نسل انجام شد. یک درخت در هر ۱۰۰ نسل ذخیره شد و ۱۰ درصد تمام درختهای اولیه قبل از رسیدن به Stationarity حذف شدند.

نتایج

برای مشخص کردن موقعیت فیلوژنی لاسرتای سبز خزری در بین هشت گونه لاسرتای سبز، درخت بیشینه احتمال ML و درخت بیزین برای ژن میتوکندریایی سیتوکروم b ترسیم شد. این مطالعه در مجموع روی ۴۱ نمونه از هشت گونه‌ی جنس *Lacerta* با طول توالی ۵۸۷ جفت باز انجام شد. بهترین مدل تکاملی برای این ژن، HKY+G با نرخ گامای ۰/۱۴۸ محاسبه شد. با توجه به یکسان بودن توپولوژی درخت‌های ترسیم شده، تنها یک درخت ارائه شد و میزان Bootstrap بالای ۷۵ درصد و Posterior probabilities بالای ۰/۷ بر روی شاخه‌های آن مشخص شد. گونه‌ی *Timon kurdestanicus* نیز به عنوان ریشه‌ی درخت انتخاب شد (شکل ۲). همانطور که در این درخت کاملاً قابل مشاهده است، گونه‌ها نسبت به هم حالت تکنیایی داشته و لاسرتای سبز خزری با استفاده از هر دو روش BI و ML از سایر گونه‌های جنس لاسرتا کاملاً مجزا شده است. این گونه به عنوان کلاد خواهری سایر گونه‌های این جنس محسوب شده و زودتر از بقیه از جد مشترک سوسمارهای سبز جدا شده است. در بین سایر گونه‌های جنس *Lacerta* دو گونه‌ی *L. viridis* و *L. bilineata* نزدیک‌ترین گونه به لاسرتای سبز خزری محسوب می‌شوند.

در داخل گونه‌ی لاسرتای سبز خزری نیز سه کلاد مجزا به دست آمد. کلاد ۱ یا همان کلاد شرق گلستان که از دو کلاد دیگر با Bootstrap ۱۰۰ درصد مجزا شده است. کلاد غرب نیز شامل دو کلاد ۲ و ۳ می‌باشد که با ضریب احتمال پایینی این دو کلاد از هم مجزا شده‌اند. بیش‌ترین محدود‌ی پراکنش این گونه محدود به کلاد غرب می‌باشد که اکثر جمعیت‌های ایرانی و اروپایی را شامل می‌شود. در کلاد ۳ علاوه بر نمونه‌های اروپایی، نمونه‌ای از آستارا (گیلان) نیز قرار می‌گیرد.



شکل ۲: درخت Bayesian و ML ترسیم شده با استفاده از توالی بخشی از ژن سیتوکروم b به طول ۵۸۷ باز. مناسبترین مدل تکاملی برای این ژن HKY+G محاسبه شد. ضریب گاما برای این مدل (۰/۱۴۸) بدست آمد. درخت با استفاده از گونه‌ی *Timon kurdestanicus* ریشه دار شد. میزان شاخص Bootstrap برای ML در زیر و Posterior probabilities برای BI در بالای هر شاخه مشخص شده است. به ترتیب شاخص Bootstrap و Posterior probability بالای ۷۵ درصد و ۰/۷ نمایش داده شده است و از آوردن اعداد زیر این محدوده صرف نظر شده است.

بحث

Peters در سال ۱۹۶۲، پنج گونه از جنس *Lacerta* را شناسایی کرد. این گونه‌ها شامل *L. trilineata*, *L. agilis schreiberi*, *L. strigata*, *L. viridis* و *L. Mayer* در سال ۱۹۸۵ Lutz و Mayer به این نتیجه دست یافتند که رابطه ی نزدیکی بین *L. trilineata* و *L. viridis* نسبت به گونه ی *L. agilis* برقرار است. اما آنها گونه های دیگر را مورد بررسی قرار ندادند. اما مطالعات کلادیستیک که در گذشته بر روی گونه‌های موجود در این جنس انجام گرفته بود نتوانست روابط تبارشناختی سوسمارهای سبز را بازسازی کند (Peters, 1962; Lutz and Mayer, 1985; Harris et al., 1998; Rykena, 1996). Godinho و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای این سوسمارها براساس چندین ژن هسته‌ای و میتوکندریایی درخت فیلوژنتیک ارائه دادند، درخت فیلوژنی که در بخش نتایج پژوهش حاضر براساس ژن سیتوکروم b برای گونه‌های سوسمارهای سبز ارائه شد با درخت Godinho و همکاران مطابقت داشت. در این دو بررسی مونوفایلی بودن گونه های جنس لاسرتا مورد تایید قرار گرفت. در هر دو مطالعه گونه های *L. trilineata* و *L. viridis* به عنوان کلاد های خواهری گونه های *L. agilis*, *L. schreiberi*, *L. media* بوده و لاسرتای سبز خزری به عنوان کلاد خواهری سایر لاسرتاها به شمار می رود.

Godinho و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از ژن هسته‌ای C-mos نیز روابط بین این گونه‌ها را مورد بررسی قرار داد. نتایج آنها نیز نشان داد که لاسرتای سبز خزری در شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده، از سایر گونه های موجود در جنس لاسرتا مجزا شده است.

درخت زمانداری که برای جنس لاسرتا، با استفاده از سه ژن میتوکندریایی توسط احمدزاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ ترسیم شد، این نتیجه را مورد تایید قرار داد. این درخت زماندار نشان داد که لاسرتای سبز خزری در حدود ۷/۵ تا ۱۰ میلیون سال پیش از سایر گونه های جنس لاسرتا مجزا شده است (Ahmadzadeh et al., 2013a). در دو مطالعه ی گذشته که اشاره شد، تنها یک یا دو توالی از لاسرتای سبز خزری مربوط به گرجستان در مورد وضعیت این گونه صحبت شده بود، این در حالی است که در بخش نتایج مطالعه ی پیش رو، با استفاده از نمونه‌های بیش‌تر علاوه بر تایید نتایج قبل میزان جدایی این گونه را براساس ژن سیتوکروم b کاملاً مشخص کرد و بر جدایی لاسرتای سبز خزری نسبت به سایر گونه های جنس لاسرتا از جد مشترک تاکید نمود.

همان‌طور که در درخت درون گونه‌ای لاسرتای سبز خزری براساس ژن سیتوکروم b مشاهده شد، این گونه در محدود ی پراکنش خود در سه کلاد جای می‌گیرد که نمونه‌های شرق گلستان

(مراوه تپه و سد و شمشگیر) است که در انتهای پراکنش این گونه محسوب می‌شود از دو کلاد دیگر مجزا شده است. این در حالی است که کلاد های غربی ۳ و ۲ با *Bootstrap* بالایی از هم مجزا نمی‌شوند. همانطور که پیش از این هم اشاره شد نمونه های آستارا با نمونه های اروپایی در یک کلاد قرار می‌گیرند اما چه عاملی سبب مجزا شدن سوسمارهای موجود در دشت مغان که هم مرز با ارمنستان است، می‌شود؟ به احتمال زیاد رود ارس با عمق متوسط ۴ متر توانسته مانعی بر سر راه مهاجرت افراد مغان و ارمنستان باشد. اما چون عمق این رود هنگامی که به دریای خزر می‌ریزد کاهش پیدا می‌کند و از وسعت آن کاسته می‌شود جمعیت آستارا قادر هستند با جمعیت موجود در ارمنستان ارتباط برقرار کنند. به همین سبب آن‌ها در یک کلاد قرار می‌گیرند.

بررسی بر روی گونه ی *Darevskia chlorogaster* خانواده ی Lacertidae جنس *Darevskia* نشان داد که از سه جمعیت کمپلکس *D. chlorogaster* دو جمعیت در مرکز و غرب جنگل‌های هیرکانی واقع شده اند، این دو جمعیت از جمعیت شرق گلستان مجزا شده اند (Ahmadzadeh et al., 2013b). بنظر می‌رسد محدود ه ی پراکنش این گونه از کاهش جنگل‌ها در طی نوسانات آب و هوایی پیروی می‌کند. کمپلکس دیگر از این جنس که در شمال ایران زندگی می‌کند، کمپلکس گونه ای *D. defilippii* است. این کمپلکس الگوی فیلوجغرافیایی جالب توجهی را از خود نشان می‌دهد. اعضای این کمپلکس بر خلاف کمپلکس *D. chlorogaster* قادر است در ارتفاعات بالا زندگی کند (Darevsky, 1967; Anderson, 1999). هر دو گونه در محدود ه ی شمال ایران پراکنش پیدا کرده اند (Anderson, 1999; Smid et al., 2014). یک کمپلکس در ارتفاعات (*D. defilippii*) و کمپلکس دیگر در نواحی پست (*D. chlorogaster*) زندگی می‌کند. لاسرتای سبز خزری نیز همانند جمعیت‌های این کمپلکس‌ها در شمال ایران پراکنش داشته با این تفاوت که از مناطق پست تا ارتفاع ۱۸۰۰ متری از سطح دریا یافت می‌شود (Anderson, 1999). جمعیت‌های غربی این گونه همانند کمپلکس *D. chlorogaster* از جمعیت شرقی گلستان مجزا شده است. اما این تفاوت درون جمعیت‌های این کمپلکس (*D. chlorogaster*) قابل توجه می‌باشد و هر جمعیت به صورت یک گونه ی مجزا معرفی شده است. کمپلکس *D. defilippii* و *D. chlorogaster* الگوی خاصی را از خود نشان می‌دهند. دره فیروزکوه - ساری نقش مهمی در جدا کردن جمعیت مازندران *D. chlorogaster* (کلاد مرکزی) دارد. جمعیت *D. defilippii* نیز بین دره سفیدرود در گیلان در غرب با کوه‌های فیروزکوه در شرق محدود شده است. با این وجود جمعیت های *D. chlorogaster* در زمین‌های پست توانسته با هم ارتباط داشته و میزان بالایی از جریان ژنی را نشان دهد (Ahmadzadeh et al., 2013b). لاسرتای سبز خزری نیز در این محدود ه پراکنش دارد و این موانع نتوانسته بین جمعیت مازندران و گیلان جدایی ایجاد کند. تنها جمعیت‌های شرقی (شرق

گلستان) این گونه از جمعیت‌های غربی فاصله می‌گیرند.

به طور کلی لاسرتای سبز خزری گونه ای است که بر اساس ژن سیتوکروم در ابتدا از سایر گونه های جنس لاسرتا مجزا شده ولی با وجود وسعت پراکنش و قدمت گونه تنها دو کلاد کاملاً مجزا در آن قابل مشاهده می باشد. علاوه بر این، موانع محدود کننده بر سر راه پراکنش که گونه های دیگر را تحت تاثیر قرار داده، تاثیر کمتری بر روی این گونه گذاشته است. شاید بتوان دلایل احتمالی برای این موارد را به شرایط اکولوژیک این گونه وابسته دانست. در مجموع می توان به این نکته اشاره کرد که داشتن نقشه ای از توزیع و پراکنش گونه به همراه آشنایی با وضعیت تبار شناختی گونه به ما اجازه می دهد تا تصویری دقیق از گسترش و کاهش وسیع و پی در پی جمعیت های گونه داشته باشیم و بتوانیم به جغرافیای تاریخی گونه دست پیدا کنیم.

سپاسگزاری

در انتها بر خود واجب میدانیم تا از زحمات بزرگوارانی که ما را در روند انجام این پژوهش یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی خود را به عمل آوریم. از پرفسور ولفانگ بوهمه از موزه الکساندر کوئنینگ آلمان و پرفسور میگوئل کاروتره برای ارسال نمونه های بافتی خارج از کشور، دکتر سعیده عطایی، دکتر حاج قلی کمی (هیئت علمی دانشگاه گلستان)، دکتر محمود قاسم پوری (هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس)، مهشید اولادی، روکسانا طاهری، مهرناز طاعتی، علی قشقایی، گلینا شاهرخی نژاد، امیر ابراهیمی (بیده بان منطقه حفاظت شده بوجاق)، نعیم مرادی، غلام اسدی، مریم قاطعی، سهیلا یوسفی، پریسا گلی نیا، افشین فقیری، فرزانه خانجانی، علی رضا نادری و دانشجویان و مسئولان دانشگاه گلستان برای همراهی در تهیه نمونه های بافتی و حمایت های بی دریغشان صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

- Ahmadzadeh, F., Flecks, M., Roedder, D., Boehme, W., Ilgaz, Ç., Harris, D.J., Engler, J.O., Üzümlü, N. and Carretero, M.A. (2013a) Multiple dispersal out of Anatolia: biogeography and evolution of Oriental green lizards. *Biological Journal of the Linnean Society* 110 (2): 398-408.
- Ahmadzadeh, F., Flecks, M., Carretero, M.A., Mozaffari, O., Böhme, W., Harris, D.J., Freitas, S. and Rödder, D. (2013b) Cryptic speciation patterns in Iranian rock lizards uncovered by integrative taxonomy. *PloS one*. 8 (12): e80563.
- Ahmadzadeh, F., Kiabi, B., Kami, H. and Hojjati, V. (2008) A preliminary study of the lizard fauna and their habitats in northwestern Iran. *Asiatic Herpetological Research*. 11: 1-9.

- Anderson, S.C. (1999) The lizards of Iran Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Oxford, Ohio, 442 pp.
- Arnold, E.N. (1973) Relationships of the palaeartic lizards assigned to the genera *Lacerta*, *Algyroides* and *Psammmodromus* (Reptilia: Lacertidae). Bulletin of the British Museum, Natural History Zoology 25: 289–366.
- Arnold, E.N. (1989) Towards a phylogeny and biogeography of the Lacertidae: relationships within an Old-World family of lizards derived from morphology. Bulletin of the British Museum, Natural History Zoology 55 (2): 209-257.
- Arnold, E.N., Arribas, O. and Carranza, S. (2007) Systematics of the Palaeartic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with descriptions of eight new genera Zootaxa 1430: 1–86.
- Cox, S.C., Carranza, S., Brown, R.P. (2010) Divergence times and colonization of the Canary Islands by Gallotia lizards. Molecular phylogenetics and evolution 56: 747–757.
- Darevsky, I.S. (1967) Rock lizards of the Caucasus: systematics, ecology and phylogeny of the polymorphic groups of Caucasian rock lizards of the subgenus *Archaeolacerta*. Leningrad: Nauka (in Russian: English translation published by the Indian National Scientific Documentation Centre, New Delhi, 1978).
- Eiselt, J. (1995) Ein Beitrag zur Kenntnis der *Archaeolacerten* (sensu Mehely, 1909) des Iran (*Squamata*: Sauria: Lacertidae). Herpetozoa. 8: 59–72.
- Godinho, R., Crespo, E.G., Ferrand, N. and Harris, D.J. (2005) Phylogeny and evolution of the green lizards, *Lacerta* spp. (Squamata: Lacertidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Amphibia-Reptilia 26 (3): 271-285.
- Hall, T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT". Nucleic Acids Research 41: 95-98.
- Harris, D.J., Arnold, E.N. and Thomas, R.H. (1998) Relationships of Lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. Proceedings of the Royal Society of London B 265: 1939–1948.
- Hipsley, C.A., Himmelmann, L., Metzler, D. and Müller, J. (2009) Integration of Bayesian molecular clock methods and fossil-based soft bounds reveals early Ceno-

- zoic origin of African lacertid lizards. *BMC evolutionary biology* 9 (1): 151-162.
- Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. (2001) Mr Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics Applications Note* 17: 754-755.
- Lutz, D. and Mayer, W. (1985) Albumin Evolution and its Phylogenetic and Taxonomic implications in several Lacertid Lizards. *Amphibia-Reptilia* 7: 53-61.
- Mendes, J., Harris, D.J., Carranza, S. and Salvi, D. (2016) Evaluating the phylogenetic signal limit from mitogenomes, slow evolving nuclear genes, and the concatenation approach. New insights into the Lacertini radiation using fast evolving nuclear genes and species trees. *Molecular phylogenetics and evolution* 100: 254-267.
- Nylander, J. (2004) MrModeltestv2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W., Stick, L. and Grabowski, G. (1991) The Single Tools Guide to PCR. Marine Version Honolulu, Hawaii.
- Peters, G. (1962) Studien zur Taxonomie, Verbreitung und Ökologie der Smaragdeidechsen. I. *Lacerta trilineata*, *viridis* und *strigata* als selbständige Arten. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Berlin* 38: 127-152.
- Roytberg, E.S. (2011) A comparative study of intra-and inter-population variation in two sympatric lizards, *Lacerta agilis boemica* and *L. strigata* in Daghestan. *Russian Journal of Herpetology* 1(1): 77-85.
- Rykena, S. (2001) Experimental hybridization in green lizards (*Lacerta s. str.*), a tool to study species boundaries. *Mertensiella* 13: 78-88.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Press.
- Šmíd, J., Moravec, J., Kodým, P., Kratochvíl, L., Yousefkhani, S.S.H. and Frynta, D. (2014) Annotated checklist and distribution of the lizards of Iran. *Zootaxa* 3855 (1): 1-97.