

<https://tbj.ui.ac.ir/?lang=en>

Taxonomy and Biosystematics

E-ISSN: 2322-2190

Document Type: Research Paper

Vol. 17, Issue 1, No.62, (2025), P: 57-72

Received: 22/08/2024 Accepted: 01/02/2025

Study of phylogenetic relationships and taxonomic re-evaluation of Iran's skittering frogs (genus *Euphlyctis*)

Zeinolabedin Mohammadi

Assistant Professor, Department of Biology Education, Farhangian University, Tehran, Iran
mohammadi.zeinal@gmail.com

Asghar Khajeh * 

Assistant Professor, Animal science group, faculty of Agriculture, University of Saravan, Saravan, Iran
asgharmn@yahoo.co.uk

Fatemeh Ghorbani

Ph.D in Biosystematic Zoology, Golestan Education, Gorgan, Iran
biosys2050@gmail.com

Abstract

Genus *Euphlyctis* includes two subgenera, *Euphlyctis* and *Phrynoderma*, and more than ten lineages in Southeast Asia. In recent studies, skittering frogs of the genus *Euphlyctis* have been taxonomically revised. Moreover, some new cryptic species have been identified and described through molecular and morphological approaches. Based on the latest taxonomic revision, related species have been placed into two subgenera, and the status of *E. cyanophlyctis* (Schneider, 1799) has also been revised. In this study, we aim to elucidate the taxonomic status of the only member of the genus *Euphlyctis* in Iran, distributed in the southeast of Iran. Additionally, the phylogenetic relationship and genetic divergence of Iran's skittering frogs have also been re-evaluated and discussed. In this study, 32 sequences of mitochondrial 16S rRNA, including 492 bp from Iranian skittering frogs, and 284 sequences from GenBank have been analyzed to clarify the phylogenetic relationships and genetic divergence among populations of the species in Iran and other Asian countries. Phylogenetic analyses using BEAST software revealed 13 clades and subclades within the species. Skittering frogs from Iran were placed in the clade that includes specimens from Pakistan, Nepal, Bangladesh, India, and a topotype of *E. adolfi*, receiving high support (PP 1.00). In addition, this clade was divided into 3 separate lineages, each of which is related to geographical isolations. Despite molecular analyses, morphological features of skittering frogs from southeast Iran demonstrated variations in morphological characters, resulting in complexity and misleading nomenclature.

Keywords: Skittering frog, *Euphlyctis adolfi*, Phylogeny, 16S gene, Southern Iran.

Introduction

Genus *Euphlyctis* belongs to the family Dicroglossidae which includes two subgenera *Euphlyctis* and *Phrynoderma* and more than ten lineages in the Southeast Asia (Dubois et al., 2021; Dufresnes et al., 2022; Forest, 2024). Subgenus *Euphlyctis* consists of *E. ehrenbergii*, *E. jaladhara*, *E. adolfi*, and *E. cyanophlyctis* distributed over south Asia and *E. karaavali*, *E. hexadactyla*, *E. aloysii*, and *E. kerala* were included in subgenus *Phrynoderma* living in the south India, Bangladesh, and Sri Lanka (Dinesh et al., 2021, 2022; Dufresnes et al., 2022). The skittering frogs of Iran can be found in the southeast (Sistan and Baluchestan, and Hormozgan) and were first recognized as *Rana cyanophlyctis* Boulenger, 1920. Baluch and Kami (1994) mentioned them as *R. cyanophlyctis seistanica*. Later, it has been revised as *E. adolfi* (Dufresnes et al., 2022); however, Dinesh et al., (2021) recognized *E. adolfi (cyanophlyctis) seistanica* as a separate species. In this study, we investigated the phylogenetic relationships and genetic divergence among populations of the species of the genus *Euphlyctis* in the Southeast Asia.

*Corresponding author

Mohammadi, Z. Khajeh, A. Ghorbani, F. (2025). Study of phylogenetic relationships and taxonomic re-evaluation of Iran's skittering frogs (genus *Euphlyctis*). *Taxonomy and Biosystematics*, 17(1), 57-72.

2322-2190 © The Author(s).

Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC BY-NC 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>).



<http://dx.doi.org/10.22108/tbj.2025.142556.1279>

Materials and methods

A total of 45 individuals of skittering frog (*E. cyanophlyctis*) were collected from nine localities of Sistan and Baluchestan Province, southeast Iran. Of these, 32 tissue samples from 45 specimens were used for molecular study. Total DNA was extracted from muscle tissue using the phenol/chloroform (Sambrook et al., 1989) and mitochondrial 16S rRNA was amplified using 16SL and 16SH primers (Palumbi, 1991). The final data matrix consisted of 316 *Euphlyctis* sequences (including 32 sequences from this study and 284 sequences retrieved from GenBank), *Fejervarya cancrivora* (AB070738) and two *Hoplobatrachus tigerinus* (AB272594) were used as outgroups. Phylogenetic analysis was conducted using the Bayesian method implemented in BEAST v2.2.1 (Bouckaert et al., 2014) with the GTR+I+G model. All analyses were run in the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). The genetic divergences between and within lineages were computed using the p-distance method in Mega.

Research Findings

The Bayesian tree based on 316 *Euphlyctis* sequences revealed 13 clades and subclades with a posterior probability (PP) of ≥ 0.70 in South Asia. Clade A includes specimens from Iran, Pakistan, India, Bangladesh, and Nepal. This clade was separated into three subclades (A1, A2, and A3) with high PP (1.00). The specimens from Iran and Pakistan were included in subclade A1. The genetic distances based on p-distance ranged from 1.4% to 1.6% between lineages and 0.2% to 0.3% within subclades. In addition, morphological comparisons of the specimens showed high color polymorphism in the southeast of Iran.

Discussion of Results and Conclusions

Iran's skittering frogs form a clade with specimens from Pakistan, India, Nepal, Bangladesh, and the topotypes of *E. adolfi* (Clade A), indicating that this clade *should be assigned to E. adolfi* based on the priority rule. Subclade A1 includes specimens from South Iran and South and Central Pakistan, where two subspecies, *E. a. seistanica* (Nikolskii, 1899) from Hamoon Saburi in North Sistan, Iran, and *E. a. microspinulata* Khan, 1997 from Khuzdar, Pakistan, have been described. Considering the close proximity of the sampling site of this study (Karvandri Khash) to Hamoon Saburi (about 200 to 300 km), it can be deduced that Iran's skittering frogs are related to the geographical isolate *E. a. seistanica*, and *E. a. microspinulata* is its junior synonym, as supported by morphometric and molecular characters. However, molecular and morphological investigation on the type and paratype specimens is needed to elucidate the taxonomic status of Iran's skittering frogs.


Acknowledgement

This research was supported by grants from the research department of the University of Sistan & Baluchestan, Zahedan, Iran, under project No. 89013.

بررسی روابط تبارزایی و بازنگری آرایه‌شناختی قورباغه‌های مردابی بلوچی ایران (جنس *Euphlyctis*)

زین‌العابدین محمدی، استادیار گروه آموزش زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

mohammadi.zeinal@gmail.com

اصغر خواجه* ، استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه سراوان، سراوان، ایران

asgharmn@yahoo.co.uk

فاطمه قربانی، دکتری بیوسستماتیک جانوری، آموزش و پرورش استان گلستان، گرگان، ایران

biosys2050@gmail.com

چکیده

جنس *Euphlyctis* با دو زیرجنس *Euphlyctis* و *Phrynoderma* و بیش از ده دودمان واگرا در جنوب آسیا پراکنده شده است. اخیراً براساس مطالعات ریختی و مولکولی روابط تبارزایی و آرایه‌شناسی اعضای این جنس از جمله قورباغه مردابی بلوچی بازنگری شده است. با توجه به تغییرات گسترده آرایه‌شناختی در این جنس، طی مطالعه حاضر سعی شده است وضعیت آرایه‌شناسی، روابط تبارزایی و واگرایی ژنتیکی قورباغه مردابی بلوچی ایران با سایر گونه‌های این جنس مجدداً ارزیابی شود. به همین منظور، ۳۲ توالی از ژن ریوزومی 16S میتوکندری مربوط به ۳۲ نمونه قورباغه مردابی بلوچی از جنوب شرق ایران به همراه ۲۸۴ توالی از بانک ژن مربوط به سایر دودمان‌های این جنس تجزیه و تحلیل شدند. تحلیل‌های تبارزایی حاصل از نرم‌افزار BEAST براساس ۴۹۲ جفت‌باز از ژن 16S میتوکندری بیان‌کننده ۱۳ دودمان اصلی و فرعی در این جنس است. مطابق این درخت مولکولی، نمونه‌های قورباغه مردابی بلوچی ایران و نمونه‌هایی از پاکستان، نپال، بنگلادش و هند همراه با نمونه‌هایی از توپوتایپ *E. adolfi* در یک کلاد با مقادیر تأییدی بالا (PP 1.00) قرار گرفتند. همچنین، این کلاد به سه دودمان مجزا تقسیم می‌شود که هریک ممکن است در ارتباط با زیرگونه‌های جغرافیایی مشخصی باشند. برخلاف داده‌های مولکولی صفات ریختی نمونه‌های قورباغه مردابی بلوچی جنوب ایران بیان‌کننده چندریختی گسترده از نظر شکل ظاهری است که همین امر منجر به توصیف آرایه‌های جدید یا نام‌گذاری‌های نادرست در این جنس شده است.

واژه‌های کلیدی: قورباغه مردابی بلوچی، *E. adolfi*، تبارزایی، ژن 16S میتوکندری، جنوب ایران

* مسئول مکاتبات

محمدی، زین‌العابدین، خواجه، اصغر و قربانی، فاطمه. (۱۴۰۳). بررسی روابط تبارزایی و بازنگری آرایه‌شناختی قورباغه‌های مردابی بلوچی ایران (جنس *Euphlyctis*). تاکسونومی و بیوسستماتیک، ۱۷ (۱)، ۵۷-۷۲.



مقدمه

قورباغه‌های جنس *Euphlyctis* Fitzinger, 1843 متعلق به خانواده Dicroglossidae دارای دو زیرجنس *Euphlyctis* و *Phrynoderma* است که با بیش از ده دودمان واگرا در جنوب آسیا پراکنده شده‌اند (Dubois et al., 2021; Dufresnes et al., 2022; Forest, 2024). زیرجنس *Euphlyctis* شامل چهار گونه *E. adolfi*، *E. jaladhara*، *E. ehrenbergii* و *E. cyanophlyctis* است که در سرتاسر جنوب آسیا و مناطق مجاور آن گسترش دارند (Khajeh et al., 2014; Al-Qahtani & Amer, 2019; Ali et al., 2020; Dinesh et al., 2021; Dufresnes et al., 2022). اعضای زیرجنس *Phrynoderma* شامل آرایه‌های *E. kerala*، *E. aloysii*، *E. hexadactyla*، *E. karaavali* و *E. kerala* و چند آرایه توصیف نشده است که در جنوب هند، بنگلادش و سری‌لانکا پراکنش دارند (Dinesh et al., 2021, 2022; Dufresnes et al., 2022).

با ظهور روش‌های نوین و استفاده از داده‌های مولکولی، آرایه‌شناسی و تبارزایی آرایه‌های جنس *Euphlyctis* به‌ویژه قورباغه‌های مردابی بلوچی ایران بازنگری شده است. تا همین اواخر بیشتر دودمان‌های این جنس به دلیل شباهت‌های ریختی تنها در دو گروه گونه‌ای *E. cyanophlyctis* و *E. hexadactyla* (Lesson, 1834) طبقه‌بندی می‌شدند (Alam et al., 2008; Khajeh et al., 2014; Howlader et al., 2015; Al-Qahtani & Amer, 2019). اما استفاده از داده‌های مولکولی به‌ویژه ژن 16S rRNA میتوکندری تعداد زیادی نمونه، دودمان‌ها و کلادهای جدیدی در این دو گروه گونه‌ای نمایان کرد که منجر به تغییرات گسترده در آرایه‌شناسی و تبارزایی این جنس شد (Joshy et al., 2009; Howlader et al., 2022; Dufresnes et al., 2021, 2022; al., 2015). به‌طوری که تعداد گونه‌های این جنس از پنج گونه به بیش از هشت گونه افزایش یافت (Dufresnes et al., 2022; Frost, 2024).

قورباغه مردابی بلوچی در جنوب ایران در استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان پراکنش دارد و پیش از این براساس داده‌های ریختی و مولکولی در گروه گونه‌ای *E. cyanophlyctis* (Schneider, 1799) قرار می‌گرفت (Rastegar-Pouyani et al., 2008; Khajeh et al., 2014). اما داده‌های مولکولی اخیر با استفاده از تعداد زیادی نمونه (۲۸۶ نمونه) تقریباً از تمام دامنه پراکنش گونه، این گروه گونه‌ای را به چند دودمان مجزا تقسیم کرده و مطابق آن قورباغه‌های مردابی بلوچی ایران در دودمانی با عنوان *E. adolfi* (Günther, 1860) قرار گرفته‌اند (Dufresnes et al., 2022). قورباغه‌های مردابی بلوچی ایران هاپلوگروهی با نمونه‌هایی از پاکستان و شمال غرب هند تشکیل می‌دهند که براساس تحلیل‌های ژنتیک جمعیت طی چند ده هزار سال اخیر فرایند گسترش جمعیتی را تجربه کردند (Dufresnes et al., 2022). بنابراین، استفاده از داده‌های مولکولی آرایه‌شناسی و تبارزایی قورباغه‌های مردابی بلوچی ایران را دچار تغییرات گسترده‌ای کرده است که نیازمند بررسی نمونه‌های بیشتری به‌ویژه از محل تایپ برخی زیرگونه‌های توصیفی از جنوب شرق ایران است (Khatiwada et al., 2021; Dinesh et al., 2021; Dufresnes et al., 2022).

جمعیت‌های این گونه در جنوب ایران ابتدا به‌عنوان *Rana cyanophlyctis* Boulenger, 1920 (خانواده Ranidae) در نظر گرفته شده بود (Anderson, 1963; Boulenger, 1920). سپس Nikolskii (1899) براساس اندازه پرده صماخ و طول پوزه، زیرگونه *R. cyanophlyctis seistanica* (Nikolskii, 1899) را از مرز ایران، افغانستان و پاکستان در محل تایپ یعنی نيزار سیستان در جنوب شرق ایران توصیف کرد؛ اما جمعیت‌های این گونه در جنوب ایران توسط بلوچ و کمی (۱۹۹۴) به‌عنوان

زیرگونه *Rana cyanophlyctis cyanophlyctis* توصیف شدند و زیرگونه *R. cyanophlyctis seistanica* به‌عنوان همنام متأخر این زیرگونه در نظر گرفته شد؛ اما در چک‌لیست‌های دوزیستان ایران (Safaei-Rastegar-Pouyani et al., 2008; Mahroo et al., 2015) و مطالعه مولکولی (Khajeh et al., 2014)، جمعیت‌های این گونه به‌عنوان *E. cyanophlyctis* در نظر گرفته شدند. علاوه بر این، (Khan, 1997) زیرگونه جدیدی به نام *E. c. microspinulata* Khan, 1997 از خوزدر بلوچستان (Khuzdar, Balochistan) در غرب پاکستان توصیف کرد که با توجه به حضور *E. adolfi* در شمال و جنوب بلوچستان (Dufresnes et al., 2022) احتمال همانمی این زیرگونه با سایر آرایه‌های آن وجود دارد.

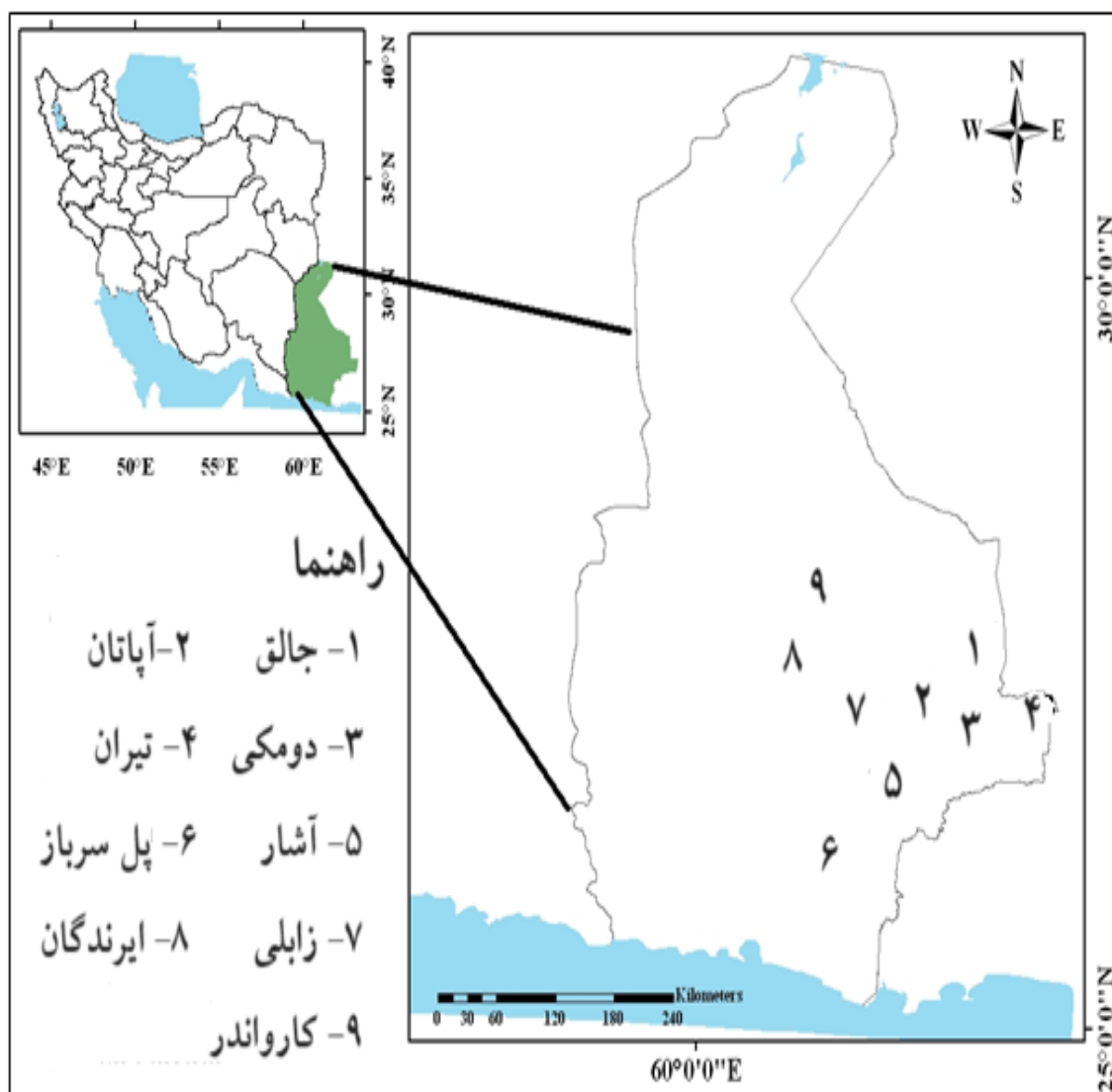
نتایج (Khajeh et al., 2014) براساس داده‌های ژن 16S میتوکندری ۳۲ نمونه بیان‌کننده و اگرایی بسیار جزئی جمعیت‌های این گونه در جنوب‌شرق ایران بوده‌اند که دودمانی مجزا به‌عنوان گروه خوهری دودمان بنگلادش در گروه گونه‌ای *E. cyanophlyctis* تشکیل دادند. همچنین، مطالعه (Dufresnes et al., 2022) با استفاده از داده‌های ریختی و مولکولی نشان داد جمعیت‌های ایران در زیرجنس *Euphlyctis* و به گونه *E. adolfi* تعلق دارند و از نظر ژنتیکی از نمونه‌های تایپ *E. cyanophlyctis* متمایز هستند. (Dinesh et al., 2021) براساس صفات ریختی و مولکولی *E. adolfi* *E. cyanophlyctis seistanica* را به‌عنوان گونه مجزا در نظر گرفته است و آرایه Howlader, 1955 *E. kalasgramensis* را براساس قانون حق تقدم با آن همنام کردند. با این حال، درباره اعتبار آرایه‌شناختی هر دو آرایه *E. a. (cyanophlyctis) seistanica* و *E. a. (cyanophlyctis) microspinulata* هنوز تردید وجود دارد و به مطالعه نمونه‌هایی از محل تایپ این دو نیاز است.

قورباغه مردابی بلوچی در جنوب‌شرق ایران در دریاچه هامون، سدها و برکه‌های محلی یافت می‌شود. بسیاری از برکه‌های این منطقه به‌صورت فصلی به‌دنبال باران‌های فصلی و رهاسازی آب در رودخانه هلمند آبرگیری می‌شوند. در این ناحیه میزان بارندگی، کم و تفاوت درجه حرارت شب و روز بسیار بالا است (Mohammadi et al., 2015; Mohaymeni et al., 2022)؛ از این رو، زمین‌های خشک این منطقه عمدتاً توسط رودخانه هلمند و دریاچه هامون آبیاری می‌شوند (Whitney, 2006). با این حال، طی سال‌های اخیر به‌دلیل میزان بارندگی اندک و جلوگیری دولت افغانستان از ورود آب به رودخانه هلمند، تعداد و تنوع دوزیستان این منطقه به شدت کاهش یافته است (Mohammadi et al., 2015) و تنها در برخی زیستگاه‌ها با آب مداوم مانند مناطقی از رود هلمند جمعیت‌هایی از قورباغه مردابی بلوچی یافت می‌شود (Khajeh et al., 2014)؛ از این رو، طی این مطالعه با توجه به تغییرات آرایه‌شناختی گسترده جنس *Euphlyctis* و نیز تغییرات اقلیمی درخور توجه در جنوب‌شرق ایران، وضعیت آرایه‌شناسی و تبارزایی جمعیت‌های قورباغه بلوچی با استفاده از داده‌های ژن 16S rRNA میتوکندری بازنگری شده است. علاوه بر این ویژگی‌های ریختی و تغییرات دامنه پراکنش این گونه در جنوب‌شرق ایران در پاسخ به خشکسالی‌های اخیر بررسی شده‌اند.

مواد و روش‌ها

طی این تحقیق ۴۵ نمونه قورباغه بلوچی از ۹ منطقه مختلف در جنوب‌شرق ایران با استفاده از دست و تور دستی جمع‌آوری شدند (جدول ۱ و شکل ۱). انتخاب مناطق نمونه‌برداری مطابق شرایط اقلیمی منطقه یعنی وجود رودخانه، برکه و باتلاق صورت گرفت. نمونه‌ها براساس صفات ریختی مطابق منابع قابل دسترس شناسایی شدند (Baluch &

(Kami, 1995; Khan, 1997; Safaci-Mahroo et al., 2023) و از نظر ویژگی‌هایی مانند رنگ بدن، شکل خال‌های پشتی و شکمی و وجود پرده میان انگشتان پا بررسی شدند. سپس از ماهیچه ران آنها نمونه بافتی تهیه شد و برای مطالعات مولکولی داخل اتانول ۹۶ درصد قرار داده شدند. تمام نمونه‌ها و بافت‌ها در آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه سراوان نگهداری می‌شوند. برای مطالعه نمونه‌های جمع‌آوری‌شده، کد اخلاق از مدیریت پژوهشی مجتمع عالی سراوان به شماره IR.Saravan.Com.1390.031 دریافت شد.



شکل ۱: نقشه مناطق نمونه‌برداری قورباغه بلوچی در جنوب شرق ایران

Fig 1. Sampling map of the skittering frogs in the southeast Iran

جدول ۱: مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری قورباغه مردابی بلوچی و تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنوب شرق ایران طی این مطالعه

Table 1. Localities information of the sampled skittering frogs and the number of collecting specimens from southeast Iran

شماره	شماره روی نقشه	ایستگاه‌های نمونه‌برداری		تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده	ارتفاع از سطح دریا	اطلاعات GPS	
		شهر	ناحیه			عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱	۱	سراوان	جالق	۴	۸۶۳	27° 60'	62° 71'
۲	۲	سراوان	سد آپاتان	۵	۱۱۷۰	27° 36'	62° 32'
۳	۳	سراوان	دومکی	۵	۱۲۳۹	27° 85'	60° 76'
۴	۴	سراوان	تیران	۵	۱۲۱۳	27° 31'	62° 40'
۵	۵	آشار	رودخانه آشار	۶	۱۱۲۸	26° 60'	61° 72'
۶	۶	سرباز	سد سرباز	۵	۸۲۵	26° 64'	61° 25'
۷	۷	مهرستان	قنات زابلی	۵	۱۳۲۶	27° 12'	61° 68'
۸	۸	ایرانشهر	ایرندگان	۵	۵۶۳	27° 19'	60° 69'
۹	۹	ایرانشهر	کارواندر	۵	۱۳۹۸	27° 85'	60° 76'

استخراج DNA و PCR

از ۴۵ نمونه جمع‌آوری شده، ۳۲ نمونه مطابق ویژگی‌های ریختی برای مطالعات مولکولی انتخاب شدند. استخراج DNA از بافت ماهیچه‌ای به روش نمکی طبق دستورالعمل فنول - کلروفرم (phenol/chloroform) صورت گرفت (Sambrook et al., 1989). صحت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز سنجیده شد و نمونه‌هایی با غلظت DNA بالاتر از ۵۰ نانوگرم / میکرولیتر استفاده شدند. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از آغازگر جلو رونده (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' و 16SL) و آغازگر معکوس (5'-16SH) (Palumbi (1991) مطابق پروتوکول برای تکثیر ژن 16S rRNA (CCGGTCTGAACTCAGATCACG-3') مثبت برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. تعیین توالی با استفاده از دستگاه ABI Prism 3700 صورت گرفت که در بانک ژن با شماره‌های KF992800 تا KF992833 در دسترس هستند (جدول ۲).

جدول ۲: اطلاعات بانک ژنی نمونه‌های بررسی شده از ایران مربوط به مطالعه (Khajeh et al., 2014) و (Dufresnes et al., 2022).

Table 2. GenBank accession numbers of specimens sampled from Iran and used in this study

منبع	شماره دسترسی	تعداد نمونه	ایستگاه‌های نمونه‌برداری	
			منطقه	استان
Khajeh et al., 2014	KF992821- KF992822-KF992823	۳	ایرندگان	سیستان و بلوچستان
	KF992809- KF992810-KF992811	۳	جالق	
	KF992800-KF992801- KF992802- KF992803- KF992804- KF992805	۶	آپاتان	
	KF992829- KF992830-KF992831	۳	زابلی	
	KF992827 - KF992828	۲	آشار	
	KF992824- KF992825-KF992826	۳	سرباز	
	KF992806- KF992807-KF992808	۳	دومکی	
	KF992812- KF992813- KF992814- KF992815- KF992816-KF992817	۶	تیران	
	KF992818- KF992819- KF992820	۳	کارواندر	
Dufresnes et al., 2022	ON818939-ON818940-ON818941- ON818942-ON818948	۵	میناب	هرمزگان

تحلیل‌های تبارزایی

ابتدا توالی‌های ژن 16S میتوکندری این مطالعه با استفاده از برنامه Clustal W (Thompson et al., 1994) در نرم‌افزار Bioedit v.7.0.9 ویرایش شدند (Hall, 1999). سپس ۲۸۴ توالی مربوط به جنس *Euphlyctis* از بانک ژن، دریافت و به توالی‌های این مطالعه اضافه شدند. در مجموع، ۳۱۶ توالی (۳۲ توالی این مطالعه + ۲۸۴ توالی از بانک ژن) با نرم‌افزار Bioedit هم‌تراز شدند و سپس فایل نکسوس این ۳۱۶ توالی به اضافه دو توالی *Hoplobatrachus tigerinus* (AB272594) و *Fejervarya cancrivorus* (AB070738) به‌عنوان برون‌گروه با استفاده از نرم‌افزار Mega v.11 (Tamura et al., 2021) ساخته شد. از نرم‌افزار jModelTest (Darriba et al., 2012) برای انتخاب بهترین مدل تکاملی مولکولی استفاده شد که براساس معیار Bayesian Information Criterion (BIC) (Schwarz, 1978) مدل تکاملی GTR+I+G انتخاب شد.

در نهایت، فایل XML داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار BEAUti با استفاده از مدل relaxed log-normal در بسته نرم‌افزاری BEAST v.2.2.1 (Bouckaert et al., 2014) ساخته شد و تحلیل تبارزادی به روش بیزین Bayesian inference (BI) برای این ۳۱۸ توالی توسط نرم‌افزار BEAST صورت گرفت. تحلیل بیزین با ۱۰۰ میلیون تکرار با استفاده از روش Markov Chain Monte Carlo (MCMC) اجرا شد و از هر ۵۰۰۰ تکرار پارامترها و توپولوژی درخت مولکولی نمونه‌برداری شدند. سپس ۲۵ درصد اول درختان مولکولی برای افزایش اطمینان به‌عنوان درخت‌های بی‌اعتبار به‌عنوان Burn-in کنار گذاشته شدند. از درخت‌های باقی‌مانده درخت اجماع با مقادیر تأییدی بیش از ۷۰ درصد و بیشترین میانگین توسط نرم‌افزار TreeAnnotator v.2.2.1 محاسبه شد؛ درخت با نرم‌افزار Figtree v1.4.3 ترسیم شد (Rambaut, 2016). این تحلیل‌ها در وبگاه CIPRES Science Gateway انجام شدند (Miller et al.,

(2010). همچنین، فاصله ژنتیکی ناشی از جهش و تغییر نوکلئوتیدی درون و بین دودمان‌ها توسط مدل تکاملی p-distance در نرم‌افزار Mega محاسبه شد (Kimura, 1980).

نتایج

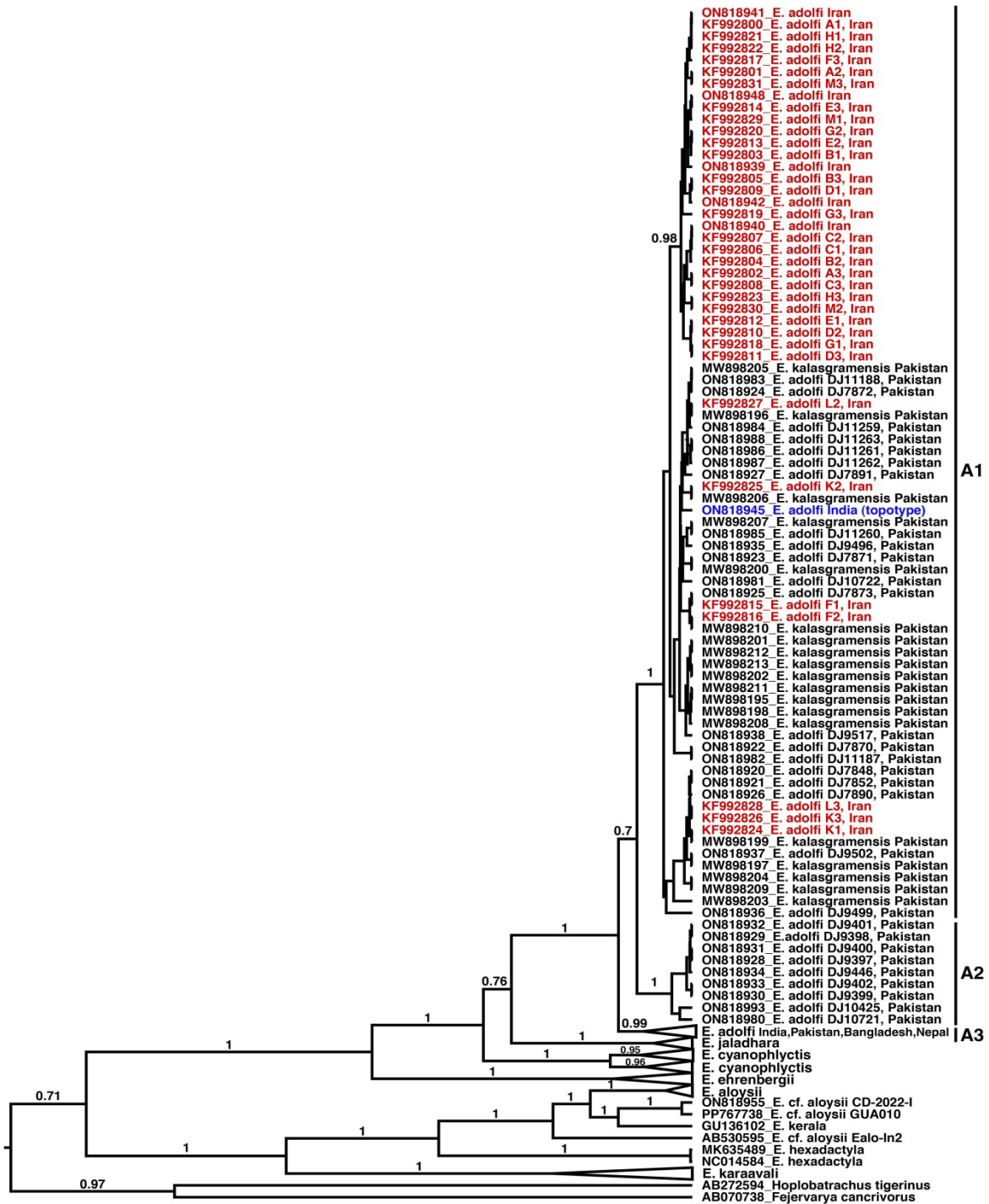
مولکولی

تحلیل تبارزایی به روش بیزین براساس ۴۹۲ جفت‌باز از ژن 16S rRNA میتوکندری برای ۳۱۶ توالی از جنس *Euphlyctis* صورت گرفت. درخت مولکولی بیزین نشان داد این ۳۱۶ توالی در ۱۳ کلاد و زیر کلاد قرار می‌گیرند (شکل ۲) که برخی از آنها در ارتباط با دودمان‌های جدیدی هستند که نیاز به توصیف یا بازنگری دارند. براساس این داده‌ها کلاد A نمونه‌هایی از ایران (هرمزگان و سیستان و بلوچستان)، پاکستان، هند، بنگلادش و نپال را شامل می‌شود که با مقدار تأییدی بسیار بالا حمایت می‌شود (PP 1.00). این کلاد به سه زیر کلاد شامل A1، A2 و A3 تقسیم می‌شود که در زیر کلاد A1 نمونه‌های ایران همراه با پاکستان و شمال غرب هند با مقادیر تأییدی بالا (PP 1.00) قرار می‌گیرند. در زیر کلاد A2 نمونه‌هایی از پاکستان و در زیر کلاد A3 نمونه‌هایی از پاکستان، هند، بنگلادش و نپال قرار می‌گیرند که با مقادیر تأییدی بالا (PP ≥ 0.99) حمایت می‌شوند. با این حال، رابطه نزدیک زیر کلاد A1 و A2 با مقادیر تأییدی حمایت نمی‌شود (PP 0.70)؛ اما رابطه خوهری زیر کلادهای A1 و A2 با A3 به طور کامل حمایت می‌شود (PP 1.00). همچنین کلاد A با کلاد حاوی نمونه‌های *E. jaladhara* از هند با مقادیر تأییدی متوسط (PP 0.76) کلاد خوهری تشکیل می‌دهد. علاوه بر این، فاصله ژنتیکی براساس مدل p-distance بین دودمان‌های کلاد A نشان داد فاصله مولکولی دودمان A1 شامل نمونه‌های قورباغه‌های بلوچی ایران با A2 ۱/۶ درصد و با A3 ۱/۴ درصد است. همچنین، فاصله ژنتیکی درون دودمان‌ها بین ۰/۲ و ۰/۳ درصد بود (جدول ۳).

جدول ۳: فاصله مولکولی درون و بین دودمان‌های کلاد A براساس ۴۹۲ جفت‌باز از ژن 16S میتوکندری با استفاده از مدل p-distance و اگرایی درون دودمان‌ها به صورت ضخیم نشان داده شده است.

Table 3. Intra- interspecific genetic distances between populations of clade A using 492 bp of mitochondrial 16S rRNA gene by p-distance. Within group divergences shows in bold

Lineage	A1	A2	A3
A1	0.2	-	-
A2	1.6	0.2	-
A3	1.4	1.6	0.3



شکل ۲: درخت تبارزایی قورباغه‌های جنس *Euphlyctis* در جنوب آسیا با استفاده از ۴۹۲ جفت‌باز از ژن 16S میتوکندری براساس روش بی‌زین. مقادیر روی کلادها و زیرکلادها اعتبار و مقادیر تأییدی دودمان‌ها را نشان می‌دهد. براساس این، نمونه‌های ایران از هرمزگان و سیستان و بلوچستان (رنگ قرمز) در زیرکلاد A1 با مقادیر تأییدی بالا قرار گرفتند. همچنین، در این زیرکلاد نمونه‌ای از آرایه *E. adolfi* از محدوده نزدیک به محل تایپ (رنگ آبی) همراه با نمونه‌هایی از پاکستان قرار دارد.

Fig 2. Phylogenetic tree related to the genus *Euphlyctis* in South Asia using 492 bp of mitochondrial 16S rRNA gene by Bayesian method. The values on the branches show posterior probability. The specimens from Hormozgan and Sistan & Baluchestan, Iran (red color) grouped in the sub-clade A1 with high posterior probability accompanied with *E. adolfi* specimens from the near type locality (blue color) as well as Pakistan specimens

ریختی

بررسی شکل ظاهری نمونه‌های قورباغه بلوچی از مناطق مختلف جنوب ایران برخلاف نتایج مولکولی نشان داد این نمونه‌ها از نظر رنگ بدن و شکل خال‌های شکمی و پشتی دارای تغییرات زیادی هستند و از نظر صفات ظاهری چندریختی زیادی را نشان می‌دهند (شکل ۳). رنگ سطح پشتی بدن از زیتونی روشن تا قهوه‌ای تیره و رنگ سطح شکمی از شیری تا زرد متغیر بود. قورباغه‌های بلوچی از نظر خال‌های پشتی و شکمی نیز تغییرات زیادی را نشان می‌دهند؛ به طوری که در برخی این خال‌ها بسیار ریز، در برخی دیگر درشت و حتی برخی فاقد خال بودند.



شکل ۳: تصاویری از سطوح پشتی و شکمی قورباغه مردابی بلوچی. شماره‌های ۱ و ۳ از قنات زابلی و شماره‌های ۲ و ۴ از برکه زیارت در روستای احمدی، شرق سراوان

Fig 3. Dorsal and ventral views of skittering frogs in the southeast Iran. Numbers 1 and 3 from Ghanat Zaboli and Numbers 3 and 4 from Amadi village in eastern Saravan

بحث

مطالعه و شناسایی گونه‌های هم‌ریخت یا دارای تفاوت‌های ریختی اندک (نهان گونه‌ها)، به کمک روش‌های مولکولی به یک مهم در مطالعات تنوع زیستی تبدیل شده است (Dinesh et al., 2022). در واقع، استفاده از داده‌های مولکولی منجر به بازنگری گسترده بسیاری از همتافت گونه‌های دوزیستان شده است و به موجب آن بسیاری از آرایه‌ها یا همانم شده‌اند یا آرایه‌شناسی آنها تغییر یافته است (Freilich et al., 2014; Wielstra et al., 2018; Scherz et al., 2019; Dinesh et al., 2022; Dufresnes et al., 2022). از همتافت گونه‌هایی با دامنه پراکنش گسترده در جنوب و جنوب شرق آسیا است که آرایه‌شناسی آن اخیراً دچار تغییرات گسترده‌ای شده است. مطابق نتایج پژوهش حاضر و مطالعه (Dufresnes et al., 2022) نمونه‌های این همتافت گونه از ایران، پاکستان، هند، بنگلادش و نپال با استفاده از داده‌های ژن 16S میتوکندری به بیش از ۱۳ دودمان واگرا با مقادیر تأییدی نسبتاً بالا تقسیم می‌شود که هریک می‌تواند به‌عنوان گونه یا زیرگونه مجزایی در نظر گرفته شود؛ با این حال، برای تأیید این موضوع نیاز به داده‌های بیشتری از جمله مطالعه آرایه‌شناسی و تبارزایی آنها با استفاده از ژن‌های هسته‌ای و توالی ژنوم کامل است.

نمونه‌های قورباغه بلوچی جنوب ایران همراه با نمونه‌های پاکستان، هند، نپال و بنگلادش در کلاد A قرار می‌گیرد که با توجه به قانون حق تقدم و حضور توپوتایپ‌های *E. adolfi* در این کلاد به‌عنوان این گونه در نظر گرفته می‌شود؛ از این رو، نمونه‌های ایران به *E. adolfi* تعلق دارند و حضور *E. cyanophlyctis* در ایران باید بررسی شود. با وجود این، دو گونه *E. cyanophlyctis* و *E. adolfi* از نظر صفات ریختی و اندازشی بسیار شبیه به هم بوده‌اند و از همدیگر تفکیک پذیر نیستند (Dufresnes et al., 2022). هرچند تفاوت‌هایی از نظر خال‌های شکمی و الگوهای رنگ پشت بدن و نیز اندازه بدن برای تفکیک این دو گونه ارائه شده است (Howlader et al., 2015)؛ اما بررسی نمونه‌های این مطالعه بیان‌کننده چندریختی گسترده از نظر رنگ بین مناطق مختلف است؛ از این رو، مقایسه این دو با استفاده از نمونه‌های محدود، با توجه به تغییرات گسترده رنگ و خال‌های بدن، معیار خوبی برای شناسایی و مقایسه این گونه‌های خویشاوند نیست.

واگرایی کلاد A به سه زیرکلاد A1، A2 و A3 با فاصله ژنتیکی حدود ۱/۴ تا ۱/۶ درصد نشان می‌دهد می‌توان هریک از این زیرکلادها را به زیرگونه‌های توصیفی از دامنه پراکنش آنها اختصاص داد. در زیرکلاد A1 نمونه‌های جنوب ایران همراه با نمونه‌هایی از جنوب و مرکز پاکستان قرار دارند که تاکنون دو زیرگونه *E. a seistanica* (Nikolskii, 1899) از نزار هامون صابوری در شمال سیستان ایران و زیرگونه Khan, 1997 *E. a. microspinulata* از خوزدر در جنوب بلوچستان پاکستان توصیف شده است. با توجه به اینکه فاصله نزار هامون صابوری تا نزدیک‌ترین منطقه نمونه‌برداری در این مطالعه، یعنی کارواندر خاش، حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ کیلومتر است، می‌توان این زیرکلاد را تحت *E. a seistanica* (Nikolskii, 1899) در نظر گرفت و با توجه به قانون حق تقدم زیرگونه *E. a. microspinulata* (Khan, 1997) را به‌عنوان همانم مؤخر آن در نظر گرفت. علاوه بر این، شباهت جمعیت‌های قورباغه مردابی بلوچی جنوب ایران از نظر صفات اندازشی و مولکولی (Khajeh et al., 2014) نیز از این پیشنهاد حمایت می‌کند. با این حال، طی سال‌های اخیر هامون صابوری به شدت خشک شده است (Mohammadi et al., 2015) و با توجه به مراجعه چندباره نویسندگان این پژوهش به این منطقه قورباغه‌ای در آن یافت نشد. گرچه برای تشخیص دقیق وضعیت آرایه‌شناختی این زیرگونه نیاز به مطالعه مولکولی نمونه تایپ یا نمونه‌های پاراتایپ است.

به نظر می‌رسد خشکسالی‌های گسترده و پیامد آن، ایجاد دشت‌های خشک و لم‌یزرع در دوره نئوژن (Whitney, 2006) به‌عنوان یک مانع جغرافیایی عمل کرده‌اند و سبب جدایی و واگرایی دودمان‌های این گونه در حوضه هلمند از دودمان‌های شبه‌قاره هند شده‌اند (Khajeh et al., 2014; Dinesh et al., 2021). همین مسئله در واگرایی دودمان‌های جنس *Laudakia* و هم‌تافت گونه *Eremias persica* نیز تأثیر گذاشته است (Rastegar Pouyani et al., 2010). خشکسالی‌های اخیر منطقه سبب شده‌اند جمعیت‌های قورباغه بلوچی در جنوب ایران، به‌ویژه در شمال استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان، به شدت کاهش یابند یا به‌طور کل ناپدید شوند.

تقدیر و تشکر

هزینه این طرح از محل اعتبارات حوزه پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان به شماره طرح ۸۹۰۱۳ تأمین شده است.

References

- Alam, M. S., Igawa, T., Khan, M. M. R., Islam, M. M., Kuramoto, M., Matsui, M., Kurabayashi, A., & Sumida, M. (2008). Genetic divergence and evolutionary relationships in six species of genera *Hoplobatrachus* and *Euphlyctis* (Amphibia: Anura) from Bangladesh and other Asian countries revealed by mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2), 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.04.020>
- Ali, W., Javid, A., Hussain, A., Hafeez-Ur-Rehman, M., Chabber, A.L., & Hemmatzadeh, F. (2020). First record of *Euphlyctis kalasgramensis* (Anura: Dicroglossidae) from Punjab, Pakistan. *Mitochondrial DNA. Part B*, 5(2), 1227–1231. <https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1731337>
- Al-Qahtani, A. R., & Amer, S. A. M. (2019). First molecular identification of *Euphlyctis ehrenbergii* (Anura: Amphibia) inhabiting southwestern Saudi Arabia. *The European Zoological Journal*, 86(1), 173–179. <https://doi.org/10.1080/24750263.2019.1609104>
- Anderson, S. C. (1963). Amphibians and Reptiles from Iran. *Proceedings of the California Academy of Sciences, Series*, 431(16), 417–498. <https://biostor.org/reference/3116>
- Baluch, M., & Kami, H. G. (1995). *Amphibians of Iran* (2nd ed.). Tehran University Press. [In Persian].
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Boulenger, G. A. (1920). A monograph of the South Asian, Papuan, Melanesian and Australian frogs of the genus *Rana*. *Records of the Indian Museum*, 20, 1–226. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.12471>
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dinesh, K. P., Channakeshavamurthy, B. H., Deepak, P., Ghosh, A., & Deuti, K. (2021). Morphological groupings within *Euphlyctis* (Anura: Dicroglossidae) and description of a new species from the surroundings of Thattekad Bird Sanctuary, Kerala, India. *Zootaxa*, 4990(2), 329–353. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4990.2.7>
- Dinesh, K. P., Channakeshavamurthy, B. H., Deepak, P., Shabnam, A., Ghosh, A., & Deuti, K. (2022). Discovery of a new species of *Euphlyctis* (Anura: Dicroglossidae) from the western coastal plains of peninsular India. *Zootaxa*, 5100(3), 419–434. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5100.3.6>

- Dubois, A., Ohler, A., & Pyron, A. (2021). New concepts and methods for phylogenetic taxonomy and nomenclature in zoology, exemplified by a new ranked cladonomy of recent amphibians (Lissamphibia). *Megataxa*, 5(1), 738. <https://doi.org/10.11646/megataxa.5.1.1>
- Dufresnes, C., Mahony, S., Prasad, V.K., Kamei, R.G., Masroor, R., Khan, M.A., Al-Johany, A.M., Gautam, K.B., Gupta, S.K., Borkin, L.J., & Melnikov, D.A. (2022). Shedding light on taxonomic chaos: Diversity and distribution of South Asian skipper frogs (Anura, Dicroglossidae, *Euphlyctis*). *Systematics and Biodiversity*, 20(1), 1-25. <https://doi.org/10.1080/14772000.2022.2102686>
- Freilich, X., Tollis, M., & Boissinot, S. (2014). Hiding in the highlands: Evolution of a frog species complex of the genus *Ptychadena* in the Ethiopian highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71, 157-169. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.11.015>
- Frost, D. R. (2024). *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.2 (Date of access). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php> American Museum of Natural History, New York, USA. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98. <https://B2n.ir/j68644>
- Howlader, M. S. A., Nair, A., Gopalan, S. V., & Merila, J. (2015). A new species of *Euphlyctis* (Anura: Dicroglossidae) from Barisal, Bangladesh. *Plos One*, 10(2), Article e0116666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116666>
- Joshy, S. H., Alam, M. S., Kurabayashi, A., Sumida, M., & Kuramoto, M. (2009). Two new species of the genus *Euphlyctis* (Anura, Ranidae) from southwestern India, revealed by molecular and morphological comparisons. *Alytes*, 26, 97-116. <https://B2n.ir/b35089>
- Khajeh, A., Mohammadi, Z., Ghorbani, F., Meshkani, J., Pouyani, E. R., & Torkamanzehi, A. (2014). New insights into the taxonomy of the skittering frog *Euphlyctis cyanophlyctis* complex (Schneider, 1799) (Amphibia: Dicroglossidae) based on mitochondrial 16S rRNA gene sequences in southern Asia. *Acta Herpetologica*, 9, 159-166. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-14013
- Khan, M. S. (1997). A new subspecies of Common Skittering Frog, *Euphlyctis cyanophlyctis* (Schneider, 1799) from Balochistan, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 29, 107-112. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:89181884>
- Khatiwada, J. R., Wang, B., Zhao, T., Xie, F., & Jiang, J. (2021). An integrative taxonomy of amphibians of Nepal: an updated status and distribution. *Asian Herpetological Research*, 12, 1-35. <https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.200050>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 15, 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees*. In 2010 gateway computing environments workshop (GCE) (pp. 1-8). Ieee. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Mohammadi, Z., Khajeh, A., Ghorbani, F., & Kami, H. G. (2015) A biosystematic study of new records of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) from southeast of Iran. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 8, 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2015.04.001>
- Mohaymeni, F., Nikcheg, K., Kami, H. G., & Mohammadi, Z. (2022) Morphological and morphometric

- variations of the water frogs (genus *Pelophylax*) in Iran. *Journal of Wildlife and Biodiversity*, 6(3), 54–71. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6826803>
- Nikolskii, A. M. (1899). Reptiles, fishes, and Amphibia of the second expedition of N. A. Zarudni to Persia in 1898. *Annuaire du Musee Zoologique de l'Academie Imperiale des Sciences de St. Petersbourg*, 4(172–178), pp 375–417.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., & Grabowski, G. (1991). The simple fool's guide to PCR, version 2.0. *University of Hawaii, Honolulu*, 45, 26-28. https://stacks.stanford.edu/file/druid:yh393jm6703/Simple_Fool%27s_Master%20PCR.pdf
- Rambaut, A. (2016). *FigTree* (version 1.4.3). <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Rastegar Pouyani, E., Rastegar Pouyani, N., Nouredini, S. K., Joger, U., & Wink, M. (2010). Molecular phylogeny of the *Eremias persica* complex of the Iranian plateau (Reptilia: Lacertidae), based on mtDNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 158(3), 641-660. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2009.00553.x>
- Rastegar Pouyani, N., Kami, H. G., Rajabzadeh, M., Shafiei, S., & Anderson, S. C. (2008). Annotated Checklist of Amphibians and Reptiles of Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 4(1), 7-30. <https://doi.org/10.22067/IJAB.V4I0.9166>
- 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. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5279.1.1>
- Safaei-Mahroo, B., Ghaffari, H., Fahimi, H., Broomand, S., Yazdani, M., Najafi-Majid, E., Hosseinian Yousefkhani, S. S., Rezazadeh, E., Hosseinzadeh, M. S., Nasrabadi, R., & Rajabzadeh, M. (2015). The herpetofauna of Iran: checklist of taxonomy, distribution and conservation status. *Asian Herpetological Research*, 6(4), 257-290. <https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.140062>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY. <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>
- Scherz, M. D., Glaw, F., Hutter, C. R., Bletz, M. C., Rakotoarison, A., Köhler, J., & Vences, M. (2019). Species complexes and the importance of Data Deficient classification in Red List assessments: The case of *Hylobatrachus* frogs. *PloS One*, 14(8), e0219437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219437>
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6, 461-464. <https://doi.org/10.1214/aos/1176344136>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38, 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Whitney, J. W. (2006). Geology, water, and wind in the lower Helmand Basin, Southern Afghanistan. *US Geological Survey Scientific Investigation Report*, 5182, 1-40.

https://pubs.usgs.gov/sir/2006/5182/pdf/SIR06-5182_508.pdf

Wielstra, B., Canestrelli, D., Cvijanović, M., Denoël, M., Fijarczyk, A., Jablonski, D., Liana, M., Naumov, B., Olgun, K., Pabijan, M., & Pezzarossa, A. (2018). The distributions of the six species constituting the smooth newt species complex (*Lissotriton vulgaris* sensu lato and *L. montandoni*)—an addition to the New Atlas of Amphibians and Reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia*, 39(2), 252-259. <https://doi.org/10.1163/15685381-17000128>