

## تبارزایی خفاش‌های دم موشی جنس *Rhinopoma* (خانواده Rhinopomatidae) در ایران براساس ژن D-loop

• **وحید اکملی\***: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

### چکیده

خفاش‌های دم موشی جنس *Rhinopoma* به‌عنوان قدیمی‌ترین کلاد خردخفاشان زنده محسوب می‌شوند. گونه‌های این جنس در نواحی گرم استوایی یا نیمه‌استوایی دنیای قدیم، شمال و غرب آفریقا، خاورمیانه، لوانت، عراق، ایران، پاکستان، افغانستان، هندوستان، تایلند و سوماترا ساکن هستند. برای بررسی روابط تبارشناسی اعضای این جنس از ژن D-Loop استفاده شد. در این مطالعه ۳۶ نمونه از مناطق مختلف جمع‌آوری و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. بعد از تکثیر قطعه مورد نظر و توالی‌یابی، هم‌ردیفی انجام شد و توالی به طول ۵۷۷ نوکلئوتید به‌دست آمد. میانگین ترکیب نوکلئوتیدهای A، C، T و G، به ترتیب برابر ۲۳/۳۵٪، ۱۶/۲۴٪، ۶۰/۲۸٪ و ۱/۱۲٪ بود. از تعداد ۵۷۷ جایگاه، ۱۶۸ جایگاه متغیر که ۱۴۸ جایگاه از نظر پارسیمونی حاوی باراطلاعاتی (parsimony informative) بود. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه وجود سه گونه *R. microphyllum*، *R. hardwickei* و *R. muscatellum* در ایران را تایید نمود. هم‌چنین مطالعه تبارزایی سه گونه جنس *Rhinopoma* نشان داد که *R. muscatellum* و *R. microphyllum* تاکسون‌های خوهری می‌باشند که این حالت با رابطه *R. hardwickei* و *R. muscatellum* که براساس تشابه اندازه بدن و مورفولوژی بینی به‌عنوان نزدیک‌ترین تاکسون‌ها به هم در نظر گرفته می‌شوند، در تناقض است.

**کلمات کلیدی:** خردخفاش، تبارزایی، خفاش دم موشی، پژواک جابایی، ژن ناحیه کنترل



## مقدمه

گروه‌های فیلوجغرافیایی درون یک گونه استفاده می‌شود، بلکه در مطالعات  
تبارزایی گونه‌های نزدیک نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Xu و همکاران،  
۲۰۱۰؛ Matson و Baker، ۲۰۱۰؛ Fleming و Wilkinson، ۱۹۹۶).



الف



ب



ج

شکل ۱: تصویر خفاش‌های دم موشی را نشان می‌دهد:  
الف: خفاش دم‌موشی بزرگ (*Rhinopoma microphyllum*)،  
ب: خفاش دم‌موشی کوچک (*Rhinopoma hardwickei*) و  
ج: خفاش دم‌موشی مسقطی (*Rhinopoma muscatellum*)

## مواد و روش‌ها

به‌طور کلی در این مطالعه ۳۶ نمونه خفاش دم موشی گونه‌های  
*R. microphyllum*، *R. hardwickei*، *R. muscatellum* و *R. cystops* از  
مناطق مختلف جمع‌آوری و برای تعیین روابط فیلوژنتیک استفاده شد

خفاش‌ها به‌عنوان پستانداران پرنده، دومین راسته‌بزرگ بعد از جوندگان  
می‌باشند. این گروه به‌خاطر داشتن قدرت پرواز و پژواک جابایی  
(Echolocation) دارای تنوع گسترده‌ای می‌باشند به‌طوری‌که تاکنون بیش  
از ۱۳۰۰ گونه شناسایی شده است (Wetterer و Simmons، ۲۰۱۰؛  
Reeder و همکاران، ۲۰۰۷؛ Simmons، ۲۰۰۵). خانواده خفاش‌های  
دم‌موشی (*Rhinopomatidae*) اغلب به‌عنوان قدیمی‌ترین کلاد  
خردخفاش‌های زنده در نظر گرفته می‌شوند (Hulva و همکاران، ۲۰۰۷)  
که در سال ۱۸۷۲ توسط Dobson معرفی شد. در این خفاش‌ها دم  
بسیار طویل و استوانه‌ای است. پرده‌ی میان‌رانی کوچک و کم‌تر از  
یک‌سوم قاعده دم را در بر می‌گیرد و باقی‌مانده دم آزاد است. این  
خفاش‌ها در غارها، شکاف‌های سنگی، دیوارها و خانه‌ها به‌صورت  
گروهی به‌سر می‌برند. استقرار خفاش‌های دم‌موشی روی دیواره غارها  
از طریق استفاده توأم انگشتان دست و پا می‌باشد، از این‌رو این  
خفاش‌ها از بقیه خفاش‌های حشره‌خوار متمایز هستند چراکه نمی‌توانند  
به‌طور کامل از سقف غارها آویزان شوند. گونه‌های این جنس در نواحی  
گرم استوایی یا نیمه‌استوایی دنیای قدیم، شمال و غرب آفریقا، خاورمیانه،  
لوانت، عراق، ایران، پاکستان، افغانستان، هندوستان، تایلند و سوماترا ساکن  
هستند (DeBlase، ۱۹۸۰).

این خانواده تنها دارای جنس *Rhinopoma* است که در سال  
۱۸۱۳ توسط Geoffroy معرفی شد. مدت‌ها برای این جنس، سه گونه  
(*R. microphyllum*، *R. hardwickei* و *R. muscatellum*) معرفی شده  
بود. مطالعات جامع Van Cakenberghe و De Vree (۱۹۹۴) براساس  
نمونه‌های موزه‌ای نشان داد که این جنس دارای ۴ گونه *R. microphyllum*،  
*R. hardwickei*، *R. macinnesi* و *R. muscatellum* است. Hulva و  
همکاران (۲۰۰۷)، گونه *R. cystops* (Thomas، ۱۹۰۳) که قبلاً مترادف  
*R. hardwickei* بود، براساس مطالعات مولکولی و مورفومتری، به‌عنوان  
یک گونه معتبر معرفی کردند. Benda و همکاران (۲۰۰۹)، گونه جدید  
*R. hadramauticum* را از جنوب‌شرقی یمن توصیف کردند. بنابراین اکنون  
این جنس در سرتاسر دامنه پراکنش خود در جهان دارای شش گونه  
می‌باشد (Akmali و همکاران، ۲۰۱۱). گونه‌های گزارش شده از این جنس  
در ایران شامل خفاش دم‌موشی بزرگ (*R. microphyllum*)، خفاش دم  
موشی کوچک مسقطی (*R. muscatellum*) و خفاش دم موشی کوچک  
(*R. hardwickei*) می‌باشد (شکل ۱).

در این مطالعه سعی شده است با استفاده از توالی ژن ناحیه  
کنترل یا D-Loop روابط فیلوژنتیک گونه‌های این جنس در ایران  
مورد ارزیابی قرار گیرد، زیرا این ژن شامل بخش‌های حفاظت شده و  
بخش‌های بسیار متغیر است که نه تنها در مطالعات فیلوجغرافی و جدایی

۱ میکرولیتر DNA ژنومی استخراج شده از بافت هدف و ۷/۵ میکرو لیتر آب مقطر فاقد یون بود. شرایط دمایی بهینه واکنش PCR شامل دمای واسرشت سازی اولیه (Initial denaturation)، ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، واسرشت سازی (Denaturation)، ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر (Annealing)، ۵۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها (Extension)، ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای بسط پرایمرها (Final Extension) ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بوده است. واکنش PCR، ۳۵ چرخه تکرار شد. در مرحله بعد، محصول PCR را روی ژل برده و ژل را به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم برماید رنگ آمیزی کرده و بعد از رنگ گرفتن، ژل به کمک دستگاه Gel Doc مشاهده و سپس عکس از آن تهیه شد.

(جدول ۱). نمونه برداری از خفاش‌ها با استفاده از تور دست‌ی و تور نامرئی (mistnet) انجام شد. برای این کار در زمان نمونه برداری از هر بال خفاش یک پانچ سه میلی متری تهیه و به الکل ۹۶٪ انتقال داده شدند. سپس استخراج DNA از نمونه‌های بافتی با کیت (GenNetBio™) صورت گرفت. در این تحقیق تکثیر ژن ناحیه کنترل یا D-Loop با کمک آغازگرهای D1-Pro (۵'-CCACCATCAGCACCCAAAGC-3') و DI-R1 (۵'-TACCAAAGCCATGACACCACAGTT-3') انجام شد (Akmali و همکاران، ۲۰۱۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در مخلوط واکنشی به حجم ۲۰ میکرولیتر و با Prime Taq Master Mix (Genetbio) ۲x، Cat No: G-۲۰۰۰ انجام شد که واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها،

جدول ۱: نام و تعداد گونه، مکان و موقعیت جغرافیایی نمونه‌های متعلق به جنس *Rhinopoma* در این مطالعه

| گونه  | تعداد  | مکان                                     | عرض جغرافیایی (N) | طول جغرافیایی (E) |
|---|--------|--|-------------------|-------------------|
| <i>R. microphyllum</i>                          | ۲      | دهلران - استان ایلام                     | ۳۲° ۵۵'           | ۴۷° ۳۵'           |
| <i>R. microphyllum</i><br><i>R. muscatellum</i> | ۱<br>۳ | بیشه دراز - استان ایلام                  | ۳۲° ۴۸'           | ۴۶° ۵۸'           |
| <i>R. microphyllum</i>                          | ۱      | داراب - استان فارس                       | ۲۸° ۴۵'           | ۵۴° ۳۴'           |
| <i>R. microphyllum</i>                          | ۱      | نوجیوران - استان کرمانشاه                | ۳۴° ۲۹'           | ۴۷° ۲۹'           |
| <i>R. microphyllum</i>                          | ۱      | بیستون - استان کرمانشاه                  | ۳۴° ۲۵'           | ۴۷° ۲۸'           |
| <i>R. microphyllum</i>                          | ۱      | هشیلان - استان کرمانشاه                  | ۳۴° ۳۵'           | ۴۶° ۱۵'           |
| <i>R. microphyllum</i><br><i>R. muscatellum</i> | ۱<br>۳ | دامین ایرانشهر - استان سیستان و بلوچستان | ۲۷° ۲۲'           | ۶۰° ۴۷'           |
| <i>R. microphyllum</i><br><i>R. muscatellum</i> | ۱<br>۲ | جیرفت - استان کرمان                      | ۲۸° ۵۱'           | ۵۷° ۲۷'           |
| <i>R. microphyllum</i><br><i>R. hardwickii</i>  | ۲<br>۳ | گتوند - استان خوزستان                    | ۳۲° ۱۵'           | ۴۸° ۵۰'           |
| <i>R. microphyllum</i><br><i>R. muscatellum</i> | ۱<br>۱ | لار - استان فارس                         | ۲۷° ۴۳'           | ۵۴° ۱۹'           |
| <i>R. microphyllum</i><br><i>R. muscatellum</i> | ۱<br>۱ | تادوان - استان فارس                      | ۲۸° ۴۷'           | ۵۳° ۲۱'           |
| <i>R. microphyllum</i>                          | ۱      | کازرون - استان فارس                      | ۲۹° ۳۴'           | ۵۱° ۴۴'           |
| <i>R. microphyllum</i>                          | ۱      | بستک - استان هرمزگان                     | ۲۷° ۱۲'           | ۵۴° ۱۵'           |
| <i>R. muscatellum</i>                           | ۴      | کوه خواجه زابل - استان سیستان و بلوچستان | ۳۰° ۵۶'           | ۶۱° ۱۵'           |
| <i>R. cystops</i>                               | ۴      | دره اردن - لیوانت                        | ۳۰° ۴۴'           | ۳۵° ۳۸'           |

(Forward) و رشته معکوس (Reverse) یعنی (Reverse complement) هم‌ردیف شدند. سپس توالی نهایی برای هر نمونه به طول ۵۷۷ نوکلئوتید به دست آمد. سپس تحلیل‌های تبارزایی بیزی (Bayesian)، حداکثر پارسیمونی (MP) و حداکثر درست‌نمایی (ML) انجام شد. تحلیل حداکثر پارسیمونی توسط نرم‌افزار PAUP (Swofford، ۲۰۰۲)، استنتاج

محصولات PCR تخلیص شده با حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از دستگاه ABI 3700 شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شدند. توالی‌های مورد نظر در نرم‌افزار BioEdit (Hall، ۱۹۹۹) بازبینی شدند و نواحی که توسط دستگاه خوب خوانده نشده بود و نواحی با کیفیت پایین مورد استفاده قرار نگرفتند. توالی‌های به دست آمده رشته‌پیش‌رو



جایگاه پلی‌مورف یا متغیر بودند که ۱۴۸ جایگاه از نظر پارسیمونی حاوی بار اطلاعاتی (parsimony informative) بود. تعداد هاپلوتایپ‌های به‌دست آمده ۲۳ عدد بود و دو هاپلوتایپ هم مربوط به برون‌گروه‌ها بود که در آنالیز استفاده شد. از ۱۴۸ سایت متغیر حاوی بار اطلاعاتی، ۱۰۷ سایت دارای دو واریانت، ۳۹ سایت دارای سه واریانت و دو سایت دارای چهار واریانت بود. میانگین ترکیب نوکلئوتیدهای A، C، T و G ژن ناحیه کنترل، در خفاش‌های دم‌موشی، به‌ترتیب برابر ۳۵/۲۳، ۲۴/۱۶، ۲۸/۶۰ و ۱۲/۰۱٪ می‌باشد. هیچ هاپلوتایپی بین گونه‌ها مشترک نبود. از ۲۳ هاپلوتایپ، هفت هاپلوتایپ مربوط به گونه *R. microphyllum*، ۱۲ هاپلوتایپ مربوط به گونه *R. muscatellum*، سه هاپلوتایپ مربوط به گونه *R. hardwickei* و یک هاپلوتایپ متعلق به گونه *R. cystops* می‌باشد. تعداد توالی‌های نوکلئوتیدی، میانگین فاصله ژنتیکی (K2P) درون‌گونه‌ای، تعداد هاپلوتایپ‌ها، میانگین تفاوت نوکلئوتیدی، تنوع نوکلئوتیدی و تعداد جایگاه‌های پلی‌مورفیک در جدول ۲ خلاصه شده است. میانگین فاصله ژنتیکی بین گونه‌ها به‌وسیله مدل Kimura-2-parameter انجام شد. میانگین فاصله بین گونه‌ای نشان می‌دهد که دو گونه *R. hardwickei* و *R. cystops* کم‌ترین واگرایی (۱/۸۱±۱۵/۸۸) را از یکدیگر داشته، یا به‌عبارتی از لحاظ ژنتیکی نسبت به گونه‌های دیگر به‌یکدیگر نزدیک‌تر می‌باشند، سپس دو گونه *R. microphyllum* و *R. muscatellum* از لحاظ ژنتیکی به‌یکدیگر نزدیک‌تر و *R. muscatellum* و *R. cystops* نیز بیش‌ترین واگرایی را از یکدیگر دارند (جدول ۳).

Bayesian توسط نرم‌افزار MrBayes 3.1.1 (Huelsenbeck و Ronquist، ۲۰۰۳) و تحلیل حداکثر درست‌نمایی توسط نرم‌افزار، PHYML version 3.0 (Gascuel و Guindon، ۲۰۰۳) انجام شد. برای آزمایش قابلیت اطمینان یا آزمون تأییدی گره‌ها از Bootstrap با ۱۰۰۰ یا ۲۰۰۰ بار تکرار استفاده شد. برای رسم درخت‌های بیزین و حداکثر احتمال ابتدا باید مدل تکاملی تعیین گردد که با نرم‌افزار jModelTest 0.1.1 (Posada، ۲۰۰۸) مدل مورد ارزیابی قرار گرفت. تعیین نوع مدل با استراتژی‌های مختلف صورت می‌گیرد که در این مطالعه از معیار Akaike information criteria (AIC) برای تعیین بهترین مدل استفاده شد.

استنتاج بیزین برای ۵۰۰۰۰۰ نسل و نمونه برداری طی هر ۱۰۰۰ نسل صورت گرفت. پس از کنار گذاشتن ۲۵٪ درختان اولیه، یک درخت توافق با احتمال پسینی تولید و با استفاده از نرم‌افزار FigTree v1.3.1 (Rambaut، ۲۰۰۹) مشاهده شد. فاصله مولکولی (Kimura-2-parameter) بین گونه‌ای توسط نرم‌افزار Tamura Mega6 (Kimura، ۲۰۰۷) محاسبه شد. در مطالعه تبارزایی جنس *Rhinopoma* از دو گونه *Hipposideros armiger* و *Rhinolophus ferrumequinum* به عنوان برون‌گروه (Out group) استفاده شد.

## نتایج

بعد از هم‌ردیفی توالی‌های پیش‌رو و معکوس توالی نهایی به طول ۵۷۷ نوکلئوتید برای هر نمونه به‌دست آمد. از ۵۷۷ جایگاه ژن ناحیه کنترل به‌کار رفته در ۳۶ توالی نوکلئوتیدی بدون احتساب توالی برون‌گروه‌ها در آنالیز مولکولی، ۳۸۹ جایگاه مونومورف یا غیرمتغیر و ۱۶۸

جدول ۲: تنوع ژنتیکی خفاش‌های دم‌موشی براساس ۵۷۷ جفت باز ژن میتوکندریایی ناحیه کنترل

| <i>R. cystops</i> | <i>R. microphyllum</i> | <i>R. hardwickei</i> | <i>R. muscatellum</i> |                                      |
|-------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| ۴                 | ۱۵                     | ۳                    | ۱۴                    | تعداد توالی‌های نوکلئوتیدی           |
| ۱                 | ۷                      | ۳                    | ۱۲                    | تعداد هاپلوتایپ‌ها                   |
| -                 | ۰/۴۱                   | ۰/۱۶۰                | ۰/۱۸۱                 | میانگین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای    |
| -                 | ۰/۸۴۸                  | ۱/۰                  | ۰/۹۷۸                 | تنوع هاپلوتایپی                      |
| -                 | ۰/۰۰۳۱                 | ۰/۰۰۶۱               | ۰/۰۰۷۵                | تنوع نوکلئوتیدی                      |
| -                 | ۱/۷۵۲                  | ۳/۳۳۳                | ۴/۱۹۰                 | میانگین تفاوت نوکلئوتیدی             |
| -                 | ۷                      | ۵                    | ۱۷                    | تعداد جایگاه‌های پلی‌مورفیک          |
| -                 | ۳                      | ۰                    | ۱۰                    | تعداد جایگاه‌های پارسیمونی آگاهی بخش |

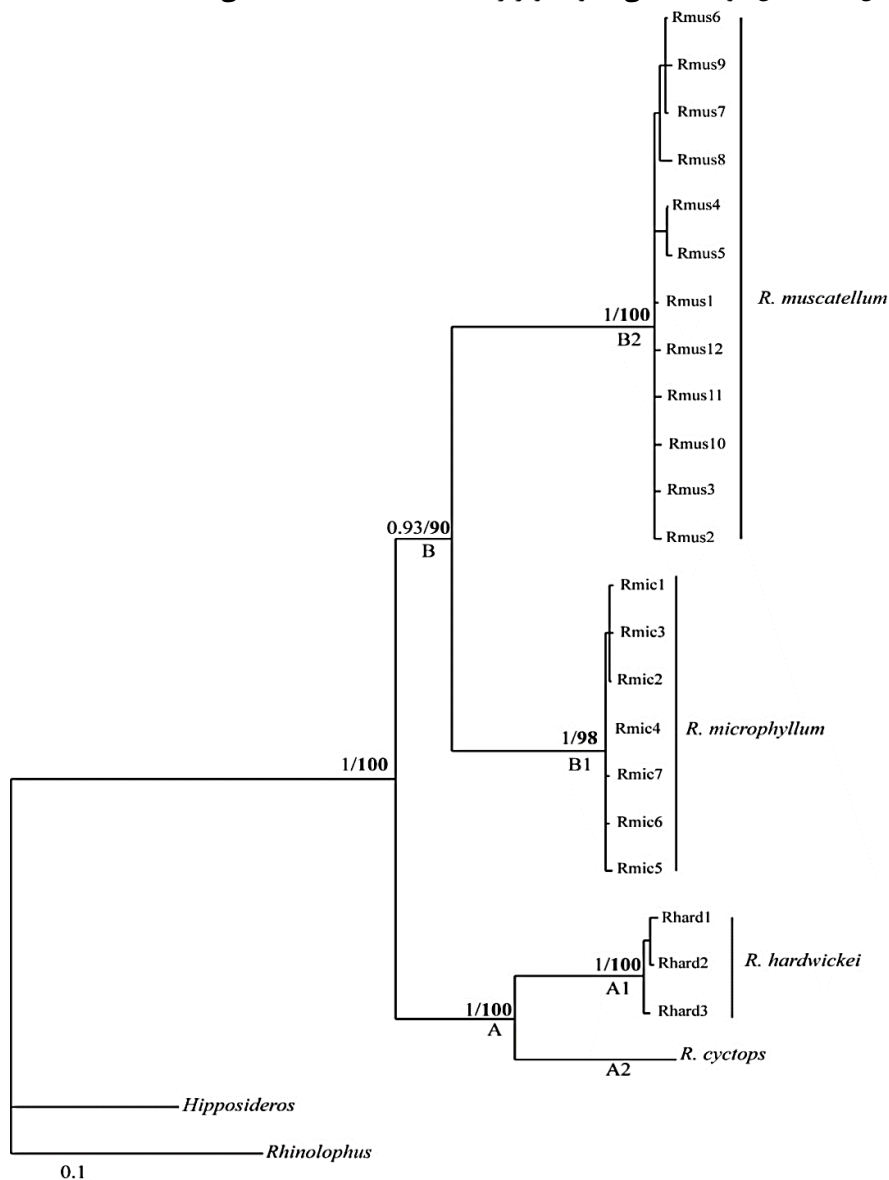
می‌باشد. درخت اجماع حداکثر پارسیمونی (majority-rule ۵۰٪ consensus) و آزمون تأییدی Bootstrap با ۲۰۰۰ مرتبه تکرار به‌دست آمد. در توپولوژی به‌دست آمده وجود دو کلاد اصلی A و B و زیرکلادهای A1 و A2، B1 و B2 قابل مشاهده می‌باشد.

تحلیل‌های تبارزایی روش‌های حداکثر پارسیمونی (Maximum parsimony)، حداکثر درست‌نمایی (Maximum likelihood) و استنتاج بیزین (Bayesian inference) انجام شد و همه آن‌ها توپولوژی یکسانی را ارائه دادند که مشتمل بر دو کلاد اصلی و چهار کلاد فرعی



کلاذ های A1 و A2، B1 و B2 را داد که کلاذ A شامل گونه‌های *R. microphyllum* و *R. hardwickei* و کلاذ B شامل گونه‌های *R. muscatellum* می‌باشد.

است. درخت بی‌زین (شکل ۳) تشکیل دو کلاذ اصلی A و B و زیر



شکل ۳: درخت حاصل از آنالیز بی‌زین که روابط تبارزایی بین گونه‌ها را نشان می‌دهد. شماره‌های غیر بولد احتمالات پسین گره‌ها در تحلیل بی‌زین را نشان می‌دهند و شماره‌های بولد شده، مقدار bootstrap گره‌ها در تحلیل‌های حداکثر درست‌نمایی (با ۱۰۰۰ مرتبه تکرار) را نشان می‌دهند.

کرد. توماس ابتدا یک تنوع فنوتیپی را در داخل این گروه شرح داد و براساس آن پنج گونه *R. microphyllum*، *R. hardwickei*، *R. cystops*، *R. sumatrae* و *R. muscatellum* را تشخیص داد (Thomas, ۱۹۰۳). سپس Hill (۱۹۷۷) مطالعه گسترده‌ای روی این خانواده انجام داد و نتیجه گرفت جنس *Rhinopoma* شامل سه گونه و ۱۱

بحث

نخستین گزارش در مورد خانواده خفاش‌های دم‌موشی و جنس *Rhinopoma* توسط Dobson (۱۸۷۲) صورت گرفت که براساس تنوعی از صفات ریختی تنها یک جنس و یک گونه برای این خانواده معرفی

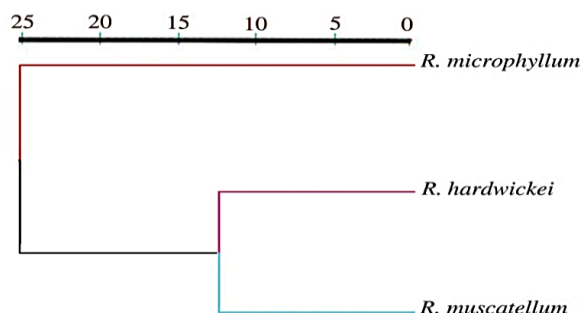


آمده با روش‌های حداکثر پارسیمونی، حداکثر درست‌نمایی و بیزین که همه آن‌ها توپولوژی یکسانی را ارائه دادند، مشخص شد این جنس تک‌نیا می‌باشد و ۱۰۰٪ حمایت می‌شود. تمام درختان حاصله، دو کلاد اصلی و چهار زیرکلاد را نشان دادند که وجود چهار گونه را اثبات می‌کنند. گونه‌های *R. hardwicki* و *R. cystops* در کلاد A قرار می‌گیرند که در درخت اجماع حداکثر پارسیمونی (majority: ۵۰٪) Bootstrap rule consensus گروه خواهری یکدیگر می‌باشند و با *R. muscatellum* و *R. microphyllum* ۱۰۰٪ تایید می‌شوند. دو گونه *R. muscatellum* و *R. microphyllum* نیز در این درخت در کلاد B قرار می‌گیرد که گروه خواهری یکدیگر می‌باشند. اما مطالعات ریختی نشان داده است که این دو گونه در صفات ریختی از یکدیگر متمایز هستند و *R. muscatellum* بیش‌تر به *R. hardwicki* شبیه می‌باشد (DeBlase, ۱۹۸۰). وضعیت خواهری فیلوگروه‌های *R. muscatellum* و *R. microphyllum* باتوجه به نظم سنتی خانواده، جایی که *R. hardwicki* و *R. muscatellum* براساس تشابه اندازه بدن و مورفولوژی بینی به‌عنوان نزدیک‌ترین تاکسون‌ها به‌هم‌در نظر گرفته می‌شوند، تناقض دارد. همان‌طور که تحلیل خوشه‌بندی (شکل ۴) (Akmali, ۲۰۱۰) براساس مربع فاصله اقلیدسی و روش ارتباط بین گروهی (Between group linkage) نشان می‌دهد.

در مطالعه (Hulva و همکاران، ۲۰۰۷) واگرایی ژنتیکی در داخل گونه سنتی *R. hardwicki*، این گونه ریختی را به دو کلاد ایرانی و کلاد عربی تقسیم کرد. در این مطالعه نیز مشخص شد که دو کلاد ایجاد شده در مطالعه این محققین، دو گونه مجزا می‌باشند که فاصله ژنتیکی آن‌ها براساس ژن ناحیه کنترل (Control region) برابر ۱۵/۸۸ درصد می‌باشد که جمعیت‌های ایرانی را گونه *R. hardwicki* و جمعیت‌های عربی (لوانت) را *R. cystops* گویند. در مطالعه (Hulva و همکاران، ۲۰۰۷) پیوستگی ژنتیکی مشخصی بین جمعیت‌های یمن و لوانت با حدود ۳۰۰۰ کیلومتر فاصله وجود دارد، در صورتی که فاصله جغرافیایی کم‌تر بین نمونه‌های لوانت و ایران (حدود ۱۲۰۰ کیلومتر) با تفاوت ژنتیکی عمیق (حداقل فاصله ژنتیکی بین هاپلوتیپ‌های آن ۳۴ مرحله جهش) همراه است. انتظار می‌رود واگرایی بین این دو گروه، ساختار فیلوگرافی حقیقی و محل جدایی خاورمیانه را از شمال غرب تا جنوب شرق نشان دهد. نقش خلیج فارس و دریای عمان در این جدایی را نباید نادیده گرفت همان‌طور که ایجاد تمایز ژنتیکی در خفاش *Myotis myotis* در دو سوی تنگه جبل الطارق توسط Castella و همکاران (۲۰۰۲) شناخته شده است. باتوجه به فواصل ژنتیکی و درخت‌های تبارزایی وجود سه گونه از این جنس در ایران مورد تایید می‌باشد. در ضمن نمونه‌های لوانت نیز به گونه *R. cystops* متعلق می‌باشد که قبلاً به‌عنوان *R. hardwicki* شناخته می‌شد.

زیرگونه می‌باشد، که این گونه‌ها شامل *R. microphyllum* با پنج زیرگونه، *R. hardwicki* با چهار زیرگونه و *R. muscatellum* با دو زیرگونه است. Koopman (۱۹۹۳) با اصلاحاتی در تعداد گونه‌ها سرانجام سه گونه و ۱۱ زیرگونه را برای این جنس توصیف نمود. مطالعه جامع در مورد این خانواده توسط Van Cakenberghe و De Vree (۱۹۹۴) صورت گرفت که همه تاکسون‌های نام‌گذاری شده این خانواده را شامل می‌شد. بررسی‌های این محققین نشان داد که جنس *Rhinopoma* شامل ۴ گونه *R. hardwicki*، *R. microphyllum*، *R. macinnesi* و *R. muscatellum* با تعدادی زیرگونه می‌باشد. اخیراً از مطالعات مولکولی در کنار مطالعات مورفولوژیکی برای تعیین دقیق وضعیت تاکسونومیکی خفاش‌ها استفاده می‌شود (Akmali و همکاران، ۲۰۱۴؛ Xu و همکاران، ۲۰۱۰؛ Furman و همکاران، ۲۰۰۹؛ Piaggio و همکاران، ۲۰۰۹؛ Hulva و همکاران، ۲۰۰۷؛ Russell و همکاران، ۲۰۰۵). در این مطالعات از مارکرهای مبتنی بر DNA به‌ویژه از سیتوکروم b و Control region به‌صورت متداول استفاده شده است. مطالعه میتوکندریایی (Hulva و همکاران، ۲۰۰۷)، وجود سه دودمان عمیقاً یکسان را به‌عنوان گونه‌های ریختی (morphospecies) که توسط (Hill, ۱۹۹۳؛ Koopman, ۱۹۹۴؛ De Vree و Van Cakenberghe, ۱۹۷۷) ارائه شده است، تایید می‌کند (به‌جز گونه *R. macinnesi*). علاوه بر این، آن‌ها واگرایی شدیدی در داخل دودمان *R. hardwicki* عدم تجانس بین الگوهای فیلوگرافیایی فنوتیپی و ژنتیکی در کلاد *R. hardwicki* لوانت و آفریقا، واگرایی شدید در داخل دودمان *R. muscatellum* فاصله بسیار کم بین نمونه‌های *R. microphyllum* که نشان‌دهنده هم‌ژنتیکی پیش‌بینی نشده این گونه است، یافتند. در این مطالعه، توالی‌های ژن ناحیه کنترل (Control region) نماینده‌هایی از سه گونه *R. microphyllum*، *R. hardwicki* و *R. muscatellum* در ایران و گونه *R. cystops* از لوانت مورد بررسی قرار گرفت. براساس میانگین فاصله بین‌گونه‌ای مشخص شد که دو گونه *R. hardwicki* و *R. cystops* کم‌ترین واگرایی را از یکدیگر داشته، یا به‌عبارتی از لحاظ ژنتیکی نسبت به گونه‌های دیگر به‌یکدیگر نزدیک‌تر می‌باشند، در نتیجه گونه‌زایی بین آن‌ها اخیرتر می‌باشد. سپس دو گونه *R. microphyllum* و *R. muscatellum* از لحاظ ژنتیکی به‌یکدیگر نزدیک می‌باشند که در درخت تبارزایی نیز به‌عنوان گروه خواهری در کنار هم قرار گرفتند. دو گونه *R. muscatellum* و *R. cystops* نیز بیش‌ترین واگرایی را از یکدیگر نشان می‌دهند (جدول ۳). هم‌چنین میانگین فاصله درون‌گونه‌ای نشان می‌دهد که بیش‌ترین واگرایی درون‌گونه‌ای مربوط به *R. muscatellum* و کم‌ترین واگرایی درون‌گونه‌ای مربوط به *R. microphyllum* می‌باشد. از مقایسه درخت‌های به‌دست





شکل ۴: تحلیل خوشه‌بندی براساس مربع فاصله اقلیدسی و روش ارتباط بین گروهی (Akmali, ۲۰۱۰)

## منابع

- Wilson and D.M. Reeder, eds., Smithsonian Institution Press, Washington and London. pp: 137-241.
۱۴. **Matson, C.W. and Baker, R.J., 2001.** DNA Sequence Variation in the Mitochondrial Control Region of Red-Backed Voles. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 18, No. 8, pp: 1494-1501.
  ۱۵. **Piaggio, A.J.; Navo K.W. and Stihler, C.W., 2009.** Intraspecific comparison of population structure, genetic diversity, and dispersal among three subspecies of Townsend's big-eared bats, *Corynorhinus townsendii townsendii*, *C. t. pallescens*, and the endangered *C. t. virginianus*. *Conservation Genetic*. Vol. 10, pp: 143-159.
  ۱۶. **Posada, D., 2008.** JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 25, No. 7, pp: 1253-1256.
  ۱۷. **Rambaut, A., 2009.** FigTree. v1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>.
  ۱۸. **Reeder, D.M.; Helgen, K.M. and Wilson, A.D., 2007.** Global Trends and biases in new Mammal species discoveries. *Museum of Texas Tech Uni*. Vol. 269, pp: 1-36.
  ۱۹. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19, pp: 1572-1574.
  ۲۰. **Russell, A.L.; Medellin R.A. and McCracken, G.F., 2005.** Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat *Tadarida brasiliensis Mexicana*. *Molecular Ecology*. Vol. 14, pp: 2207-2222.
  ۲۱. **Simmons, N.B. and Wetterer, A.L., 2010.** Estimating diversity: how many bat species are there? In: 15th International bat research Conference, Prague, Czech Republic. 285 p.
  ۲۲. **Simmons, N.B., 2005.** Order chiroptera. In: *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. D. E. Wilson and D.M. Reeder, eds., Baltimore: The John Hopkins University Press. pp: 312-529.
  ۲۳. **Swofford, D., 2002.** PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
  ۲۴. **Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S., 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 24, pp: 1596-1599.
  ۲۵. **Thomas, O., 1903.** On the species of the genus *Rhinopoma*. *The Annals and Magazine of Natural History*. Vol. 7, pp: 496-499.
  ۲۶. **Van Cakenberghe, V. and De Vree, F., 1994.** A revision of the Rhinopomatidae Dobson 1872, with the description of a new subspecies (Mammalia: Chiroptera). *Senckenbergiana Biologica*. Vol. 73, pp: 1-24.
  ۲۷. **Wilkinson, G.S. and Fleming, T.H., 1996.** Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecol*. Vol. 5, pp: 329-339.
  ۲۸. **Xu, L.; He, C.; Shen, C.; Jiang, T.; Shi, L.; Sun, K.; Berquist, S.W. and Feng, J., 2010.** Phylogeography and Population Genetic Structure of the Great Leaf-Nosed Bat (*Hipposideros armiger*) in China. *Journal of Heredity*. Vol. 101, pp: 562-572.
  ۱. **Akmali, V., 2010.** A biosystematic study of bats genus *Rhinopoma* in Iran with emphasis on *Rhinopoma microphyllum*. PhD. Thesis. University of Tehran.
  ۲. **Akmali, V.; Farazmand, A.; Darvish, J. and Sharifi, M., ۲۰۱۱.** Phylogeography and taxonomic status of the greater mouse-tailed bat *Rhinopoma microphyllum* (Chiroptera: Rhinopomatidae) in Iran. *Acta Chiropterologica*. Vol. 13, No. ۲, pp: ۲۷۹-۲۹۰.
  ۳. **Akmali, V.; Mehdizadeh, R.; Chaghmirza, K.; Moradi, M. and Sharifi, M., 2014.** Taxonomic evaluation of the bent-winged bat (*Miniopterus*) populations occurring in Iran inferred from mitochondrial cytochrome-b sequences. *Mammalia*. Vol. 79, No. 4, pp: 449-455.
  ۴. **Benda, P.; Reiter, A.; Al-Jumaily, M.; Nasher, A.K. and Hulva, P., 2009.** A new species of mouse-tailed bat (Chiroptera: Rhinopomatidae: *Rhinopoma*) from Yemen. *Journal of the National Museum, Natural History Series*. Vol. 177, No. 6, pp: 53-68.
  ۵. **Castella, V.; Ruedi, M.; Excoffier, L.; Ibanez, C.; Arlettaz, R. and Hausser, J., 2000.** Is Gibraltar Strait a barrier to gene flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Molecula Ecology*. Vol. 9, No.1, pp: 1761-1772.
  ۶. **DeBlase, A.F., 1980.** The bats of Iran: systematics, distribution, ecology. *Fieldiana Zoology*. Vol. 4, pp: 1-424.
  ۷. **Dobson, G.E., 1872.** Chiroptera. In: *Stoliczka, F., Notice of the Mammals and Birds inhabiting Kachh*. *Journal of the Royal Asiatic Society of Bengal*. Vol. 41, pp: 220-223.
  ۸. **Furman, A.; Çoraman, E.; Bilgin, R. and Karatas, A., 2009.** Molecular ecology and phylogeography of the bent-wing bat complex (*Miniopterus schreibersii*) in Asia Minor and adjacent regions. *Zoologica Scripta*. Vol. 38, pp: 129-141.
  ۹. **Geoffroy Saint-Hilaire, E., 1813.** Description des mammiferes qui se trouvent en Egypte, In: *Description de l'Egypte, on Recueil des Observations et des Recherches qui ont ete faites en Egypte pendant l'Expedition de l'Armee Francaise Vol. 2 (Histoire Naturelle)*, E.F. Jomard, ed., publie par les Ordres de sa Majeste l'Empereur Napoleon le Grand. Paris. pp: 99-144.
  ۱۰. **Guindon, S. and Gascuel, O., 2003.** A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*. Vol. 52, No. 5, pp: ۶۹۶-۷۰۴.
  ۱۱. **Hill, J.E., 1977.** A review of the Rhinopomatidae (Mammalia: Chiroptera). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology series*. Vol. 32, No. 2, pp: 29-43.
  ۱۲. **Hulva, P.; Horáček, I. and Benda, P., 2007.** Molecules, morphometrics and new fossils provide an integrated view of the evolutionary history of Rhinopomatidae (Mammalia: Chiroptera). *BioMed Central Evolutionary Biology*. Vol. 7, No. 165, pp: 1-15.
  ۱۳. **Koopman, K.F., 1993.** Order chiroptera. In: *Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference*. D.E.

