

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

• وحید اکملی*: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: شهریور 1395 تاریخ پذیرش: آذر 1395

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 36 نمونه از مناطق مختلف جمع‌آوری و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. بعد از تکثیر قطعه مورد نظر و توالی‌یابی، همدیفی انجام شد و توالی به‌طول 577 نوکلئوتید به‌دست آمد. میانگین ترکیب نوکلئوتیدی A، C، T و G، به‌ترتیب برابر 35/23٪، 24/16٪، 28/60٪ و 12/01٪ بود. از تعداد 577 جایگاه، 168 جایگاه متغیر که 148 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. microphyllum* و *R. muscatellum* تاکسون‌های خواهری می‌باشند که این حالت با رابطه *R. muscatellum* و *R. hardwickei* که براساس تشابه اندازه بدن و مورفولوژی بینی به‌عنوان نزدیک‌ترین تاکسون‌ها به‌هم در نظر گرفته می‌شوند، در تناقض است.

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

مقدمه

خفاش‌های حشرمخوار متمایز هستند چرا که 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، 1980).

این خانواده تنها دارای جنس *Rhinopoma* است که در سال 1813 توسط Geoffroy معرفی شد. مدت‌ها برای این جنس، سه گونه (*R. muscatellum* و *R. hardwickei* و *R. microphyllum*) معرفی شده بود. مطالعات جامع Van Cakenberghe و De Vree (1994) براساس نمونه‌های موزه‌ای نشان داد که این جنس دارای 4 گونه *R. muscatellum*، *R. macinnesi*، *R. hardwickei*، *R. microphyllum* است. Hulva و همکاران (2007)، گونه *R. cystops* (Thomas، 1903) که قبلاً مترادف *R. hardwickei* بود، براساس مطالعات مولکولی و مورفوتری، به‌عنوان یک گونه معتبر معرفی کردند. Benda و همکاران (2009)، گونه جدید *R. hadramauticum* را از جنوب‌شرقی یمن توصیف کردند. بنابراین اکنون این جنس در

خفاش‌ها به‌عنوان پستانداران پرنده، دومین راسته بزرگ بعد از چوندگان می‌باشند. این گروه به‌خاطر داشتن قدرت پرواز و پژواک‌جایابی (Echolocation) دارای تنوع گسترده‌ای می‌باشند به‌طوری‌که تاکنون بیش از 1300 گونه شناسایی شده است (Wetterer و Simmons، 2010؛ Reeder و همکاران، 2007؛ Simmons، 2005). خانواده خفاش‌های دم‌موشی (Rhinopomatidae) اغلب به‌عنوان قدیمی‌ترین کلاد خردخفاش‌های زنده در نظر گرفته می‌شوند (Hulva و همکاران، 2007) که در سال 1872 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





ج

شکل 1: 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 36 نمونه خفاش دم موشی گونه-

های *R. microphyllum*، *R. hardwickei*، *R. muscatellum* و *R. cystops* از مناطق مختلف جمع‌آوری و برای تعیین روابط فیلوژنتیک استفاده شد (جدول 1). نمونه‌برداری از خفاش‌ها با استفاده از تور دست‌ساز و تور نامرئی (mistnet) انجام شد. برای این کار در زمان نمونه‌برداری از هر بال خفاش یک پانچ سه میلی‌متری تهیه و به الکل 96% 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 (5'-CCACCATCAGCACCCAAAGC-3') و D1-R1 (5'-TACCAAAGCCATGACACCACAGTT-3') انجام شد (Akmali و همکاران، 2011). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مخلوط واکنشی به حجم 20 میکرولیتر و با Prime Taq Master Mix 2x، Cat No: G-2000 (Genetbio) انجام شد که واکنش شامل 10 میکرولیتر از مسترمیکس، 0/75 میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، 1 میکرولیتر DNA ژنومی استخراج شده از بافت هدف و 7/5 میکرو لیتر آب مقطر فاقد یون بود. شرایط دمایی بهینه واکنش PCR شامل دمایی واسرشت‌سازی اولیه (Initial denaturation)، 94°C به مدت 4 دقیقه، واسرشت‌سازی (Denaturation)، 94°C به مدت 30 ثانیه، دمایی اتصال آغازگر (Annealing)، 52°C به مدت 30 ثانیه، دمایی اتصال پرایمرها (Extension)، 72°C به مدت 45 ثانیه و دمایی بسط پرایمرها (Final Extension)، 72°C به مدت 5 دقیقه بوده است. واکنش PCR، 35 چرخه تکرار شد. در مرحله بعد، محصول PCR را روی ژل برده و ژل را به مدت 15 دقیقه در محلول اتیدیوم برمایید رنگ‌آمیزی کرده و بعد از رنگ گرفتن، ژل به کمک دستگاه Gel Doc مشاهده و سپس عکس از آن تهیه شد.

سرتاسر دامنه پراکنش خود در جهان دارای شش گونه می‌باشد (Akmali و همکاران، 2011). 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 1).

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 گروه‌های فیلوجغرافیایی درون یک گونه استفاده می‌شود، بلکه در مطالعات تبارزایی گونه‌های نزدیک نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Xu و همکاران، 2010؛ Matson و Baker، 2010؛ Wilkinson و Fleming، 1996).



الف



ب

جدول 1: 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>	2	دهلران- استان ایلام	32° 55'	47° 35'
<i>R. microphyllum</i>	1	بیشه دراز- استان ایلام	32° 48'	46° 58'
<i>R. muscatellum</i>	3			
<i>R. microphyllum</i>	1	داراب- استان فارس	28° 45'	54° 34'
<i>R. microphyllum</i>	1	نوجیوران- استان کرمانشاه	34° 29'	47° 29'

47° 28'	34° 25'	بیستون- استان کرمانشاه	1	<i>R. microphyllum</i>
46° 15'	34° 35'	هشیلان- استان کرمانشاه	1	<i>R. microphyllum</i>
60° 47'	27° 22'	دامین ایرانشهر- استان سیستان و بلوچستان	1	<i>R. microphyllum</i>
			3	<i>R. muscatellum</i>
57° 27'	28° 51'	جیرفت- استان کرمان	1	<i>R. microphyllum</i>
			2	<i>R. muscatellum</i>
48° 50'	32° 15'	گتوند- استان خوزستان	2	<i>R. microphyllum</i>
			3	<i>R. hardwickii</i>
54° 19'	27° 43'	لار- استان فارس	1	<i>R. microphyllum</i>
			1	<i>R. muscatellum</i>
53° 21'	28° 47'	تادوان- استان فارس	1	<i>R. microphyllum</i>
			1	<i>R. muscatellum</i>
51° 44'	29° 34'	کازرون- استان فارس	1	<i>R. microphyllum</i>
54° 15'	27° 12'	بستک- استان هرمزگان	1	<i>R. microphyllum</i>
61° 15'	30° 56'	کوه خواجه زابل- استان سیستان و بلوچستان	4	<i>R. muscatellum</i>
35° 38'	30° 44'	دره اردن- لیوانت	4	<i>R. cystops</i>

بعد از هم‌ردیفی توالی‌های پیش‌رو و معکوس توالی نهایی به طول 577 نوکلئوتید برای هر نمونه به‌دست آمد. از 577 جایگاه ژن ناحیه کنترل به‌کار رفته در 36 توالی نوکلئوتیدی بدون احتساب توالی برون گروه‌ها در آنالیز مولکولی، 389 جایگاه مونومورف یا غیرمتغیر و 168 جایگاه پلی‌مورف یا متغیر بودند که 148 جایگاه از نظر پارسیمونی حاوی بار اطلاعاتی (parsimony informative) بود. تعداد هاپلوتایپ‌های به‌دست آمده 23 عدد بود و دو هاپلوتایپ هم مربوط به برون گروه‌ها بود که در آنالیز استفاده شد. از 148 سایت متغیر حاوی بار اطلاعاتی، 107 سایت دارای دو واریانت، 39 سایت دارای سه واریانت و دو سایت دارای چهار واریانت بود. میانگین ترکیب نوکلئوتیدی‌های A، C، T و G ژن ناحیه کنترل، در خفاش‌های دم‌موشی، به‌ترتیب برابر 35/23٪، 24/16٪، 28/60٪ و 12/01٪ می‌باشد. هیچ هاپلوتایپی بین گونه‌ها مشترک نبود. از 23 هاپلوتایپ، هفت هاپلوتایپ مربوط به گونه *R. microphyllum*، 12 هاپلوتایپ مربوط به گونه *R. muscatellum*، سه هاپلوتایپ مربوط به گونه *R. hardwickii* 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 2 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. hardwickii* و *R. cystops* کم‌ترین واگرایی (15/88±1/81) 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 3).

محصولات PCR تخلیص شده با حجم 20 میکرولیتر با استفاده از دستگاه ABI 3700 شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شدند. توالی‌های مورد نظر در نرم‌افزار BioEdit (Hall، 1999) بازبینی شدند و نواحی که توسط دستگاه خوب خوانده نشده بود و نواحی با کیفیت پایین مورد استفاده قرار نرفتند. توالی‌های به‌دست آمده رشته‌پیش‌رو (Forward) و رشته معکوس (Reverse) یعنی (Reverse complement) هم‌ردیف شدند. سپس توالی نهایی برای هر نمونه به‌طول 577 نوکلئوتید به‌دست آمد. سپس تحلیل‌های تبارزایی بیزین (Bayesian)، حداکثر پارسیمونی (MP) و حداکثر درست‌نمایی (ML) انجام شد. تحلیل حداکثر پارسیمونی توسط نرم‌افزار PAUP (Swofford، 2002)، استنتاج Bayesian توسط نرم‌افزار Mr Bayes 3.1.1 (Ronquist و Huelsenbeck، 2003) و تحلیل حداکثر درست‌نمایی توسط نرم‌افزار PHYML version 3.0 (Guindon و Gascuel، 2003) انجام شد. برای آزمایش قابلیت اطمینان با آزمون تأییدی گره‌ها از Bootstrap با 1000 یا 2000 بار تکرار استفاده شد. برای رسم درخت‌های بیزین و حداکثر احتمال ابتدا مدل تکاملی تعیین گردد که با نرم‌افزار jModelTest 0.1.1 (Posada، 2008) 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 5000000 نسل و نمونه برداری طی هر 1000 نسل صورت گرفت. پس از کنار گذاشتن 25٪ درختان اولیه، یک درخت توافق با احتمال پسینی تولید و با استفاده از نرم‌افزار FigTree v1.3.1 (Rambaut، 2009) مشاهده شد. فاصله مولکولی (Kimura-2-parameter) بین گونه‌ای توسط نرم‌افزار Mega6 (Tamura و همکاران، 2007) محاسبه شد. در مطالعه تبارزایی جنس *Rhinopoma* از دو گونه *Hipposideros armiger* و *Rhinolophus ferrumequinum* به عنوان برون گروه (Out group) استفاده شد.

نتایج

جدول 2: تنوع ژنتیکی خفاش‌های دم‌موشی براساس 577 جفت باز ژن میتوکندریایی ناحیه کنترل

<i>R. cystops</i>	<i>R. microphyllum</i>	<i>R. hardwickii</i>	<i>R. muscatellum</i>
-------------------	------------------------	----------------------	-----------------------



4	15	3	14	تعداد توالی‌های نوکلئوتیدی
1	7	3	12	تعداد هاپلوتایپ‌ها
-	0%/41	0%/60	0%/81	میانگین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای
-	0/848	1/0	0/978	تنوع هاپلوتایپی
-	0/0031	0/0061	0/0075	تنوع نوکلئوتیدی
-	1/752	3/333	4/190	میانگین تفاوت نوکلئوتیدی
-	7	5	17	تعداد جایگاه‌های پلی‌مورفیک
-	3	0	10	تعداد جایگاه‌های پارسیمونی آگاهی بخش

پارسیمونی (50% majority-rule consensus) و آزمون تأییدی Bootstrap با 2000 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 بی‌زیان (Bayesian inference) انجام شد و همه آن‌ها توپولوژی یکسانی را ارائه دادند که مشتمل بر دو کلاد اصلی و چهار کلاد فرعی می‌باشد. درخت اجماع حداکثر

جدول 3: میانگین فاصله ژنتیکی (K2P) با خطای معیار بین گونه‌های خفاش دم‌موشی

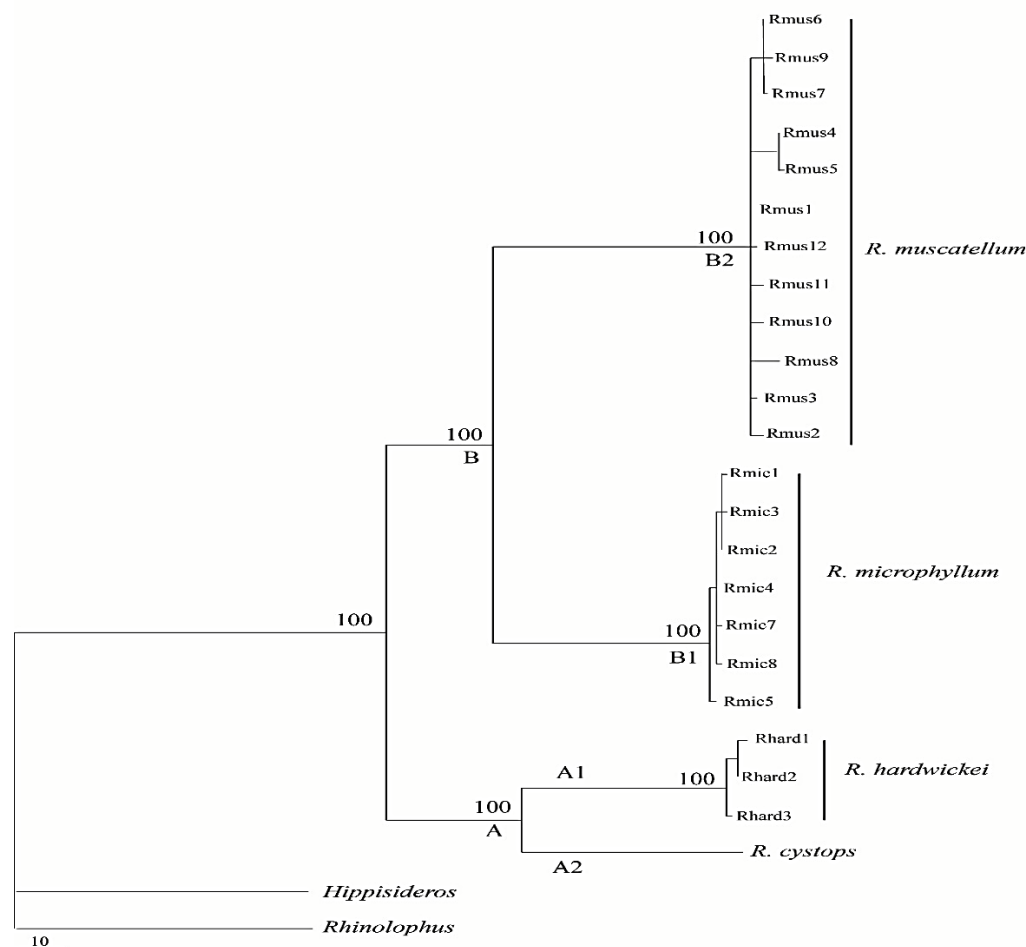
<i>R. muscatellum</i>	<i>R. microphyllum</i>	<i>R. cystops</i>	گونه‌ها
		-	<i>R. cystops</i>
	-	20/59±2/04	<i>R. microphyllum</i>
-	17/82±1/92	22/55±2/27	<i>R. muscatellum</i>
21/92±2/23	21/62±2/05	15/88±1/81	<i>R. hardwickei</i>

فاصله ژنتیکی به‌صورت درصد ارائه شده است.

(0/7276=RC و 0/9162=RI، 0/2059=HI، 0/7541=CI). درخت حداکثر پارسیمونی نشان می‌دهد که این جنس تک‌نیا است و با احتمال 100% این تکنیایی حمایت می‌شود (شکل 2).

کلاد A شامل گونه‌های *R. cystops* و *R. hardwickei* و کلاد B شامل گونه‌های *R. microphyllum* و *R. muscatellum* می‌باشد. داده‌های توالی براساس معیار پارسیمونی و جایگاه‌های دارای بار اطلاعاتی منجر به ایجاد درخت اجماع با طول 442 شد



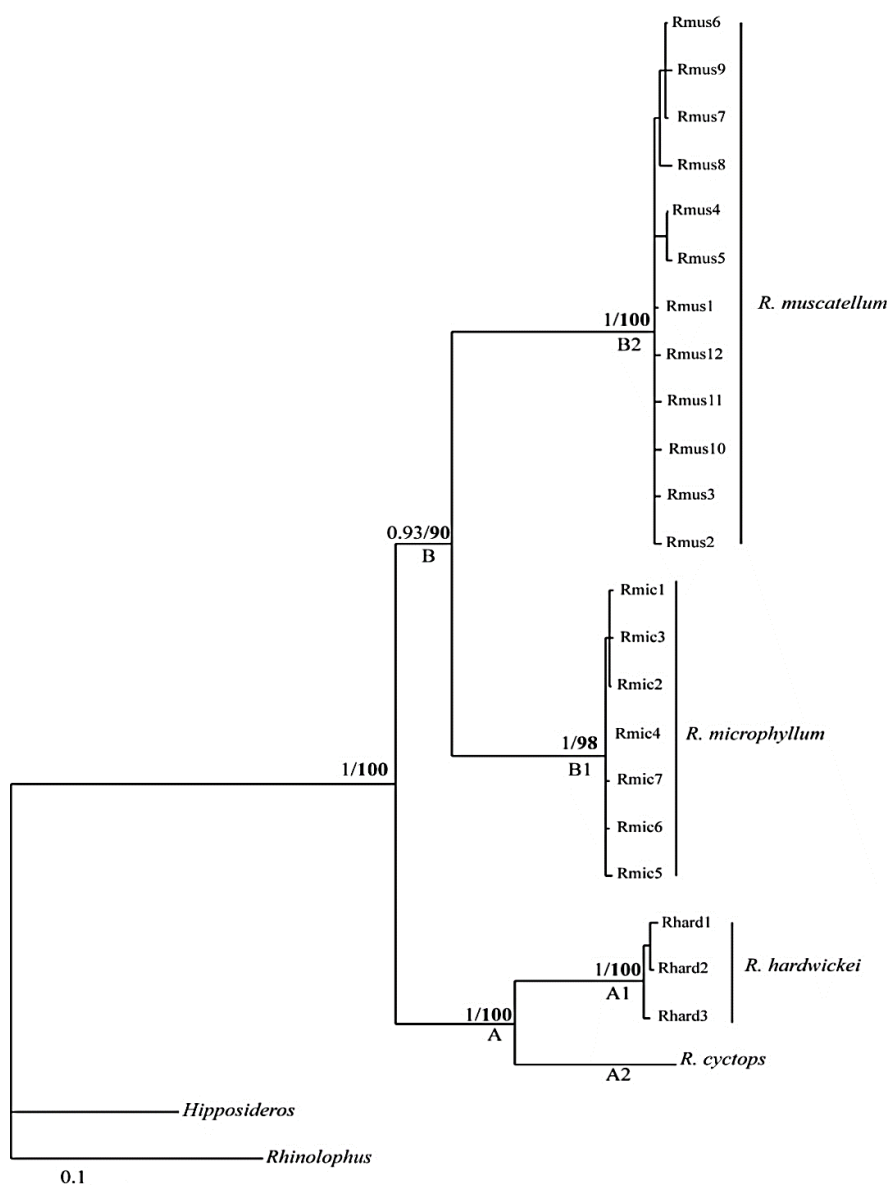


شکل 2: درخت اجماع حداکثر پارسیمونی (50% majority-rule consensus) نشان‌دهنده روابط تبارزایی بین گونه‌های خفاش‌های دهموشی همراه با آزمون تأییدی Bootstrap (2000 مرتبه تکرار)

تخمین نرخ جانیشینی بازها (3/2079=[AT]، 3/2079=[AC])، 3/2079=[AT]، 3/2079=[AC]، 10/8860=[CT]، 1/0000=[CG]، 3/0210=[AC] و 1/0000=[GT] تخمین پارامتر توزیع گاما (gamma) است. درخت بیزین (شکل 3) تشکیل دو کلاذ اصلی A و B و زیر کلاذهای A1 و A2، B1 و B2 را داد که کلاذ A شامل گونه‌های *R. cystops* و *R. hardwickei* و کلاذ B شامل گونه‌های *R. muscatellum* و *R. microphyllum* می‌باشد.

دو آنالیز فیلوژنتیک مستقل حداکثر درست‌نمایی و استنتاج بیزین نیز توپوگرافی مشابهی با حداکثر پارسیمونی نشان دادند که در اینجا درخت استنتاج بیزین آورده شده است. برای ترسیم این درختان ابتدا 88 مدل برای توالی‌های نوکلئوتیدی مورد آزمون قرار گرفت که در نهایت براساس معیار Akaike Information Criterion مدل TIM2+G انتخاب شد. مقادیر محاسبه شده پارامترهای این مدل شامل فرکانس بازها (0/2900=T و 0/1304=G، 0/2246=C، 0/3549=A)،





شکل 3: 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 1000 مرتبه تکرار) را نشان می‌دهند.

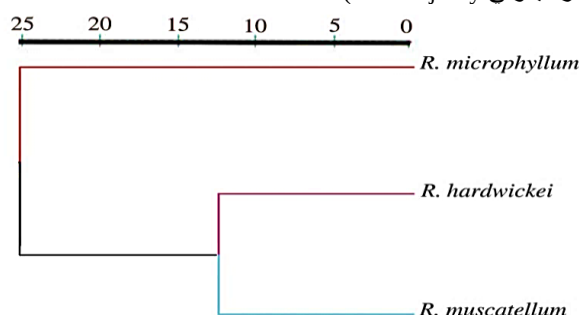
بحث

hardwickei با چهار زیرگونه و *R. muscatellum* با دو زیرگونه است. Koopman (1993) با اصلاحاتی در تعداد گونه‌ها سرانجام سه گونه و 11 زیرگونه را برای این جنس توصیف نمود. مطالعه جامع در مورد این خانواده توسط Van Cakenberghe و De Vree (1994) صورت گرفت که همه تاکسون‌های نام‌گذاری شده این خانواده را شامل می‌شد. بررسی‌های این محققین نشان داد که جنس *Rhinopoma* شامل 4 گونه *R. microphyllum*، *R. hardwickei*، *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 (Furman و همکاران، 2014؛ Xu و همکاران، 2010؛ Akmalı).

نخستین گزارش در مورد خانواده خفاش‌های دم‌موشی و جنس *Rhinopoma* توسط Dobson (1872) صورت گرفت که براساس تنوعی از صفات ریختی تنها یک جنس و یک گونه برای این خانواده معرفی کرد. توماس ابتدا یک تنوع فنوتیپی را در داخل این گروه شرح داد و براساس آن پنج گونه *R. muscatellum* را تشخیص داد (Thomas، 1903). سپس Hill (1977) مطالعه گسترده‌ای روی این خانواده انجام داد و نتیجه گرفت جنس *Rhinopoma* شامل سه گونه و 11 زیرگونه می‌باشد، که این گونه‌ها شامل *R. microphyllum* با پنج زیرگونه، *R.*

rule consensus) گروه خاوه‌ری یکدیگر می‌باشند و با Bootstrap 100 % تایید می‌شوند. دو گونه *R. microphyllum* و *R. muscatellum* نیز در این درخت در کلا B قرار می‌گیرد که گروه خاوه‌ری 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. hardwickei* شبیه می‌باشد (DeBlase, 1980). وضعیت خاوه‌ری فیلوگروه‌های *R. microphyllum* و *R. muscatellum* باتوجه به نظم سنتی خانواده، جایی‌که *R. hardwickei* و *R. muscatellum* براساس تشابه اندازه بدن و مورفولوژی بینی به‌عنوان نزدیک‌ترین تاکسون‌ها به‌هم در نظر گرفته می‌شوند، تناقض دارد. همان‌طور که تحلیل خوشه‌بندی (شکل 4) (Akmalı, 2010) براساس مربع فاصله اقلیدسی و روش ارتباط بین گروهی (Between group linkage) نشان می‌دهد. در مطالعه (Hulva و همکاران، 2007) واگرایی ژنتیکی در داخل گونه سنتی *R. hardwickei*، این گونه ریختی را به دو کلا ایرانی و کلا عربی تقسیم کرد. در این مطالعه نیز مشخص شد که دو کلا ایجاد شده در مطالعه این محققین، دو گونه مجزا می‌باشند که فاصله ژنتیکی آن‌ها براساس ژن ناحیه کنترل (Control region) برابر 15/88 درصد می‌باشد که جمعیت‌های ایرانی را گونه *R. hardwickei* و جمعیت‌های عربی (لوانت) را *R. cystops* گویند. در مطالعه (Hulva و همکاران، 2007) پیوستگی ژنتیکی مشخصی بین جمعیت‌های یمن و لوانت با حدود 3000 کیلومتر فاصله وجود دارد، در صورتی‌که فاصله جغرافیایی کمتر بین نمونه‌های لوانت و ایران (حدود 1200 کیلومتر) با تفاوت ژنتیکی عمیق (حداقل فاصله ژنتیکی بین هاپلوتیپ‌های آن 34 مرحله جهش) همراه است. انتظار می‌رود واگرایی بین این دو گروه، ساختار فیلوجغرافی 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 (2002) 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. hardwickei* شناخته می‌شد.

و همکاران، 2009؛ Piaggio و همکاران، 2009؛ Hulva و همکاران، 2007؛ Russell و همکاران، 2005). در این مطالعات از مارک‌های مبتنی بر DNA به‌ویژه از سیتوکروم b و Control region به‌صورت متداول استفاده شده است. مطالعه میتوکندریایی (Hulva و همکاران، 2007)، وجود سه دودمان عمیقاً یکسان را به‌عنوان گونه‌های ریختی (morphospecies) که توسط (Koopman، 1994؛ De Vree و Van Cakenberghe، 1993؛ Hill، 1977) ارائه شده است، تایید می‌کند (به‌جز گونه *R. macinnesi*). علاوه بر این، آن‌ها واگرایی شدیدی در داخل دودمان *R. hardwickei*، عدم تجانس بین الگوهای فیلوجغرافیایی فنوتیپی و ژنتیکی در کلا *R. hardwickei* لوانت و آفریقا، واگرایی شدید در داخل دودمان *R. muscatellum*، فاصله بسیار کم بین نمونه‌های *R. microphyllum* که نشان‌دهنده هم‌ژنتیکی ژنتیکی پیش‌بینی نشده این گونه است، یافتند. در این مطالعه، توالی‌های ژن ناحیه کنترل (Control region) نماینده‌هایی از سه گونه *R. microphyllum*، *R. hardwickei* و *R. cystops* در ایران و گونه *R. cystops* از لوانت مورد بررسی قرار گرفت. براساس میانگین فاصله بین‌گونه‌ای مشخص شد که دو گونه *R. hardwickei* و *R. cystops* بیش‌ترین 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 خاوه‌ری در کنار هم قرار گرفتند. دو گونه *R. muscatellum* و *R. cystops* نیز بیش‌ترین واگرایی را از یکدیگر نشان می‌دهند (جدول 3). همچنین میانگین فاصله درون‌گونه‌ای نشان می‌دهد که بیش‌ترین واگرایی درون گونه‌ای مربوط به *R. muscatellum* و کم‌ترین واگرایی درون‌گونه‌ای مربوط به *R. microphyllum* می‌باشد. از مقایسه درخت‌های به‌دست آمده با روش‌های حداکثر پارسیمونی، حداکثر درست‌نمایی و بی‌زین که همه آن‌ها توپولوژی یکسانی را ارائه دادند، مشخص شد این جنس تک‌نیا می‌باشد و 100% حمایت می‌شود. تمام درختان حاصله، دو کلا اصلی و چهار زیرکلا را نشان دادند که وجود چهار گونه را اثبات می‌کنند. گونه‌های *R. cystops* و *R. hardwickei* در کلا A قرار می‌گیرند که در درخت اجماع حداکثر پارسیمونی-50% majority)



شکل 4: تحلیل خوشه‌بندی براساس مربع فاصله اقلیدسی و روش ارتباط بین گروهی (Akmalı, 2010)

1. Akmalı, V., 2010. A biosystematic study of bats genus *Rhinopoma* in Iran with emphasis on *Rhinopoma microphyllum*. PhD. Thesis. University of Tehran.

- Tadarida brasiliensis Mexicana*. Molecular Ecology. Vol. 14, pp: 2207-2222.
21. **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.
 22. **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.
 23. **Swofford, D., 2002.** PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
 24. **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.
 25. **Thomas, O., 1903.** On the species of the genus *Rhinopoma*. The Annals and Magazine of Natural History. Vol. 7, pp: 496-499.
 26. **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.
 27. **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.
 28. **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.
 2. **Akmali, V.; Farazmand, A.; Darvish, J. and Sharifi, M., 2011.** Phylogeography and taxonomic status of the greater mouse-tailed bat *Rhinopoma microphyllum* (Chiroptera: Rhinopomatidae) in Iran. Acta Chiropterologica. Vol. 13, No. 2, pp: 279-290.
 3. **Akmali, V.; Mehdizadeh, R.; Chaghamirza, 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.
 4. **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.
 5. **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)? Molecular Ecology. Vol. 9, No.1, pp: 1761-1772.
 6. **DeBlase, A.F., 1980.** The bats of Iran: systematics, distribution, ecology. Fieldiana Zoology. Vol. 4, pp: 1-424.
 7. **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.
 8. **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.
 9. **Geoffroy Saint-Hilaire, E., 1813.** Description des mammifères qui se trouvent en Egypte, In: Description de l'Egypte, on Recueil des Observations et des Recherches qui ont été faites en Egypte pendant l'Expedition de l'Armée Française Vol. 2 (Histoire Naturelle), E.F. Jomard, ed., publie par les Ordres de sa Majeste l'Empereur Napoleon le Grand. Paris. pp: 99-144.
 10. **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: 696-704.
 11. **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.
 12. **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.
 13. **Koopman, K.F., 1993.** Order chiroptera, In: Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference. D.E. Wilson and D.M. Reeder, eds., Smithsonian Institution Press, Washington and London. pp: 137-241.
 14. **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.
 15. **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. pallascens*, and the endangered *C. t. virginianus*. Conservation Genetic. Vol. 10, pp: 143-159.
 16. **Posada, D., 2008.** JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution. Vol. 25, No. 7, pp: 1253-1256.
 17. **Rambaut, A., 2009.** FigTree. v1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>.
 18. **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.
 19. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. Vol. 19, pp: 1572-1574.
 20. **Russell, A.L.; Medellín R.A. and McCracken, G.F., 2005.** Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat

