

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

Taxonomy and Biosystematics

E-ISSN: 2322-2190

Document Type: Research Paper

Vol. 13, Issue 4, No.49, Winter 2022, P:3

Received: 20/12/2021 Accepted: 05/02/2022

Molecular Phylogeny of the Egyptian Barbastelle (*Barbastella Leucomelas*) based on the Mitochondrial COI Gene: A New Report from Iran

Aliasghar Zarei

Ph. D. Student, Department of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran
aazarei65@gmail.com

Sohrab Ashrafi*

Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran
sohrab.ashrafi@ut.ac.ir

Afshin Alizadeh Shabani

Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran
ashabani@ut.ac.ir

Abstract

Phylogenetic inference is a keystone in evolutionary biology research, providing the foundations for thinking and answering a wide range of questions, from population dynamics to species classification statistically. Barbastelle bats have geographically isolated populations, and the possibility of cryptic species within the distribution range of this genus has been predicted in previous studies. Previously, different populations of Barbastelle bats in Iran were assigned to two species: 1) Caspian Barbastelle (*Barbastella caspica*), and 2) European Barbastelle (*Barbastella barbastellus*). In the present study, the phylogeny of the Egyptian Barbastelle population in Qazvin province in Iran was investigated. Molecular phylogeny of Egyptian barbastelle which based on last findings thought to belong to the Caspian Barbastelle was compared with other taxa of this genus based on the mitochondrial COI gene. The results of the study showed that the populations of the southern slopes of the Alborz Mountains and possibly the populations of central and western Iran cannot be classified as Caspian Barbastelle. Rather, from a Phylogenetic point of view and based on the observed genetic similarity, this population is closer to the Egyptian form (*Barbastella leucomelas*) of this genus.

Key words: *Barbastella Caspica*, Cytochrome c Oxidase Subunit 1, Phylogenetic, Qazvin Province.

*Corresponding author

Zarei, A., Ashrafi, S. and Alizadeh Shabani, A. (2021). Molecular Phylogeny of the Egyptian Barbastelle (*Barbastella Leucomelas*) based on the Mitochondrial COI Gene: A New Report from Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 13(49), 29-42.



2322-2190 / © 2021 The Authors. Published by University of Isfahan

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



<http://dx.doi.org/10.22108/TBJ.2022.131931.1190>



<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20088906.1400.13.49.3.3>

تاکسونومی و بیوسستماتیک، سال سیزدهم، شماره چهل و نهم، زمستان ۱۴۰۰، ص ۲۹-۴۲
نوع مقاله: پژوهشی

پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹

فیلوژنی مولکولی خفاش گوش پهن مصری (*Barbastella leucomelas*) براساس ژن میتوکندریایی COI: گزارشی جدید از ایران

علی اصغر زارعی، دانشجوی دکتری گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

aazarei65@gmail.com

سهراب اشرفی*، استاد گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

sohrab.ashrafi@ut.ac.ir

افشین علیزاده شعبانی، استاد گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

ashabani@ut.ac.ir

چکیده

استنباط فیلوژنتیک، سنگ بنایی بنیادین در پژوهش‌های زیست‌شناسی تکاملی است و مبنایی را برای تفکر و پاسخ‌گویی به طیف گسترده‌ای از پرسش‌ها، از پویایی جمعیت تا طبقه‌بندی گونه‌ای، به صورت آماری فراهم می‌کند. خفاش‌های گوش پهن از نظر جغرافیایی دارای جمعیت‌های منزوی هستند و امکان وجود گونه‌های پنهان در محدوده توزیع این جنس پیش‌بینی می‌شد. تا پیش از این مطالعه، تمام جمعیت‌های مختلف خفاش‌های گوش پهن در ایران به دو گونه خفاش گوش پهن خزری (*Barbastella caspica*) و خفاش گوش پهن اروپایی (*Barbastella barbastellus*) منسوب می‌شد. در این مطالعه، روابط تبارشناختی جمعیت خفاش گوش پهن مصری در محدوده استان قزوین در ایران بررسی شد. فیلوژنی مولکولی خفاش گوش پهن مصری که براساس یافته‌های اخیر تصور می‌شد متعلق به گونه بارباستل خزری باشد با سایر تاکسون‌های این جنس براساس ژن میتوکندریایی COI مقایسه شد. نتایج نشان داد افراد جمعیت‌های دامنه‌های جنوبی رشته کوه البرز و به‌طور احتمالی جمعیت‌های غرب ایران را نمی‌شود در جایگاه گونه بارباستل خزری طبقه‌بندی کرد؛ بلکه از نقطه نظر تبارشناسی و براساس شباهت ژنتیکی مشاهده شده، این جمعیت به فرم مصری (*Barbastella leucomelas*) این جنس نزدیک‌تر است. **واژه‌های کلیدی:** خفاش گوش پهن خزری، ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱، تبارشناسی، استان قزوین.

مقدمه

https://mammaldiversity.org (2018; در ایران

تاکسون حضور ۵۲ گونه خفاش متعلق به ۹ خانواده

گزارش شده است (Yusefi et al., 2019; Khajeh et

al., 2020). اگرچه به‌طور سنتی راسته خفاش‌ها به دو

راسته خفاش‌ها (Chiroptera) با ۲۱ خانواده، ۲۳۷

جنس و ۱۴۴۶ گونه بعد از جوندگان، بزرگ‌ترین و

متنوع‌ترین راسته پستانداران است (Burgin et al.,

* مسئول مکاتبات

زارعی، علی اصغر، اشرفی، سهراب. و علیزاده شعبانی، افشین. (۱۴۰۰). فیلوژنی مولکولی خفاش گوش پهن مصری (*Barbastella leucomelas*) براساس ژن میتوکندریایی COI: گزارشی جدید از ایران. تاکسونومی و بیوسستماتیک، ۱۳(۴۹): ۲۹-۴۲.



2322-2190 / © 2021 The Authors. Published by University of Isfahan

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



<http://dx.doi.org/10.22108/TBJ.2022.131931.1190>



<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20088906.1400.13.49.33>

شمال و شمال شرقی آفریقا و همچنین شمال هند و چین در منطقه اورینتال دارد (شکل ۱) (Simmons, 2005). اعضای این جنس در گستره پراکنش خود به ندرت جابه جا می شوند و به طور معمول گستره خانگی محدودی دارند (Zeale et al., 2012). خفاش های گوش پهن به طور عمده در مناطق جنگلی و در زیستگاه های با اقلیم به نسبت سرد، بناهای انسان ساخت از قبیل اماکن مسکونی و متروک، زیر پل ها، تونل ها و داخل غارها به سر می برند. جنس *Barbastella* در ایران از جمله خفاش های بسیار کمیاب به شمار می آید و نیچ غذایی بسیار تخصصی دارد؛ به گونه ای که به طور عمده از بیدها تغذیه می کند (Benda et al., 2012). محدوده حضور خفاش گوش پهن آسیایی براساس شش گزارش به دست آمده فقط از نوار شمالی ایران است (Benda et al., 2012). تمام نقاط حضور گونه آسیایی در ایران در منطقه استپ های خشک و نیمه خشک قرار دارد و از شمال شرق ایران تا رشته کوه زاگرس مرکزی امتداد می یابد؛ همچنین تاکنون به تعداد کم تنها از استان های خراسان رضوی، مرکزی، تهران، سمنان و لرستان گزارش شده است (Benda et al., 2012).

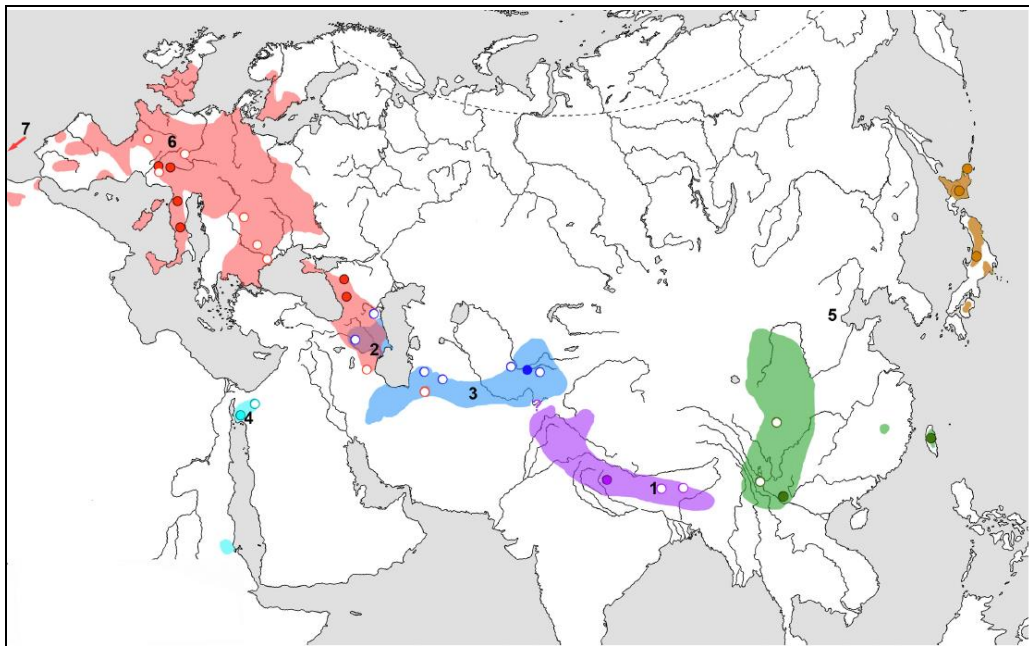
خفاش های بارباستل از نظر تنوع تا ۱۰ سال اخیر جنس کوچکی به شمار می آمد (Zhang et al., 2007) که تنها از دو گونه خفاش گوش پهن غربی یا اروپایی *B. barbastellus* (Schreber 1774) و خفاش گوش پهن شرقی یا آسیایی *B. leucomelas* (Cretzschmar, 1826) تشکیل می شد. این طبقه بندی در سال های اخیر به کلی دگرگون شده و در حال حاضر تعداد گونه های آن به شش گونه رسیده است؛ به طوری که الگوی توزیع و پراکنش این جنس را در محدوده پالتارکتیک تغییر داده است (شکل ۱). به طور خاص در

زیرراسته کلان خفاش ها (*Megachiroptera*) و خرد خفاش ها (*Microchiroptera*) رده بندی می شود، به تازگی براساس تجزیه و تحلیل های فیلوژنتیکی، این رده بندی تغییر کرده است. براساس رده بندی قدیم در ایران تنها دو گونه خفاش میوه خوار مصری (*Rousettus aegyptiacus*) و خفاش میوه خوار (*Rousettus leschenaultii*) Leschenault's متعلق به زیرراسته کلان خفاش ها بود و بقیه به زیرراسته خرد خفاش ها تعلق داشت؛ در حالی که در رده بندی جدید، خانواده های خفاش میوه خوار، خفاش دم موشی، خفاش بینی برگه ای، خفاش نعل اسبی و خانواده جدید *Rhinonycteridae* در زیرراسته *Pteropodiformes* یا *Yinpterochiroptera* و خانواده های خفاش دم آزاد، خفاش دم غلاف دار، خفاش شامگاهی و خفاش بال خمیده در زیرراسته *Vespertilioniformes* یا *Yangochiroptera* قرار می گیرد (Eick et al., 2005; Foley, et al, 2015)؛ همچنین گسترش مطالعات فیلوژنی در سال های اخیر منجر به کشف گونه های پنهان (*Cryptic*) بسیاری در این راسته شده است (Altringham, 2011; Burgin et al., 2018).

خفاش های گوش پهن (*Barbastelle*) متعلق به جنس *Barbastella* از خانواده خفاش های شامگاهی (*Vespertilionidae*) هستند. خانواده خفاش های شامگاهی متعلق به زیرراسته *Yangochiroptera* و بزرگ ترین خانواده این زیرراسته است که تاکنون مطالعات بوم شناختی، رده بندی و فیلوژنی گسترده ای درباره آن انجام شده است (Mayer et al., 2007). جنس *Barbastella* پراکندگی بسیار گسترده ای در نواحی معتدل و نیمه گرمسیری در منطقه پالتارکتیک از انگلستان در غرب اروپا تا ژاپن و تایوان در شرق آسیا،

گوش‌پهن در ایران به دو گونه خفاش گوش‌پهن خزری (*Barbastella caspica* Satunin, 1908) و خفاش گوش‌پهن اروپایی (*Barbastella barbastellus* Schreber, 1774) منسوب می‌شود. با توجه به اینکه خفاش‌های گوش‌پهن از نظر جغرافیایی دارای جمعیت‌های منزوی هستند، احتمال وجود گونه‌های پنهان (Cryptic) در میان جمعیت‌های مختلف آن زیاد است؛ همچنین فرآیند گونه‌زایی (Speciation) در این جنس در مطالعات پیشین مطرح شده است (Kruskop, 2019)؛ علاوه بر این برنامه‌ریزی‌های حفاظتی براساس نیازهای اکولوژیک گونه‌هایی انجام می‌شود که از نظر تکاملی جدا شده‌اند (Behrooz et al., 2018)؛ بنابراین شناسایی گونه‌های پنهان نقش به‌سزایی در مدیریت و حفاظت از گونه‌های کمیاب خفاش‌هایی خواهد داشت که به تازگی توصیف شده‌اند (Bickford et al., 2007; Pellens et al., 2016). این مطالعه با هدف رفع ابهامات رده‌بندی و همچنین بازسازی درخت تبارشناختی جمعیت‌های جنوبی گستره توزیع و پراکنش (شمال و غرب ایران) خفاش گوش‌پهن خزری انجام شد (شکل ۱). در این پژوهش تلاش شد با استفاده از ژن میتوکندریایی COI که ژنی متداول در مطالعات آرایه‌شناسی مولکولی جانوران است و از آن در مطالعات قبلی فیلوژنی گونه‌های این جنس استفاده شده است (Kruskop, 2015)، ابهامات موجود بررسی شود.

سال ۲۰۰۷ گونه‌ای جدید با نام خفاش گوش‌پهن پکنی (*B. beijingensis*) توسط Zhang و همکارانش در شمال شرق چین توصیف شد؛ همچنین فرم مصری (عربی) گونه *B. leucomelas* که به‌طور عمده در مصر، شبه جزیره سینا، عربستان سعودی و اریتره در شمال آفریقا زندگی می‌کند، در سطح گونه از سایر جمعیت‌های آسیایی آن جدا شد (Benda and Mlikovsky, 2008). در سال ۲۰۱۵ Kruskop با بررسی داده‌های ریخت‌شناسی و ژنتیک جمعیت‌های باقی‌مانده آسیای مرکزی و قفقاز جنوبی که در قالب نام خفاش گوش‌پهن آسیایی (*B. darjelingensis*) شناخته می‌شد، گونه‌ای جدید را با نام خفاش گوش‌پهن خزری توصیف کرد. نتایج این بررسی نشان داده است افراد جمعیت‌های آسیای مرکزی را نمی‌شود گونه *B. darjelingensis* در نظر گرفت؛ بلکه آنها متعلق به گونه‌ای جداگانه است که شباهت بیشتری با گونه مصری *B. leucomelas* دارد؛ اما از نظر ریخت‌شناسی با آن متفاوت است. جثه و اندازه خفاش گوش‌پهن خزری بزرگ‌تر از گونه مصری است. Kruskop (۲۰۱۵) براساس مجاورت جغرافیایی جمعیت‌های این گونه در محدوده دریای خزر و قفقاز جنوبی نام آن را *Barbastella caspica* Satunin, 1908 انتخاب کرد. یافته‌های اخیر در رده‌بندی اعضای این جنس سبب شده است تا لزوم بازنگری در روابط تبارشناختی جمعیت‌های ایرانی آن، بیش از پیش احساس شود. براساس مطالعات Kruskop (۲۰۱۵) و Benda و همکاران (۲۰۰۸) جمعیت‌های مختلف خفاش‌های



شکل ۱- نقشه توزیع گونه‌های مختلف جنس *Barbastella*. ۱. خفاش گوش‌پهن اروپایی (قرمز)؛ ۲. خفاش گوش‌پهن مصری (آبی روشن)؛ ۳. خفاش گوش‌پهن خزری (آبی تیره)؛ ۴. خفاش گوش‌پهن هندی (بنفش)؛ ۵. خفاش گوش‌پهن پکنی (سبز)؛ ۶. خفاش گوش‌پهن ژاپنی (قهوه‌ای) (Kruskop, 2019).

نتایج

روش کار

نمونه‌برداری

کلنی بررسی شده در نیمه شمالی کشور ایران و در محدوده منطقه حفاظت‌شده الموت شرقی در استان قزوین قرار دارد. نمونه‌برداری و صید خفاش‌ها با مجوز شماره ۹۹/۴۲۰/۲۰۰۵۴ و با هماهنگی معاونت محیط طبیعی سازمان حفاظت محیط زیست انجام شده است. زنده‌گیری با استفاده از تور دستی (Mist net) در محل استراحت افراد (دیواره سنگی داخل تونل شیرکوه) انجام شد (شکل ۲). سعی شد از آسیب‌رساندن به حیوان جلوگیری شود و تا حد امکان کمترین میزان استرس به آن وارد شود (Sikes, 2016). نمونه‌های

صید شده تعیین جنسیت و بخش کوچکی از بال هر فرد به قطر سه میلی‌متر توسط بایوپسی پانچ (Biopsy punches) برداشته (Zhang et al., 2007) و در الکل ۹۶ درصد برای مطالعات مولکولی در آزمایشگاه حیات وحش دانشگاه تهران نگهداری شد. از آنجایی که خفاش‌ها توانایی بازسازی بافت آسیب‌دیده بال خود را دارند، به‌طور تقریبی یک‌ماه بعد محل نمونه‌برداری ترمیم می‌شود. این شیوه از نمونه‌برداری (غیر تهاجمی) آسیب جدی به حیوان وارد نخواهد کرد (Gannon, 2011). نمونه‌ها در محل صید و در همان وضعیت اولیه رهاسازی شد.



شکل ۲- تصاویر خفاش‌های گوش‌پهن مصری که روی دیوارهٔ تونل شیرکوه معلم کلایه در حال استراحت هستند.

الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد در بافر TAE1x با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. فرآیند تکثیر با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ در دستگاه ترموسایکلر (PeQlab, Germany) با مواد آورده شده و کیت PCR 2x (Ampliqon, Denmark) انجام شد. شرایط دمایی شامل واسرشت اولیه ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، چرخه شامل دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه بود. در نهایت، بسط آنزیمی ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. مقدار چهار میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در بافر TBE 0.5X در حضور رنگ فلورسنت Greeniwer (شرکت آریاطوس، ایران) رنگ‌آمیزی شد. در کنار نمونه‌ها از نشانگر وزن مولکولی DM2300 (SMOBIO, Thailand) استفاده شد.

استخراج و توالی‌یابی DNA

در این مطالعه، سه فرد از یک کلنی هشت‌تایی خفاش گوش‌پهن حاضر در داخل تونل شیرکوه شهرستان معلم کلایه در محدودهٔ منطقهٔ حفاظت‌شدهٔ الموت شرقی استان قزوین، برای استخراج DNA استفاده شد. برای استخراج DNA، نمونه در بافر هضم‌کنندهٔ حاوی دو درصد SDS، ۵۰۰ میکرولیتر بافر STE (pH = 8) و ۲۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K به مدت سه ساعت در دمای ۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. فرآیند جداسازی با فنل / کلروفرم / ایزوآمیل الکل (۱/۲۴/۲۵) در دو مرحله (هربار ۵۰۰ میکرولیتر اضافه و بعد از سانتریفوژ لایهٔ رویی حاوی DNA جداسازی شد) و عملیات رسوب DNA با اضافه شدن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق صورت گرفت. در نهایت، DNA در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر عاری از هرگونه آلودگی محلول شد. ارزیابی کیفی DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo2000c, USA) و خوانش طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر صورت گرفت؛ همچنین برای بررسی یکپارچگی DNA از روش

جدول ۱- لیست پرایمرهای استفاده شده در فرآیند تکثیر

Primer name	sequence	refrence
COI-VF1d	TGTA AAAACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYAT YGG	Ivanova, 2006
COI-VR1d	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAA YCA	Ivanova, 2006

داده‌ها اضافه شد (Kruskop, 2015). سکانس‌های استخراج شده با استفاده از افزونه Clustal W در نرم افزار MEGA X (10.0.5) هم‌ردیف شد (Kumar *et al.*, 2018) و به صورت چشمی تنظیم نهایی توالی‌ها صورت گرفت. به منظور تعیین احتمالات مختلف جایگزینی نوکلئوتیدی و انتخاب بهترین مدل تکاملی برای دسته داده‌های مختلف (جنس *Barbastella* با ۱۹ توالی و جنس *Plecotus* با ۳۱ توالی) و همچنین جلوگیری از نبود قطعیت نرم‌افزاری، از ModelTest-NG v0.1.7 در نرم افزار raxmlGUI 2.0.5 و نرم افزار Kozlov *et al.*, 2019; MEGA X استفاده شد (Darriba *et al.*, 2020).

برآورد میزان واگرایی تکاملی بین توالی‌ها با استفاده از فاصله ژنتیکی جفتی (Pairwise distances) انجام شد (Tamura and Nei., 1993). ماتریس فاصله جفتی بین توالی‌ها با استفاده از مدل تامورا و نیی (Tamura and Nei) (TrN) با نرخ‌های جایگزینی هم‌خانواده و غیر هم‌خانواده (transition + transversions) مشخص شد. از توزیع یکنواخت (Uniform rate) برای تعیین نرخ تغییر بین جایگاهها با الگوی ناهمگن بین دودمان‌ها (Heterogeneous) با احتمال مقادیر مشتق شده از ۱۰ هزار تکرار بوت‌استرپ استفاده شد (Kruskop, 2019).

محصول به دست آمده با استفاده از کیت ستونی (Combo GenAll, Korea) شستشو داده شد و توالی‌یابی به روش سنگر در دستگاه توالی‌یاب (ABI3730xl (Macrogene, Korea) از دو طرف (F و R) صورت گرفت. توالی‌های ab1 در نرم افزار geneious IR9 ارزیابی شد (Kearse *et al.*, 2012).

آنالیزهای ژنتیکی و آماری

با توجه به مطالعات انجام شده در آسیا (Benda *et al.*, 2008; Kruskop, 2015)، برای تعیین روابط تبارشناختی درون این جنس از ۶۵۷ جفت باز (bp) ژن میتوکندریایی COI استفاده شد. سکانس‌های مربوط به افراد گونه‌های جنس *Barbastella* در خارج از ایران که توسط سایر پژوهشگران جمع‌آوری شده و در مرکز ژنومیک تنوع زیستی کانادا، در سامانه داده بارکد حیات (BOLD; www.boldsystems.org) موجود است، به ماتریس داده‌ها اضافه و برای مقایسه با نمونه‌های داخلی استفاده شد (جدول ۲). از ۳۱ سکانس مربوط به خفاش‌های جنس گوش‌بلند (*Plecotus*) شامل خفاش گوش‌بلند اوگنوی (*Plecotus ognevi*) با ۲۸ سکانس و سه سکانس از خفاش گوش‌بلند آسیای میانه (*P. strelkovi*) در جایگاه تاکسون خواهری جنس *Barbastella* استفاده و برای ریشه‌دار کردن تبارنمای فیلوژنی در جایگاه گروه خارجی (Outgroup) به دسته

نتایج

در این مطالعه، ۶۵۷ جفت باز از ژن میتوکندریایی COI مربوط به سه نمونه از خفاش‌های *Barbastella* در دامنه جنوبی رشته کوه البرز (در استان قزوین) توالی‌یابی شد. توالی‌های به دست آمده با ۱۶ توالی از شش تاکسون متفاوت این جنس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی شد. ماتریس فاصله TrN و خطای استاندارد (Standard error) برآورد شده بین هر جفت از توالی‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه، بیشترین فاصله ژنتیکی مشاهده شده، بین جمعیت ایرانی با گونه *B. darjelingensis* ویتنام به میزان تقریبی ۲۱ درصد، بعد از آن با گونه *B. darjelingensis* جزایر کوریل (مجمع‌الجزایر آتشفشانی در استان ساخالین در روسیه با طول تقریبی ۱۳۰۰ کیلومتر که از شمال شرقی هوکایدو در ژاپن تا کامچاتکا در روسیه کشیده شده است) به میزان ۲۰ درصد و بعد از آن با گونه *B. barbastellus* به میزان تقریبی ۱۹ درصد بود. کمترین فاصله ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی با گونه *B. leucomelas* از مصر با میزان تقریبی یک درصد و بعد از آن با گونه *B. caspica* به میزان تقریبی شش درصد برآورد شده است.

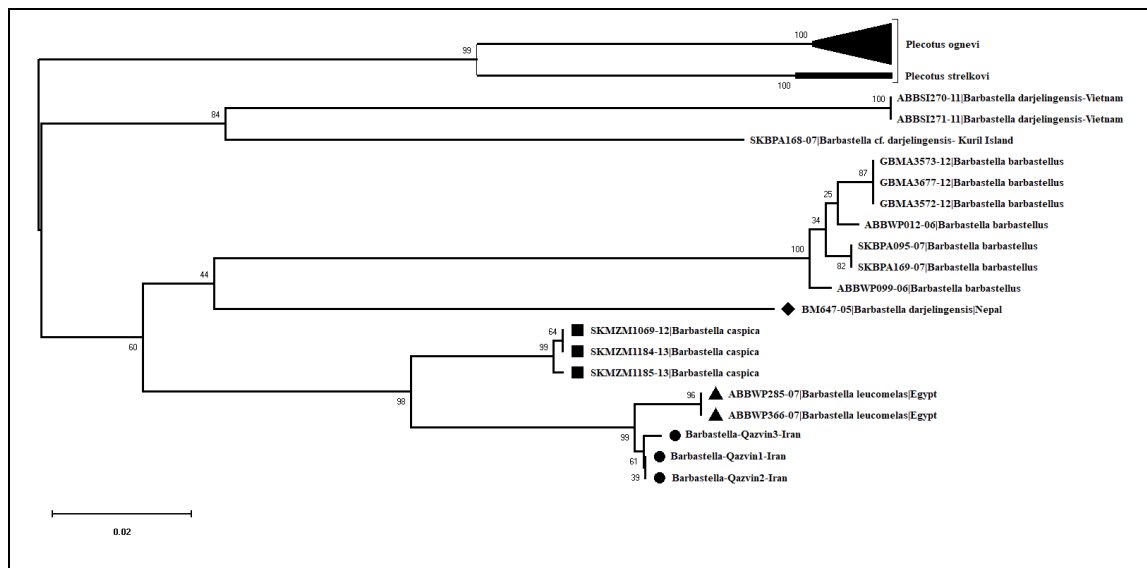
به منظور استنباط روابط تبارشناختی جمعیت ایرانی خفاش گوش‌پهن در ارتباط با سایر گونه‌های مختلف جنس *Barbastella* و مقایسه درخت فیلوژنی آن با درخت فیلوژنی Kruskop (۲۰۱۵) از روش Neighbor-Joining با استفاده از مدل دوپارامتری کیمورا (Kimura 2-parameter) با نرخ‌های جایگزینی هم‌خانواده و غیرهم‌خانواده (transition + transversions) و از توزیع یکنواخت (Uniform rate) برای تعیین نرخ تغییر بین جایگاهها با احتمال مقادیر مشتق شده از ۱۰ هزار تکرار بوت‌استرپ استفاده شد. تمام موقعیت‌های دربردارنده گپ و داده‌های از دست‌رفته (Gaps and missing data) با استفاده از گزینه حذف کامل (Complete deletion) از آنالیز حذف شد. در نهایت، به منظور یافتن محتمل‌ترین درخت فیلوژنی که روابط تبارشناختی در داده‌ها را بهتر از سایر درخت‌ها توصیف کند، از روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum likelihood) و مدل هاسه گاوا کیشینو و یانو (HKY85) در ترکیب با مدل I و G استفاده شد. برای ترسیم تبارنمای ML از برنامه اجرایی raxmlHPC-PHREADS-SSE3.exe در نرم‌افزار RAxML GUI 2.0.5 استفاده شد (Edler et al., 2020).

جدول ۲- ماتریس فاصله TrN و خطای استاندارد ۱۹ توالی از جنس خفاش های گوش پهن براساس ژن COI

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	SKBPA169-07 <i>Barbastella barbastellus</i>		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
2	SKBPA095-07 <i>Barbastella barbastellus</i>	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
3	GBMA3677-12 <i>Barbastella barbastellus</i>	0.01	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
4	GBMA3573-12 <i>Barbastella barbastellus</i>	0.01	0.01	0.00		0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
5	GBMA3572-12 <i>Barbastella barbastellus</i>	0.01	0.01	0.00	0.00		0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
6	ABBWP012-06 <i>Barbastella barbastellus</i>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		0.00	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
7	ABBWP099-06 <i>Barbastella barbastellus</i>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00		0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
8	BM647-05 <i>Barbastella darjelingensis</i> Nepal	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.16		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
9	ABBWP366-07 <i>Barbastella leucomelas</i> Egypt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.16		0.00	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
10	ABBWP285-07 <i>Barbastella leucomelas</i> Egypt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.16	0.00		0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
11	ABBSI270-11 <i>Barbastella darjelingensis</i> -Vietnam	0.25	0.25	0.25	0.26	0.26	0.26	0.26	0.20	0.21	0.21		0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
12	ABBSI271-11 <i>Barbastella darjelingensis</i> -Vietnam	0.25	0.25	0.25	0.26	0.26	0.26	0.26	0.20	0.21	0.21	0.00		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
13	SKBPA168-07 <i>Barbastelladarjelingensis</i> -Kuril_island	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.18	0.20	0.20	0.16	0.16		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
14	SKMZM1184-13 <i>Barbastella caspica</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.16	0.16	0.13	0.06	0.06	0.20	0.20	0.19		0.00	0.00	0.01	0.01	0.01
15	SKMZM1185-13 <i>Barbastella caspica</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.16	0.16	0.13	0.06	0.06	0.20	0.20	0.19	0.00		0.00	0.01	0.01	0.01
16	SKMZM1069-12 <i>Barbastella caspica</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.16	0.16	0.13	0.06	0.06	0.20	0.20	0.19	0.00	0.00		0.01	0.01	0.01
17	<i>Barbastella Qazvin Iran1</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.18	0.18	0.15	0.01	0.01	0.21	0.21	0.20	0.06	0.06	0.06		0.00	0.00
18	<i>Barbastella Qazvin Iran2</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.18	0.18	0.15	0.01	0.01	0.21	0.21	0.20	0.06	0.06	0.06	0.00		0.00
19	<i>Barbastella Qazvin Iran3</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.18	0.15	0.01	0.01	0.21	0.21	0.20	0.05	0.05	0.05	0.00	0.00	

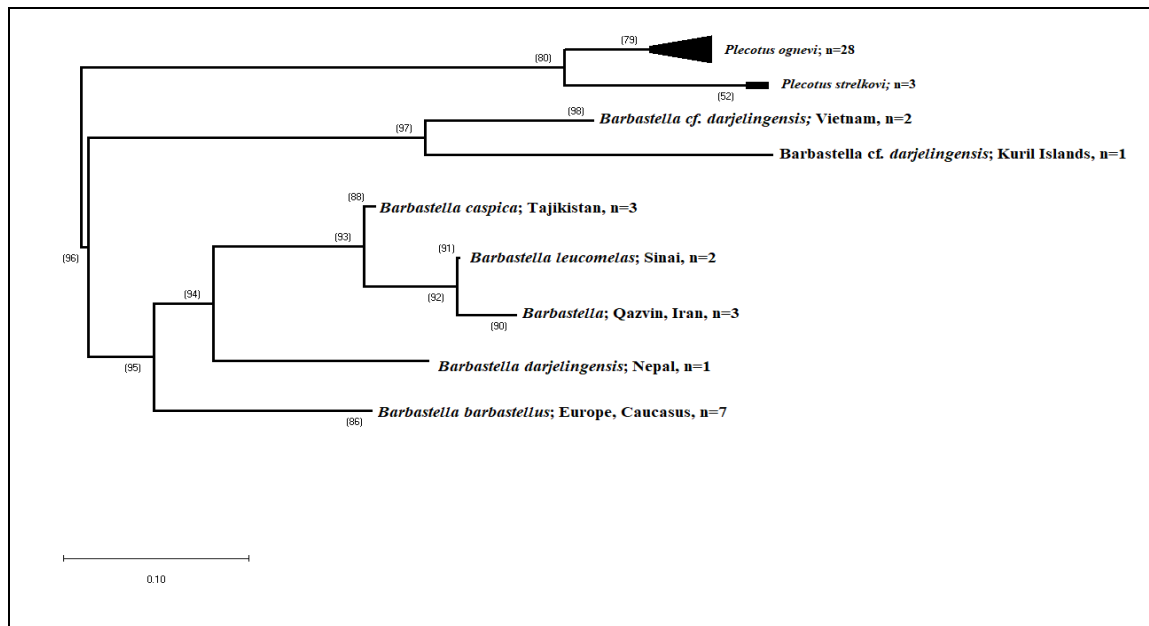
توپولوژی حاصل از ترسیم تبارنمای Neighbor-Joining به روش فاصله K₂P، وجود دو کلاد اصلی و شش خوشه فرعی را نشان داد. در کلاد اول جمعیت های ویتنام و جزایر کوریل و بقیه جمعیت ها در کلاد دوم قرار گرفته است. جمعیت های ایرانی در خوشه مربوط به گونه *B. leucomelas* قرار گرفته است.

تبارنمای تکاملی با استفاده از روش Neighbor-Joining استنباط شد. فاصله تکاملی با استفاده از مدل K₂P محاسبه شده است. درخت بهینه با مجموع طول شاخه برابر با ۰/۷۰ نشان داده شده است. درصد تکرار مرتبط با خوشه بندی هر تاکسون در ۱۰ هزار تکرار بوت استرپ در مجاورت هر شاخه نشان داده شده است.

شکل ۳- درخت فیلوژنتیک Neighbor-Joining مربوط به خفاش های جنس *Barbastella* براساس ژن میتو کندیاریی COI

ML و مدل HKY استنباط شد. در بین مجموع داده‌های مشاهده شده، تبارنمای با بیشترین مقدار احتمال در شکل ۴ نشان داده شده است.

به منظور یافتن محتمل‌ترین درخت فیلوژنی که روابط تبارشناختی در داده‌ها را بهتر از سایر درخت‌ها توصیف کند، رابطه تبارشناختی تاکسون‌های ایرانی در ارتباط با سایر تاکسون‌های این جنس با استفاده از روش



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک ML مربوط به خفاش‌های جنس *Barbastella* براساس ژن میتوکندریایی COI

بحث

به منظور جلوگیری از ناپایداری جمعیت، استنباط فیلوژنی تنها با استفاده از داده‌های مولکولی انجام شد. وظیفه اصلی فیلوژنی مولکولی تبدیل اطلاعات توالی‌های نوکلئوتیدی به تبارنمای تکاملی است (Nazemi-Rafie, 2010). استنباط فیلوژنتیک، سنگ‌بنای اساسی در پژوهش‌های زیست‌شناسی تکاملی است و مبنایی برای تفکر و پاسخ‌گویی به طیف گسترده‌ای از پرسش‌ها را، از پویایی جمعیت تا طبقه‌بندی گونه‌ای به صورت آماری فراهم می‌کند (Felsenstein, 2003; Edler et al., 2020). نتایج نشان داد استنباط فیلوژنتیک به دست آمده از مجموعه توالی‌های جنس خفاش‌های گوش‌پهن توسط روش‌ها و

تغییرات درون‌گونه‌ای برای سه فرد از این کلنی براساس فواصل ژنتیکی محاسبه شده برابر با صفر درصد به دست آمده است (جدول ۲)؛ همچنین در بین نمونه‌های این کلنی، نمونه شماره ۳ تغییرات تکاملی بیشتری را نسبت به نمونه‌های شماره ۱ و ۲ از خود نشان داده است. نمونه‌های شماره ۱ و ۲ از نظر تبارشناختی شباهت بیشتری با یکدیگر داشتند و به طور احتمالی نسبت خویشاوندی نزدیک‌تری با یکدیگر دارند (براساس کلادوگرام این جنس، توالی شماره ۱ و ۲ که از یک جد مشترک مشتق شده نسبت به توالی شماره ۳ جدیدتر است). این تفاوت‌ها در تبارنمای NJ محسوس‌تر از تبارنمای ML است.

را در ایران اشغال کند. براساس طول انشعاب تبارنمای NJ این احتمال وجود دارد که جریان ژن از سمت جمعیت های ایرانی به سمت مصر و جزیره سینا سرازیر شده باشد که در مطالعات آتی باید آزمون شود. درنهایت، استنباط می شود که مکان اولیه سرچشمه گرفتن از مرکز انتشار (Center of origin) این جمعیت به طور احتمالی متفاوت از جمعیت های شمال شرقی ایران است. پیش بینی می شود مرکز انتشار جریان ژن جمعیت های شمال شرقی ایران با توجه به مجاورت جغرافیایی آن با منطقه قفقاز، از طرف جمعیت های خفاش گوش پهن خزری در این ناحیه باشد. تمام گونه های شناخته شده از این جنس، آلپا تریک یا حداقل پارا پاتریک هستند؛ به جز اینکه در منطقه قفقاز و ایران دو گونه متمایز از نظر مورفولوژیک به صورت سیمپاتریک حضور دارند. در سطح سیمای سرزمین، این دو گونه در زیستگاه های متفاوتی دیده می شود (Benda et al., 2012; Kruskop, 2019). با توجه به مجاورت جغرافیایی بین جمعیت های مختلف این جنس در بخش شمالی ایران، پیشنهاد می شود در مطالعات آتی رابطه تبارشناسی و جغرافیای زیستی این جنس بررسی شود.

خفاش های گوش پهن در میان سایر خفاش ها منحصر به فرد هستند و شناسایی آنها براساس صفات ظاهری در هر بخش از محدوده توزیع این جنس کار مشکلی نیست؛ اما تفکیک گونه های مختلف این جنس (به جز گونه اروپایی یا بارباستل غربی) به دلیل شباهت مورفولوژیک کار بسیار مشکلی است (DeBlase, 1980). وضعیت طبقه بندی مشاهده شده در جنس بارباستل به ویژه بارباستل های شرقی بازتابی از مشکلات رایج مورفولوژیک (صفات ریختی ظاهری) در علم

مدل های مختلف، تبارنماهای متفاوتی ایجاد کرده است؛ اما الگوی خوشه بندی مشابهی بین کلادهای *B. leucomelas* و *caspiaca* (با کلاد ایرانی *Barbastella. Qazvin*) ایجاد کرده است که مطمئن خواهیم شد هر دو تبارنما روابط تبارشناختی مشابهی را منعکس می کند. برخلاف فرضیات پیشین (Kruskop, 2015)، الگوی شاخه بندی (توپولوژی) تبارنماهای استنباط شده با استفاده از روش های آماری و مدل های تکاملی مختلف حاکی از این است که درجه خویشاوندی جمعیت های خفاش های گوش پهن ساکن در محدوده شمال و به طور احتمالی غرب ایران به گونه *B. leucomelas* این جنس شباهت بیشتری دارد و از نظر ژنتیکی تاریخچه تکاملی متفاوتی رانسبت به *B. caspiaca* سپری کرده است. براساس طول انشعاب بین تبارنمای به دست آمده با استفاده از روش NJ و تبارنمای به دست آمده با استفاده از روش ML، در مقدار تغییرات تکامل بین نمونه های ایران و خفاش گوش پهن مصری تفاوت چشمگیری وجود دارد. طول انشعاب در تبارنمای ML برای نمونه های ایرانی مقدار تغییرات تکاملی بیشتری رانسبت به تبارنمای NJ نشان می دهد؛ در صورتی که طول انشعاب در تبارنمای NJ نسبت به ML برای گونه خفاش گوش پهن مصری بیشتر از نمونه های ایرانی است. به نظر می رسد این تفاوت ناشی از ماهیت روش های آماری استفاده شده در ترسیم تبارنما است. براساس طول انشعاب تبارنمای ML، این احتمال وجود دارد که جریان ژن های این جمعیت از طریق مهاجرت (انتشار تدریجی) از ناحیه جنوبی توزیع و پراکنش گونه *B. leucomelas* از مصر و جزیره سینا منشأ گرفته و به طور تدریجی به نواحی شمالی گسترش یافته باشد تا زیستگاه های کنونی خود

در مجموع، براساس ماتریس فاصله TrN و مقایسه دو تبارنمای ML و NJ با استفاده از مدل HKY و K₂P، این طور جمع‌بندی می‌شود که تمام این روش‌ها و مدل‌های مختلف آن دلالت بر این دارند که کلنی نمونه برداری شده در محدوده منطقه حفاظت شده الموت شهرستان معلم کلایه استان قزوین از نظر تبارشناختی به گونه *B. leucomelas* تعلق دارد. این گونه برای نخستین بار در ایران گزارش و توصیف می‌شود. بر این اساس، تعداد گونه‌های جنس بارباستل در ایران که تا پیش از این شامل دو گونه خفاش گوش‌پهن اروپایی و خزری (با فرض اینکه جمعیت‌های شمال شرق ایران متعلق به گونه *B. capsica* است) بود، به سه گونه ارتقاء پیدا می‌کند. با توجه به اینکه کلنی ساکن در داخل و مجاور تونل شیرکوه، مهم‌ترین کلنی شناخته شده از جمعیت حال حاضر خفاش گوش‌پهن مصری در ایران است، حفاظت از زیستگاه خوراک جویی و زایشگاه آن در اولویت قرار دارد. با توجه به فعال بودن این تونل و ایجاد آلودگی صوتی توسط خودروهای عبوری و همچنین وجود فعالیت‌های راه‌سازی در محدوده زیستگاه خوراک جویی آن، احتمال بقای کلنی ساکن در تونل و سایر خوابگاه‌های (Roost) شناسایی شده در این زیستگاه، در معرض تهدید جدی قرار دارد. به منظور حفاظت از این گونه کمیاب، مدیران محیط زیست هرچه سریع‌تر باید برنامه حفاظتی ویژه‌ای برای این کلنی طراحی و اجرا کنند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محیط طبیعی سازمان حفاظت محیط زیست به ویژه جناب آقای سیدمحمدرضا حسینی، از اداره محیط زیست شهرستان آبیگ به ویژه

رده‌بندی است؛ همچنین استفاده از ژن میتوکندریایی COI به تنهایی برای ارزیابی دقیق و طبقه‌بندی گونه‌ای یا نام‌گذاری جدید کافی نیست (Kruskop, 2015). به طور معمول برای معرفی گونه‌ها یا زیرگونه‌های جدید و دستیابی به روابط تبارشناختی دقیق‌تر از روش‌های مورفومتریک (Akmalı et al., 2017) همراه با نشانگرهای میتوکندریایی یا نشانگرهای هسته‌ای استفاده می‌شود (Akmalı, 2017). متأسفانه استفاده از داده‌های ریختی (صفات جمع‌های و دندان‌ی) در مطالعات مربوط به طبقه‌بندی گونه‌های کمیاب به دلیل تهاجمی بودن این نوع روش، باعث حذف برخی از افراد جمعیت خواهد شد (Yaghoubirostami et al., 2020). حذف یک یا چند فرد از یک کلنی کوچک منجر به از دست رفتن تنوع ژنتیکی می‌شود. کاهش تنوع ژنتیکی تأثیر زیادی بر پایداری جمعیت در بلندمدت خواهد داشت؛ از این رو به منظور دستیابی به تبارنمای جامع و معتبر پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی از سایر نشانگرهای ژنتیکی مثل Cytb و ND1 (استفاده شده در مطالعات قبلی (Kruskop, 2019; Zhang et al., 2007))، در ترکیب با نشانگر COI، استفاده شود. با توجه به اینکه هدف اصلی در فیلوژنی مولکولی، بازیابی تبارنمایی واقعی برای مجموعه‌ای از توالی‌هاست (Nazemi-Rafie, 2010)، پیشنهاد می‌شود استنباط فیلوژنتیکی با استفاده از روش‌های آماری جدیدتر مثل آمار بی‌زین و با تعداد نمونه بیشتر برای ارزیابی دقیق روابط بین تاکسون‌های این جنس و سایر جمعیت‌های ساکن در ایران استفاده شود.

جمع‌بندی

آقای دکتر صدرالدین علیپور برای تسهیل در اخذ مجوزهای مطالعه و فرآیند نمونه‌گیری سپاسگزاری و قدردانی می‌کنند؛ همچنین از آقایان مصطفی نور استانبولی، میثم مشایخی و دانیال نیری که در مرحله نمونه‌برداری همکاری داشتند و آقای کاوه خسرویانی از شرکت سلول کاوشگر برای همکاری در مرحله استخراج و توالی‌یابی نمونه‌ها سپاسگزاری می‌شود.

جناب آقای محسن خسروآبادی، از جناب آقای عبدالحسین مظفری از بخش معاونت فنی، جناب آقای سیاوش رضازاده از اداره حیات وحش، کارشناسان محترم سرمحیط‌بانی شهرستان معلم کلایه آقایان کیومرث قاسمی و حامد مرادی و همچنین از مدیر کل وقت اداره کل حفاظت محیط زیست استان قزوین جناب آقای حسن عباسی‌نژاد و مدیر کل پیشین جناب

منابع

- Akmali, V. (2017). Phylogeny of the mouse-tailed bats genus *Rhinopoma* (Family: Rhinopomatidae) in Iran based on mitochondrial D-loop gene. *Journal of Animal Environment*, 9(3), 65-72 (in Persian).
- Akmali, V., Esmaili Rineh, S., & Karvand, Z. (2017). Taxonomic status of *Rhinopoma muscatellum* (Chiroptera: Rhinopomatidae) in Iran using morphological characters. *Taxonomy and Biosystematics Journal*, 9(30), 31-50 (in Persian).
- Altringham, J. D. (2011). *Bats, from evolution to conservation*. New York: Oxford University Press.
- Behrooz, R., Kaboli, M., Arnal, V., Nazarizadeh, M., Asadi, A., Salmanian, A., & Montgelard, C. (2018). Conservation below the species level: Suitable evolutionarily significant units among mountain vipers (the *Montivipera raddei* complex) in Iran. *Journal of Heredity*, 109(4), 416-425.
- Benda, P., Dietz, C., Andreas, M., Hotový, J., Lučan, R. K., Maltby, A., & Vallo, P. (2008). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 6. Bats of Sinai (Egypt) with some taxonomic, ecological, and echolocation data on that fauna. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 72(1-2), 1-103.
- Benda, P., Faizolahi, K., Andreas, M., Obuch, J., Reiter, A., Sevcik, M. & Ashrafi, S. (2012). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 10. Bat fauna of Iran. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 76(3-4), 163-582.
- Benda, P., & Mlikovsky, J. (2008). Nomenclatural notes on the Asian forms of *Barbastella* bats (Chiroptera: Vespertilionidae). *Lynx (NS)*, 39(1), 31-46.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., & Das., I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Journal of Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148-155.
- Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., & Upham, N, S. (2018). How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy*, 99(1), 1-14.
- Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A. M., Stamatakis, A., Morel, B., & Flouri, T. (2020). ModeITest-NG: A new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 37(1), 291-294.
- DeBlase, A. F. (1980). The bats of Iran: systematics, distribution, ecology. *Fieldiana Zoology (New Series)*, (4), 1-424.
- Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., & Silvestro, D. (2021). raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Journal of Methods in Ecology and Evolution*, 12(2), 373-377.

- Eick, G. N., Jacobs, D. S., & Matthee, C. A. (2005). A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 22(9), 1869-1886.
- Felsenstein, J. (2003). *Inferring phylogenies*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Foley, N. M., Thong, V. D., Soisook, P., Goodman, S. M., Armstrong, K. N., Jacobs, D. S., ... & Teeling, E. C. (2015). How and why overcome the impediments to resolution: Lessons from rhinolophid and hipposiderid bats. *Journal of Molecular Biology and Evolution*. 32(2), 313-333.
- Gannon, W. (2011). Ecological and behavioral methods for the study of bats. *Journal of Mammalogy*, 92, 475-478.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Drummond, A. (2012). Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Khajeh, A., Mohammadi, Z., Ghorbani, F., & Jahantigh, H. (2020). Molecular and morphometric characterization of fruit bats of the genus *Rousettus* Gray, 1821 (Chiroptera: Pteropodidae) in Iran. *Journal of Zoology in the Middle East*, 67(1), 1-11.
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453-4455
- Kruskop, S. V. (2015). Dark and pale: Taxonomic status of the barbastelle (*Barbastella*: Vespertilionidae, Chiroptera) from Central Asia. *Acta Chiropterologica*, 17(1), 49-57.
- Kruskop, S. V., Kawai, K., & Tiunov, M. P. (2019). Taxonomic status of barbastelle's (Chiroptera: Vespertilionidae: *Barbastella*) from the Japanese archipelago and Kunashir Island. *Journal of Zootaxa*, 4567(3), 461-476.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Mayer, F., Dietz, C., & Kiefer, A. (2007). Molecular species identification boosts bat diversity. *Journal of Frontiers in Zoology*, 4(1), 1-5.
- Nazemi-Rafie, J. (2010). *Tree, phylogenetics and models of molecular evolution*. University of Kurdistan Press (in Persian).
- Pellens, R., & Grandcolas, P. (2016). *Biodiversity conservation and phylogenetic systematics: Preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis*. Berlin: Springer Nature.
- Sikes, R. S., & Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. (2016). Guidelines of the American society of mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy*, 97(3), 663-688.
- Tamura K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526.
- Wilson, D. E., & Reeder, D. M. (Eds.) (2005). *Mammal species of the World: A taxonomic and geographic reference*. Third Edition. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Yaghoubirostami, M., Kami, H. G., Bagherian Yazdi, A. A., & Okhli, N. (2020). First record of Mediterranean horseshoe bat (*Rhinolophus euryale*) in Mazandaran province. *Journal of Animal Environment*, 12(2), 11-20 (in Persian).

- Yusefi, G. H., Faizolahi, K., Darvish, J., Safi, K., & Brito, J. C. (2019). The species diversity, distribution, and conservation status of the terrestrial mammals of Iran. *Journal of Mammalogy*, 100(1), 55-71
- Zeale, M. R., Davidson-Watts, I., & Jones, G. (2012). Home range use and habitat selection by barbastelle bats (*Barbastella barbastellus*): Implications for conservation. *Journal of Mammalogy*, 93(4), 1110-1118.
- Zhang, J. S., Han, N. J., Jones, G., Lin, L. K., Zhang, J. P., Zhu, G. J., ... & Zhang, S. Y. (2007). A new species of *Barbastella* (Chiroptera: Vespertilionidae) from north China. *Journal of Mammalogy*, 88(6), 1393-1403.