



<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 / © 2022

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>

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 به طور 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 زیرواحد ۱، تبارشناسی، استان قزوین.

مقدمه

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.

تاکنون حضور ۵۲ گونه خفاش متعلق به ۹ خانواده گزارش شده است (Yusefi et al., 2019; Khajeh et al., 2020). اگرچه به طور 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., 2018; https://mammaldiversity.org).

* 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.



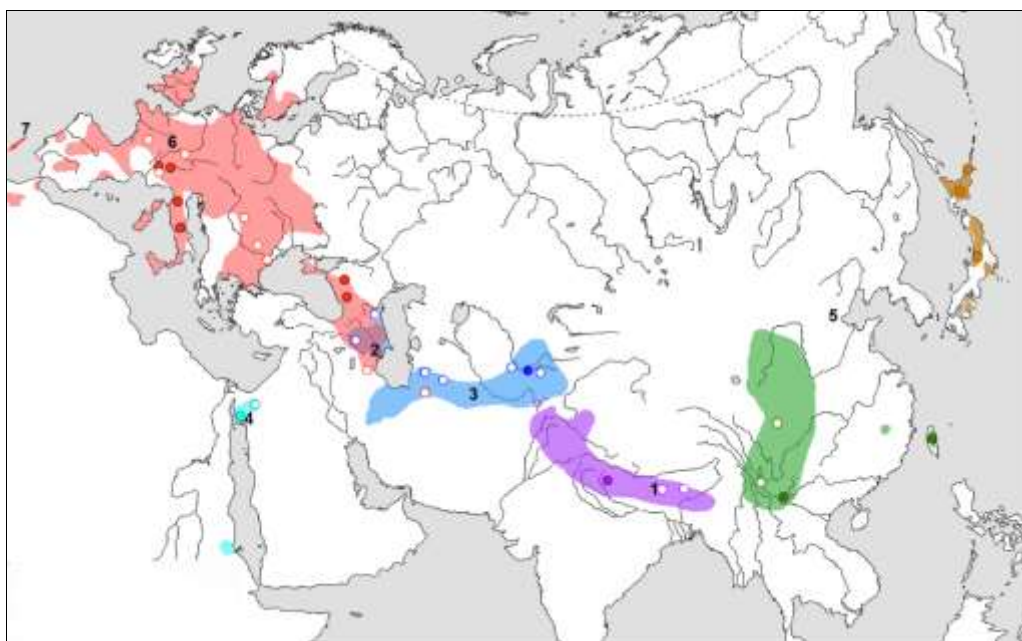
شمال و شمال شرقی آفریقا و همچنین شمال هند و چین در منطقه اورینتال دارد (شکل ۱) (Simmons, 2005). اعضای این جنس در گستره پراکنش خود به ندرت جابه‌جا می‌شوند و به‌طور معمول گستره خانگی محدودی دارند (Zeale *et al.*, 2012). خفاش‌های گوش‌پهن به‌طور عمده در مناطق جنگلی و در زیستگاه‌های با اقلیم به‌نسبت سرد، بناهای انسان‌ساخت از قبیل اماکن مسکونی و متروک، زیر پل‌ها، تونل‌ها و داخل غارها به سر می‌برند. جنس *Barbastella* در ایران از جمله خفاش‌های بسیار کمیاب به شمار می‌آید و نیچ غذایی بسیار تخصصی دارد؛ به گونه‌ای که به‌طور عمده از بیدها تغذیه می‌کند (Benda *et al.*, 2012). محدوده حضور خفاش گوش‌پهن آسیایی براساس شش گزارش به‌دست آمده فقط از نوار شمالی ایران است (Benda *et al.*, 2012). تمام نقاط حضور گونه آسیایی در ایران در منطقه استپ‌های خشک و نیمه‌خشک قرار دارد و از شمال شرق ایران تا رشته‌کوه زاگرس مرکزی امتداد می‌یابد؛ همچنین تاکنون به تعداد کم تنها از استان‌های خراسان رضوی، مرکزی، تهران، سمنان و لرستان گزارش شده است (Benda *et al.*, 2012).

خفاش‌های بارباستل از نظر تنوع تا ۱۰ سال اخیر جنس کوچکی به شمار می‌آمد (Zhang *et al.*, 2007) که تنها از دو گونه خفاش گوش‌پهن غربی یا اروپایی *B. barbastellus* (Schreber 1774) و خفاش گوش‌پهن شرقی یا آسیایی *B. leucomelas* (Cretzschmar, 1826) تشکیل می‌شد. این طبقه‌بندی در سال‌های اخیر به کلی دگرگون شده و در حال حاضر تعداد گونه‌های آن به شش گونه رسیده است؛ به طوری که الگوی توزیع و پراکنش این جنس را در محدوده پالتارکتیک تغییر داده است (شکل ۱). به‌طور خاص در

زیرراسته کلان‌خفاش‌ها (Megachiroptera) و خردخفاش‌ها (Microchiroptera) رده‌بندی می‌شود، به‌تازگی براساس تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی، این رده‌بندی تغییر کرده است. براساس رده‌بندی قدیم در ایران تنها دو گونه خفاش میوه‌خوار مصری (*Rousettus aegyptiacus*) و خفاش میوه‌خوار Leschenault's (*Rousettus leschenaultii*) متعلق به زیرراسته کلان‌خفاش‌ها بود و بقیه به زیرراسته خردخفاش‌ها تعلق داشت؛ در حالی که در رده‌بندی جدید، خانواده‌های خفاش میوه‌خوار، خفاش دم‌موشی، خفاش بینی‌برگه‌ای، خفاش نعل‌اسبی و خانواده جدید *Rhinonycteridae* در زیرراسته Pteropodiformes یا *Yinpterochiroptera* و خانواده‌های خفاش دم‌آزاد، خفاش دم‌غلاف‌دار، خفاش شامگاهی و خفاش بال‌خمیده در زیرراسته *Vespertilioniformes* یا *Yangochiroptera* قرار می‌گیرد (Eick *et al.*, 2005; Foley, *et al.*, 2015)؛ همچنین گسترش مطالعات فیلوژنی در سال‌های اخیر منجر به کشف گونه‌های پنهان (Cryptic) بسیاری در این راسته شده است (Altringham, 2011; Burgin *et al.*, 2018). خفاش‌های گوش‌پهن (*Barbastelle*) متعلق به جنس *Barbastella* از خانواده خفاش‌های شامگاهی (*Vespertilionidae*) هستند. خانواده خفاش‌های شامگاهی متعلق به زیرراسته *Yangochiroptera* و بزرگ‌ترین خانواده این زیرراسته است که تاکنون مطالعات بوم‌شناختی، رده‌بندی و فیلوژنی گسترده‌ای درباره آن انجام شده است (Mayer *et al.*, 2007). جنس *Barbastella* پراکنندگی بسیار گسترده‌ای در نواحی معتدل و نیمه‌گرمسیری در منطقه پالتارکتیک از انگلستان در غرب اروپا تا ژاپن و تایوان در شرق آسیا،

گوش پهن در ایران به دو گونه خفاش گوش پهن خزری (*Barbastella caspica* Satunin, 1908) و خفاش گوش پهن اروپایی (*Barbastella barbastellus* (Schreber, 1774) منصوب می شود. با توجه به اینکه خفاش های گوش پهن از نظر جغرافیایی دارای جمعیت های منزوی هستند، احتمال وجود گونه های پنهان (Cryptic) در میان جمعیت های مختلف آن زیاد است؛ همچنین فرآیند گونه زایی (Speciation) در این جنس در مطالعات پیشین مطرح شده است (Kruskop, 2019)؛ علاوه بر این برنامه ریزی های حفاظتی براساس نیازهای اکولوژیک گونه هایی انجام می شود که از نظر تکاملی جدا شده اند (Behrooz et al., 2018)؛ بنابراین شناسایی گونه های پنهان نقش به سزایی در مدیریت و حفاظت از گونه های کمیاب خفاش هایی خواهد داشت که به تازگی توصیف شده اند (Bickford et al., 2007)؛ این مطالعه با هدف رفع ابهامات رده بندی و همچنین بازسازی درخت تبارشناختی جمعیت های جنوبی گستره توزیع و پراکنش (شمال و غرب ایران) خفاش گوش پهن خزری انجام شد (شکل ۱). در این پژوهش تلاش شد با استفاده از ژن میتوکندریایی COI که ژنی متداول در مطالعات آرایه شناسی مولکولی جانوران است و از آن در مطالعات قبلی فیلوژنی گونه های این جنس استفاده شده است (Kruskop, 2015)، ابهامات موجود بررسی شود.

سال ۲۰۰۷ گونه ای جدید با نام خفاش گوش پهن پکنی (*B. beijingensis*) توسط Zhang و همکارانش در شمال شرق چین توصیف شد؛ همچنین فرم مصری (عربی) گونه *B. leucomelas* که به طور عمده در مصر، شبه جزیره سینا، عربستان سعودی و اریتره در شمال آفریقا زندگی می کند، در سطح گونه از سایر جمعیت های آسیایی آن جدا شد (Benda and Mlikovsky, 2008). در سال ۲۰۱۵ Kruskop با بررسی داده های ریخت شناسی و ژنتیک جمعیت های باقی مانده آسیای مرکزی و قفقاز جنوبی که در قالب نام خفاش گوش پهن آسیایی (*B. darjelingensis*) شناخته می شد، گونه ای جدید را با نام خفاش گوش پهن خزری توصیف کرد. نتایج این بررسی نشان داده است افراد جمعیت های آسیای مرکزی را نمی شود گونه *B. darjelingensis* در نظر گرفت؛ بلکه آنها متعلق به گونه ای جداگانه است که شباهت بیشتری با گونه مصری *B. leucomelas* دارد؛ اما از نظر ریخت شناسی با آن متفاوت است. جثه و اندازه خفاش گوش پهن خزری بزرگ تر از گونه مصری است. Kruskop (۲۰۱۵) براساس مجاورت جغرافیایی جمعیت های این گونه در محدوده دریای خزر و قفقاز جنوبی نام آن را *Barbastella caspica* Satunin, 1998 انتخاب کرد. یافته های اخیر در رده بندی اعضای این جنس سبب شده است تا لزوم بازنگری در روابط تبارشناختی جمعیت های ایرانی آن، بیش از پیش احساس شود. براساس مطالعات Kruskop (۲۰۱۵) و Benda و همکاران (۲۰۰۸) جمعیت های مختلف خفاش های



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 حفاظت شده 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 دیواره 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 درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه بود. در نهایت، بسط آنزیمی ۷۲ درجه 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) رنگ آمیزی شد. در کنار نمونه‌ها از نشانگر وزن مولکولی (SMOBIO, Thailand) DM2300 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 محدوده منطقه حفاظت‌شده الموت شرقی استان قزوین، برای استخراج DNA استفاده شد. برای استخراج DNA، نمونه در بافر هضم‌کننده حاوی دو درصد SDS، ۵۰۰ میکرولیتر بافر STE (pH = 8) و ۲۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K به مدت سه ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. فرآیند جداسازی با فنل / کلروفرم / ایزوآمیل الکل (۱/۲۴/۲۵) در دو مرحله (هر بار ۵۰۰ میکرولیتر اضافه و بعد از سانتریفوژ لایه 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	reference
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 نرم‌افزار 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 نرم‌افزار raxmlGUI 2.0.5 و نرم‌افزار MEGA X استفاده شد (Kozlov *et al.*, 2019; 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 نی (Tamura and Nei) (TrN) با نرخ‌های جایگزینی هم‌خانواده و غیرهم‌خانواده (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 توالی‌یابی (ABI3730xl (Macrogene, Korea) از دو طرف (F و R) صورت گرفت. توالی‌های ab1 در نرم‌افزار 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) بر آورده 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.

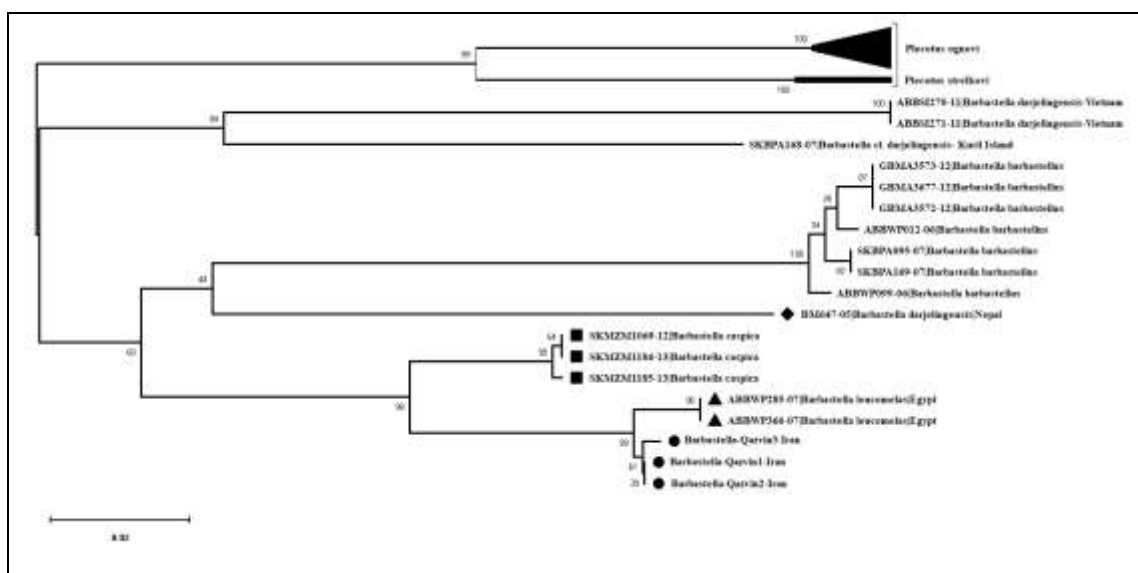
به منظور استنباط روابط تبارشناختی جمعیت ایرانی خفاش گوش پهن در ارتباط با سایر گونه‌های مختلف جنس *Barbastella* و مقایسه درخت فیلوژنی آن با درخت فیلوژنی Kruskop (۲۰۱۵) از روش Neighbor-Joining با استفاده از مدل دو پارامتری کیمورا (Kimura 2-parameter) با نرخ‌های جایگزینی هم‌خانواده و غیر هم‌خانواده (transition + 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 در بردارنده گپ و داده‌های از دست رفته (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-PTHREADS-SSE3.exe در نرم‌افزار RAXML GUI 2.0.5 (Edler *et al.*, 2020) استفاده شد.

جدول ۲- ماتریس فاصله TrN و خطای استاندارد ۱۹ توالی از جنس خفاش‌های گوش‌پهن 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	0.00	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	0.00	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	GBMA1677-12 <i>Barbastella barbastellus</i>	0.01	0.01	0.00	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	0.00	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	0.00	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	0.00	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	0.00	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 darjilingensis</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	0.02
9	ABBWP166-07 <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	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	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	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
11	ABBS1270-11 <i>Barbastella darjilingensis</i> -Vietnam	0.25	0.25	0.25	0.26	0.26	0.26	0.26	0.20	0.23	0.21	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
12	ABBS1271-11 <i>Barbastella darjilingensis</i> -Vietnam	0.25	0.25	0.25	0.26	0.26	0.26	0.26	0.20	0.23	0.21	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
13	SKBPA168-07 <i>Barbastelladarjilingensis</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	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	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	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	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	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	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	0.00

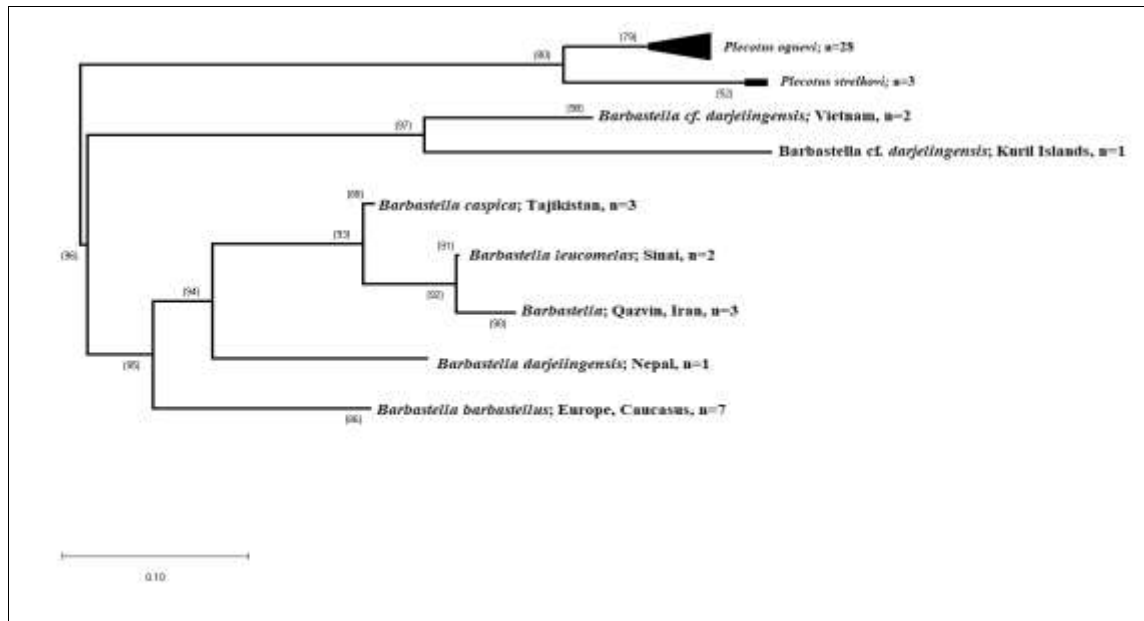
توپولوژی حاصل از ترسیم تبارنمای Neighbor-Joining به روش فاصله K₂P، وجود دو کلاد اصلی و شش خوشه فرعی را نشان داد. در کلاد اول جمعیت‌های ویتنام و جزایر کوریل و بقیه جمعیت‌ها در کلاد دوم قرار گرفته است. جمعیت‌های ایرانی در خوشه مربوط به گونه *B. leucomelas* قرار گرفته است.

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 خوشه‌بندی هر تاکسون در ۱۰ هزار تکرار بوت‌استرپ در مجاورت هر شاخه نشان داده شده است.

شکل ۳- درخت فیلوژنتیک Neighbor-Joining مربوط به خفاش‌های جنس *Barbastella* براساس ژن میتوکندریایی COI

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

به‌منظور 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

به‌منظور 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 به‌صورت آماری فراهم می‌کند (Felsenstein, 2003; Edler et al., 2020). نتایج نشان داد استنباط فیلوژنتیک به‌دست 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 به‌طور 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 جمعیت‌های ایرانی به سمت مصر و جزیره سینا سرازیر شده باشد که در مطالعات آتی باید آزمون شود. در نهایت، استنباط می‌شود که مکان اولیه سرچشمه گرفتن از مرکز انتشار (Center of origin) این جمعیت به‌طور احتمالی متفاوت از جمعیت‌های شمال شرقی ایران است. پیش‌بینی می‌شود مرکز انتشار جریان ژن جمعیت‌های شمال شرقی ایران با توجه به مجاورت جغرافیایی آن با منطقه قفقاز، از طرف جمعیت‌های خفاش گوش‌پهن خزری در این ناحیه باشد. تمام گونه‌های شناخته‌شده از این جنس، آلپاتریک یا حداقل پاراپاتریک هستند؛ به‌جز اینکه در منطقه قفقاز و ایران دو گونه متمایز از نظر مورفولوژیک به‌صورت سیمپاتریک حضور دارند. در سطح سیمای سرزمین، این دو گونه در زیستگاه‌های متفاوتی دیده می‌شود (Benda et al., 2012; Kruskop, 2019). با توجه به مجاورت جغرافیایی بین جمعیت‌های مختلف این جنس در بخش شمالی ایران، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی رابطه تبارشناسی و جغرافیای زیستی این جنس بررسی شود.

خفاش‌های گوش‌پهن در میان سایر خفاش‌ها منحصر به فرد هستند و شناسایی آنها براساس صفات ظاهری در هر بخش از محدوده توزیع این جنس کار مشکلی نیست؛ اما تفکیک گونه‌های مختلف این جنس (به‌جز گونه اروپایی یا بارباستل غربی) به دلیل شباهت مورفولوژیک کار بسیار مشکلی است (DeBlase, 1980). وضعیت طبقه‌بندی مشاهده‌شده در جنس بارباستل به‌ویژه بارباستل‌های شرقی بازتابی از مشکلات رایج مورفولوژیک (صفات ریختی ظاهری) در علم

مدل‌های مختلف، تبارنامه‌های متفاوتی ایجاد کرده است؛ اما الگوی خوشه‌بندی مشابهی بین کلادهای *B. caspica* و *B. leucomelas* با کلاد ایرانی (*Barbastella. Qazvin*) ایجاد کرده است که مطمئن خواهیم شد هر دو تبارنامه روابط تبارشناختی مشابهی را منعکس می‌کند. برخلاف فرضیات پیشین (Kruskop, 2015)، الگوی شاخه‌بندی (توپولوژی) تبارنامه‌های استنباط‌شده با استفاده از روش‌های آماری و مدل‌های تکاملی مختلف حاکی از این است که درجه خویشاوندی جمعیت‌های خفاش‌های گوش‌پهن ساکن در محدوده شمال و به‌طور احتمالی غرب ایران به گونه *B. leucomelas* این جنس شباهت بیشتری دارد و از نظر ژنتیکی تاریخچه تکاملی متفاوتی را نسبت به *B. caspica* سپری کرده است. براساس طول انشعاب بین تبارنمای به‌دست آمده با استفاده از روش NJ و تبارنمای به‌دست آمده با استفاده از روش ML، در مقدار تغییرات تکامل بین نمونه‌های ایران و خفاش گوش‌پهن مصری تفاوت چشمگیری وجود دارد. طول انشعاب در تبارنمای ML برای نمونه‌های ایرانی مقدار تغییرات تکاملی بیشتری را نسبت به تبارنمای NJ نشان می‌دهد؛ در صورتی که طول انشعاب در تبارنمای NJ نسبت به ML برای گونه خفاش گوش‌پهن مصری بیشتر از نمونه‌های ایرانی است. به نظر می‌رسد این تفاوت ناشی از ماهیت روش‌های آماری استفاده‌شده در ترسیم تبارنامه است. براساس طول انشعاب تبارنمای ML، این احتمال وجود دارد که جریان ژن‌های این جمعیت از طریق مهاجرت (انتشار تدریجی) از ناحیه جنوبی توزیع و پراکنش گونه *B. leucomelas* از مصر و جزیره سینا منشأ گرفته و به‌طور تدریجی به نواحی شمالی گسترش یافته باشد تا زیستگاه‌های کنونی خود

در مجموع، براساس ماتریس فاصله TrN و مقایسه دو تبارنمای ML و NJ با استفاده از مدل HKY و K₂P، این‌طور جمع‌بندی می‌شود که تمام این روش‌ها و مدل‌های مختلف آن دلالت بر این دارند که کلنی نمونه‌برداری شده در محدوده منطقه حفاظت‌شده 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 شناخته‌شده از جمعیت حال حاضر خفاش گوش‌پهن مصری در ایران است، حفاظت از زیستگاه خوراک‌جویی 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 خوراک‌جویی 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 به‌ویژه جناب آقای سیدمحمدرضا حسینی، از اداره محیط زیست شهرستان آبیگ به‌ویژه

رده‌بندی است؛ همچنین استفاده از ژن میتوکندریایی COI به‌تنهایی برای ارزیابی دقیق و طبقه‌بندی گونه‌ای یا نام‌گذاری جدید کافی نیست (Kruskop, 2015). به‌طور 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 جمجمه‌ای و دندان‌ی) در مطالعات مربوط به طبقه‌بندی گونه‌های کمیاب به‌دلیل 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 به‌منظور دستیابی به تبارنمای جامع و معتبر پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی از سایر نشانگرهای ژنتیکی مثل Cytb و ND1 (استفاده‌شده 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). ModelTest-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.