بررسی ارتباط ژنتیکی بین جمعیتهای خفاش گوش موشی کوچک (*Myotis blythii*) شمال دشت بین النهرین و کوههای زاگرس میانی در غرب ایران

جعفر وطن دوست[۱و۳]، محمد رضا زمانی*[۲]، مصطفی مطلبی[۲] و مظفر شریفی[۳]

[۱] سبزوار، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۳] کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم، مرکز مطالعات محیط زیست

تاریخ دریافت ۸۵/٤/۲٤ تاریخ پذیرش:۸٦/۳/۲۰

چکیده

خفاش گوش موشی کوچک *Myotis blythii* (خانواده Vespertionidae) بزرگترین گونه جنس *Myotis* در ایران محسوب می شود. مطالعات صورت گرفته در مورد ویژگیهای ریختی این خفاش در مناطق مختلف ایران تفاوتهای قابل توجهی را نشان می دهد. تفاوتهای روشنی در شرایط اکولوژیک شمال دشت بین النهرین و زاگرس میانی وجود داشته و بنظر می رسد این تفاوتها باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی در ویژگیهای ریختی خفاش گوش موشی کوچک شود. در این مطالعه تعداد ۲۹ صفت مورفولوژیک و نیز توالیهای DNA سیتوکروم b میتوکندریایی جهت مطالعه و بررسی تفاوت موجود در جمعیتهای *Myotis blythii* ایرانی این دو محیط مورد استفاده قرار گرفت. قسمتی از ژن سیتوکروم DNA b میتوکندریایی نمونه های پرده بین انگشتی خفاشهای زنده با استفاده از دو آغازگر طراحی شده، تکثیر و سپس تعیین توالی شد تا مرزهای ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیک درون جمعیتهای خفاش گوش موشی کوچک *Myotis blythii* این دو منطقه مشخص شود. مقایسه بین اندازه جمجه نمونه های جمع آوری شده در این دو منطقه نشان داد که برخی از صفات مورفولوژیک دارای اختلاف معنی دار در جمعیتهای متفاوت می باشند. با این وجود براساس میانگین ضریب تغییرات (Coefficient of Variation,CD) بدست آمده مشخص شد که جمعیتهای این دو منطقه همپوشانی خوبی داشته و در سطح زیرگونه از هم جدا نمی شوند. آنالیز ملکولی توالیهای DNA بدست آمده از ژن سیتوکروم b و بررسیهای فیلوژنتیک در برنامه PHYLIP نشان داد که نمونه های کوههای زاگرس میانی و شمال دشت بین النهرین یک مقام تاکسونومیک را مشخص نمی کند. در حقیقت آنالیزهای ژنتیکی نشان داد که جمعیتهای این دو منطقه از نظر ژنتیکی، علیرغم وجود تفاوت در شرایط اکولوژیک، از یکدیگر قابل تشخیص نیستند.

واژه های کلیدی: PCR، سیتوکروم b، PHYLIP و *Myotis blythii*

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٤٤٥٨٠٣٦٣، پست الکترونیک:zamani@nigeb.ac.ir

مقدمه

برای مطالعه و دسته بندی موجودات از جمله خفاشها، مارکرهای مختلفی مانند مارکرهای مورفولوژیک (۱۵، ۱٦، ۱۷ و ۲۳)، مارکرهای پروتئینی (۲٦) و مارکرهای مبتنی بر DNA (۲، ۱۹ و ۲۰) مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده از مارکرهای مورفولوژیک یک روش متداول در طبقه بندی خفاشها می باشد. مطالعات مورفولوژیک در خصوص خفاش گوش موشی کوچک (*Myotis blythii*) در کشورهای مختلف و از جمله ایران انجام شده است (٦، ۸ و ۲۲). اخیراً از مطالعات ملکولی در کنار مطالعات مورفولوژیک برای تعیین وضعیت تاکسونومیک دقیق

Archive of SID
www.SID.ir

خفاشها استفاده می شود (١٤، ١٨ و ٢٠). در اکثر این مطالعات از مارکرهای مبتنی بر DNA استفاده می گردد و استفاده از سیتوکروم b متداولترین روش در این بررسیها می باشد (٧، ١٠، ١٤، ١٨، ١٩ و ٢٠).

خفاش گوش موشی کوچک (*Myotis blythii*) در پاله ارکتیک غربی و جنوبی تا شبه قاره هند گزارش شده است (٦). این خفاش دارای گسترش جغرافیایی وسیعی از شمال آفریقا، اروپا تا شرق آسیا است. خفاش گوش موشی کوچک (*Myotis blythii*) خفاشی است با اندازه متوسط که بزرگترین گونه جنس *Myotis* در ایران است. گزارشهای *Myotis blythii* در مورد ایران موقعیتهای زیادی از این خفاش را در شمال و غرب مشخص کرده است (٦). اولین نمونه خفاش گوش موشی کوچک در ایران از دربند (٧٥ کیلومتری غرب اصفهان) بوسیله توماس جمع آوری شده (٢٤) و بغلط آنرا بعنوان یک زیرگونه *Myotis myotis omari* توصیف کرده است (٦). این گونه (خفاش گوش موشی بزرگ) پراکنشی اساساً اروپایی دارد و در غرب و شرق ترکیه گزارش شده است. خفاش گوش موشی بزرگ *Myotis myotis* گونه همزاد خفاش *Myotis blythii* بوده و در شمال آفریقا و اروپا وجود دارد و در ایران هرگز گزارش نشده است (٣).

Cheesman در سال ١٩٢١ (٥) برپایه ٤ نمونه جمع آوری شده از شیراز، یک زیرگونه جدید *Myotis risorius myotis* را معرفی کرد. Harison و Lewis در سال ١٩٦١ (٨) نشان دادند که دو زیرگونه *omari* و *risorius* متعلق به *Myotis myotis* نبوده و جزء *Myotis blythii* هستند. DeBlase در سال ١٩٨٠ با بررسی ١٦٩ نمونه *Myotis blythii* از مناطق مختلف ایران نشان داد که *Myotis blythii risorius* مترادف با *Myotis blythii omari* می باشد و همچنین مشخص کرد که انواع ایرانی این خفاش به زیرگونه *Myotis blythii omari* تعلق دارد (٦). این موضوع توسط چندین نویسنده (٢٣ و ٢٥) تأیید شده است. مطالعات صورت گرفته در مورد تفاوتهای مورفولوژیک خفاش گوش موشی کوچک در زاگرس غربی می تواند از طریق انجام مطالعات مشابه در زمینه های ژنتیکی در جمعیتهای مجزای این خفاش کامل گردیده و احتمالاً پاسخی روشن به وضعیت تاکسونومیک جمعیتهای این گونه در ایران باشد.

مواد و روشها

مورفولوژی: خفاشهای *Myotis blythii* برای مطالعه مورفولوژی از دو غار کیله سفید(٤٠°٣٤′ شمالی و ٤٥°٥٢′ شرقی) و ماهیدشت (٣٣°، ٢٣′ شمالی و ٤٧°، ٣٠′ شرقی) در استان کرمانشاه است. در این مطالعه برای بررسیهای مورفومتری ٢٩ صفت جمجمه ای در ٤١ خفاش *M. blythii* اندازه گیری شد. برای اندازه گیری این صفات از کولیس دیجیتال استفاده گردید. این صفات (جدول ١) در مقالات Benda (١) و DeBlase (٦) توصیف شده است.

جدول ١- صفات مورفولوژیکی مورد استفاده در این تحقیق

نام صفت Attribute	معادل انگلیسی	تعریف صفت
GL	Greatest length of skull	بیشترین طول جمجمه: از حاشیه جلویی دندان پیش تا برجستگی عقبی استخوان پس سری
CBL	Condylobasal length	طول کندیلوبازال: از حاشیه جلویی دندان پیش تا برجستگی عقبی کندیل های پس سری
CCL	Condylocanine length	کندیلوکناین: از حاشیه جلویی دندان نیش تا برجستگی عقبی کندیل های پس سری
ONL	Occipitonasal length	فاصله بین پایه بینی تا پشت سر

Archive of SID

www.SID.ir

WC^1-C^1	Anterior width of rostrum	فاصله مابین دو دندان نیش در فک بالا
WM^3-M^3	Posterior width of rostrum	فاصله مابین دو دندان آسیای سوم در فک بالا
ZB	Zygomatic breadth	پهنای زیگوماتیک: پهن ترین بخش لبه خارجی کمانهای زیگوماتیک
IW	Interorbital width	پهنای بین حدقه ای: کمترین فاصله مابین دو حدقه چشم
MB	Mastoid breadth	پهنای ماستوئیدی: بیشترین پهنای جمجمه در محل برجستگیهای ماستوئیدی
HBS	Height of the skull over the bullae	ارتفاع جمجمه: بلندترین ارتفاع جمجمه از بالاترین قسمت جمجمه تا پائین ترین بخش صندوق صماخ
LC^1-M^3	Length of C^1-M^3	طول C1-M3 : از حاشیه جلویی دندان نیش تا حاشیه عقبی آخرین دندان آسیا در فک بالا
LM^1-M^3	Length of M^1-M^3	طول M1-M3 : از حاشیه جلویی اولین دندان آسیا تا حاشیه عقبی آخرین دندان آسیا در فک بالا
LC^1-P^4	length of C^1-P^4	طول C1-P4: از حاشیه جلویی دندان نیش تا حاشیه عقبی آخرین دندان پیش آسیا (پری مولار) در فک بالا
LP^3	Length of P^3	طول آخرین دندان پیش آسیا (پری مولار) در فک بالا
WP^3	Width of P^3	عرض آخرین دندان پیش آسیا (پری مولار) در فک بالا
INFO	Infraorbital Breadth	پهنای اینفرا اوربیتال: فاصله مابین دو سوراخ اینفرا اوربیتال
LI^1-M^3	Length of I^1-M^3	طول I1-M3 : از حاشیه جلویی دندان پیش تا حاشیه عقبی آخرین دندان آسیا در فک بالا
LMD	Length of mandible	بیشترین طول فک پائین
LI_1_M_3	Length of I_1–M_3	طول I1-M3 : فاصله مابین قدامی ترین بخش دندان پیش تا خلفی ترین قسمت دندان آسیای سوم در فک پائین
WP^4_P^4	Width of P^4-P^4	عرض P4-P4: عرض آخرین دندان پیش آسیا (پری مولار) در فک بالا
LM_1_M_3	Length of M_1-M_3	طول M1-M3 : فاصله مابین قدامی ترین بخش اولین دندان آسیا تا خلفی ترین قسمت دندان آسیای سوم در فک پائین
LC_1_M_3	Length of C_1-M_3	طول C1-M3 : فاصله مابین قدامی ترین بخش دندان نیش تا خلفی ترین قسمت دندان آسیای سوم در فک پائین
LP_4_M_3	Length of P_4-M_3	طول P4-M3 : فاصله مابین آخرین دندان پیش آسیا (پری مولار) تا خلفی ترین قسمت دندان آسیای سوم در فک پائین
HPC	Height of processus coronoideus	ارتفاع زوائد کرو نوئید
LC_1_P_4	Length of C_1-P_4	طول C1-P4: از حاشیه جلویی دندان نیش تا حاشیه عقبی آخرین دندان پیش آسیا (پری مولار) در فک پائین
LP_2_P_4	Length of P_2-P_4	طول P2-P4: از حاشیه جلویی اولین دندان پیش آسیا (پری مولار) تا حاشیه عقبی آخرین دندان پیش آسیا (پری مولار) در فک پائین
LM_1_M_2	Length of M_1 –M_2	طول M1-M2 : ازلبه اولین دندان آسیا تا خلفی ترین لبه دومین

Archive of SID

www.SID.ir

دندان آسیا در فک پائین		
طول C1-M1 : از قدامی ترین حاشیه دندان نیش تا خلفی ترین لبه اولین دندان آسیا در فک پائین	Length of $C_1 - M_1$	$LC_1_M_1$
پهنای صندوق مغزی: پهنای صندوق مغزی درست در پشت محل اتصال کمانهای زیگوماتیک	Breadth of braincase	BBC

آنالیزهای انجام شده با برنامه های آماری Excel (version XP) و SPSS (version 11.5) صورت گرفته است. بمنظور ارزیابی میزان دقت اندازه گیریهای صورت گرفته و صحت اطلاعات، ضریب تغییرات (Coefficient of variation, CV) صفات اندازه گیری شده برای هر میانگین محاسبه شده است. معنی دار بودن تفاوتهای مشاهده شده در صفات ریختی و جمجمه ای در جمعیتهای مختلف *M. blythii* همچنین با مقایسه آماری هر یک از گروههای متعلق به مکانهای مختلف با استفاده از اطلاعات آنالیز تی تست (T-test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد بررسی شد. ارزیابی تفاوتها در صفات جمجمه ای و مقایسه میزان تغییرپذیری و همپوشانی صفات با اندازه گیری C.D (Coefficient of difference) انجام شد.

ملکولی: نمونه های خفاش گوش موشی کوچک از دو غار کیله سفید و ماهیدشت جمع آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق جهت استخراج DNA از تکنیک پانچ بال خفاش استفاده شد. محل پانچها از مناطق با رگهای کم یا فاقد رگ انتخاب، و با یک بیوپسی از هر بال خفاش انجام شد. پانچهای بیوپسی در تیوپهای شامل بافر حفاظت کننده بافت یا اتانول قرار داده شد (۲۷).

استخراج Total DNA از پانچهای بال از طریق روش تغییریافته Sambrook (۲۱)، و واکنش PCR قطعه ای از ژن سیتوکروم b با استفاده از دو پرایمر L15162 و H15915 (۱۲) برای هر نمونه انجام شد. PCR اختصاصی با استفاده از Total DNA در مخلوط واکنشی به حجم ۵۰µl شامل DNA 20 ng ژنومی استخراج شده از پانچ بال، ۵µl بافر 10 X PCR، ۱/۵ µl $MgCl_2$ ۵۰ mM، ۱ µl dNTP ۱۰ mM، ۲ µl محلول mM ۰/۲ هر پرایمر، ۲/۵ واحد آنزیم Taq polymerase انجام شد. شرایط دمایی بهینه واکنش PCR شامل دمای denaturation، ۹٤ درجه سانتی گراد بمدت ۹۰ ثانیه، دمای annealing، ۵۲ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه و دمای extension، ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ٦۰ ثانیه در ۳۰ سیکل است.

تأئید قطعه DNA تکثیر شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیمهای برش دهنده (Restriction enzymes) *EcoRV* و *Nde I* صورت گرفت. سپس خالص سازی DNA محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص High Pure DNA Purification انجام گردید و نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت M.W.G آلمان فرستاده شد. Alignment این توالیها با برنامه ClustalW صورت گرفت و برای تعیین درصد همولوژی، تک تک توالیها در بانک ژنی NCBI، BLAST Search گردیدند. جهت تجزیه و تحلیل نمونه های بدست آمده و رسم دندوگرام از برنامه نرم افزاری PHYLIP (version 3.6) استفاده گردید. در برنامه نرم افزاری PHYLIP بسته به اینکه از چه روش آنالیزی [حداکثر پارسیمونی (Maximum Parsimony)، همسایگی (Neighbor-Joining) و حداکثر شباهت (Likelihood Maximum)] استفاده شود منطق آنالیز اطلاعات متفاوت بوده و دندروگرامهای مختلفی حاصل می شود.

نتایج و بحث

برای مطالعه و دسته بندی موجودات از جمله خفاشها از مارکرهای مختلفی مانند مارکرهای مورفولوژیکی استفاده شده است (۱۵، ۱٦، ۱۷ و ۲۳). با توجه به اینکه تفاوتهای جغرافیایی در جمعیتهای جدا افتاده بطور عام انجام می

Archive of SID

www.SID.ir

شود، لذا وضعیت دقیق جمعیت خفاشهای گوش موشی کوچک در مناطق مختلف موضوع بررسی تاکسونومیستهای متعددی بوده است. تفاوتهای دیده شده در جمعیتهای این خفاش در پال ارکتیک غربی تا مناطق ماوراء قفقاز شناخته شده است (۱). براساس یافته های Benda و Horacek (۱۹۹۵)(۱)، در این جنس گرایشی در افزایش جثه از غرب اروپا تا آسیای میانه دیده می شود. تنوع جغرافیایی در جمعیتهای مختلف *Myotis blythii* در پاله ارکتیک غربی نیز مطالعه شده است. این مطالعات نشان داده است که الگوی کلی افزایش اندازه در *Myotis blythii* در مقیاسهای خیلی بالا (اروپای غربی تا مدیترانه شرقی) نیز وجود دارد و در حقیقت افزایش کلی در اندازه را از غرب به شرق را نشان می دهند. مطالعات مورفولوژیکی در خصوص خفاش گوش موشی کوچک (*Myotis blythii*) در کشورهای مختلف از جمله ایران وجود دارد (٦، ۸ و ۲۲).

هدف از این مطالعه ارزیابی الگوهای اصلی تنوع جغرافیایی در جمعیتهای ایرانی خفاش *Myotis blythii* در شمال دشت بین النهرین (غار کیله سفید) و زاگرس میانی (ماهیدشت) می باشد. هرچند این تحقیق برپایه یک نمونه برداری گسترده از خفاش *Myotis blythii* استوار نیست، اما ممکن است راهنمای مفیدی برای مطالعات بعدی جمعیتهای حاشیه ای این خفاش در غرب ایران باشد. انتخاب جمعیتهایی از این خفاش در دو منطقه بین النهرین شمالی و زاگرس میانی از میان حوضه پراکنش گسترده این خفاش در طول زاگرس با هدف کمترین تعداد نمونه برداری از جمعیتها با بیشترین تفاوت های ممکن، صورت گرفته است. از آنجا که منطقه سرپل ذهاب (غار کیله سفید) و کرمانشاه (غار ماهیدشت) در دو سوی یک شیب محیط زیستی کلان با شرایط اکولوژیک متفاوت از جمله آب و هوای کاملاً متفاوت واقع شده است (۹) انتظار می رود که تفاوتهای فیلوژنتیکی در سطح زیرگونه بین این دو جمعیت مشاهده شود. لذا در این تحقیق با استفاده از صفات مورفولوژیک و خصوصیات ملکولی نمونه های جمع آوری شده از این دو منطقه این مسئله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مطلعه مورفولوژی: بررسی نمونه های جمع آوری شده به شرح زیر است. تعداد نمونه های مورد مطالعه از دو غار کیله سفید و ماهیدشت بترتیب ۲۳ و ۱۸ نمونه می باشد. محاسبه ضریب تغییرات صفات بدلیل کوچک بودن مقدار عددی اکثر CV ها (جدول ۲) حاکی از یکسانی اطلاعات و پراکندگی کم آنها است. در این مطالعه از آنالیز T-test و $P< 0.05$ برای انجام مقایسه جفت داده های میانگینهای تک تک صفات در نمونه های دو غار ماهیدشت و کیله سفید استفاده شده است. شاخص P اکثر صفات بیشتر از ۰/۰۵ است و اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد. بنابراین مقدار عددی میانگین بدست آمده برای این صفات صحیح است. مقادیر مربوط به ضریب اختلاف (CD) بمنظور نشان دادن میزان تغییرات جغرافیایی در جمعیتهای مجزا نیز محاسبه شد. در یک توزیع نرمال از لحاظ تئوری، CD=1 بیانگر ۸٤ درصد عدم همپوشانی بین جمعیتهای مختلف است و از طرفی در ۱۹۷۱ Mayer (۱۷) پیشنهاد نمود در دو جمعیت متفاوت که CD میانگین آنها از ۱/۲۸ بگذرد تمایز نمونه ها در سطح زیرگونه موجه بنظر می رسد. بنابراین چون میانگین CD برای همه صفات بدست آمده از این مطالعه ۰/۱۷۳ می باشد و ازطرفی این مقدار CD از کمترین مقدار CD جدول Mayer (۰/٦۷۵) نیز کمتر است (جدول ۳) بنابراین مؤید همپوشانی قابل توجه آنها می باشد.

مطالعه ملکولی: اخیراً از مطالعات ملکولی در کنار مطالعات مورفولوژیکی برای تعیین وضعیت تاکسونومیک دقیق خفاشها استفاده می شود. در اکثر این مطالعات از مارکرهای مبتنی بر DNA از جمله سیتوکروم b (DNA میتوکندریایی) بعنوان متداولترین روش در این بررسیها مورد استفاده قرار می گیرد(۷، ۱۰، ۱٤، ۱۸ و ۲۰)

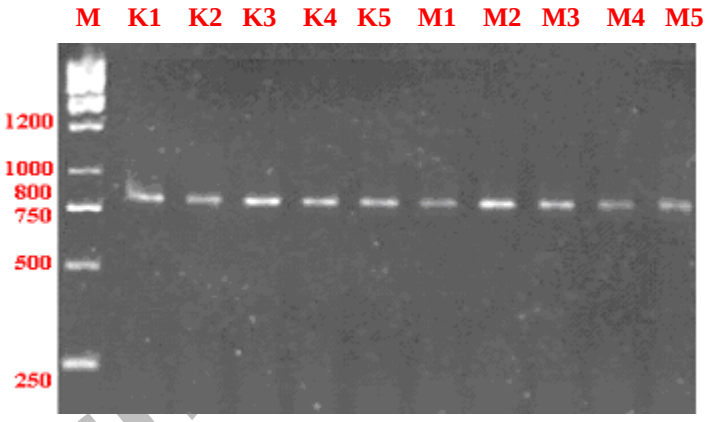
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲) ضریب اختلاف (C.D) برای ۲۹ صفت جمجمه ای در جمعیتهای کیله سفید و ماهیدشت

Cranial charecters	C.D	Cranial charecters	C.D
GL	0.07	HPC	0.34
CBL	0.22	LP^3	0.25
CCL	0.01	WP^3	0.29
ONL	0.04	INFO	0.25
WC^1-C^1	0.15	LI^1-M^3	0.23
WM^3-M^3	0.16	WP^4-P^4	0.04
ZB	0.24	LM_1-M_3	0.13
IW	0.34	LC_1-M_3	0.08
MB	0.41	LP_4-M_3	0.02
HBS	0.28	LI_1-M_3	0.06
LC^1-M^3	0.18	LC_1-P_4	0.07
BBC	0.09	LP_2-P_4	0.03
LM^1-M^3	0.38	LM_1-M_2	0.25
LC^1-P^4	0.13	LC_1-M_1	0.26
LMD	0.02		

CD : 0.17



شکل ۱- محصول PCR ژن سیتوکروم b با استفاده از دو پرایمر F2 وR از ده خفاش *Myotis blythii* در دو غار کیله سفید و تنگه رعد M= Marker K= Kilasefid cave T= Tange rad cave

در این مطالعه استخراج Total DNA از پانچ بال نمونه های خفاش زنده گوش موشی کوچک صورت گرفت و PCR در شرایط بهینه جهت تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b انجام شد. برای تکثیر و بررسی ژن سیتوکروم b، آغازگرهای اختصاصی طراحی گردید. طول DNA تکثیر شده توسط این آغازگرها براساس توالی مربوط به این ژن در بانک ژنی ۸۰۸ bp مورد انتظار می باشد. بررسی قطعه تکثیر شده فوق در شرایط بسیار اختصاصی، نشان می دهد که این آغازگرها، DNA با طول مورد انتظار را تکثیر می نماید(شکل ۱).

با توجه به اینکه حتی در شرایط PCR اختصاصی، احتمال دارد پرایمرها قطعاتی خارج از محدوده ژن مورد نظر را تکثیر کنند، بمنظور تأیید محصول PCR، الگوی هضم آنزیمی DNA تکثیر شده از یکی از نمونه های جمع آوری شده با آنزیمهای Restriction Endonuclease مناسب (*Eco*RV, *Nde*I)، مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی الگوی به دست آمده نشان می دهد که مطابق پیش بینی، در نتیجه

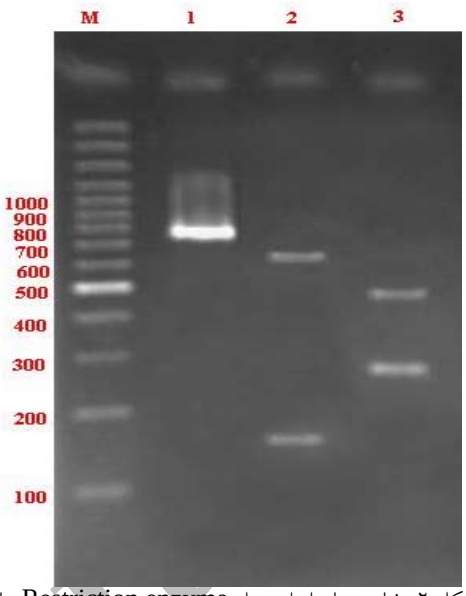
Archive of SID
www.SID.ir

عمل آنزیم *Nde*I بر روی محصول PCR بدست آمده، دو قطعه بطولهای bp ٦٥٠ و bp ۱٥۸ و توسط آنزیم *Eco*RV دو قطعه به طولهای bp ٥۱۲ و bp ۲۹٦ حاصل می شود. نتایج بدست آمده از الگوی هضم آنزیمی DNA تکثیر شده با PCR، صحت قطعات مذکور را مورد تایید قرار میدهد (شکل ۲).

جدول ۳) تعداد، میانگین، انحراف معیار، ضریب تغییرات، حدود بالا و پائین و شاخص های P و F برای صفات جمجمه ای جمعیتهای ماهیدشت و کیله سفید

Cranial charecters	Kilasefid					Mahidasht					F_Value	P_Value
	N	Mean	Sd	CV	Rang	N	Mean	Sd	CV	Rang		
GL	18	22.76	0.46	2.02	23.55-22.12	17	22.82	0.38	1.66	23.96-22.36	0.91	0.72
CBL	18	21.65	0.36	1.66	22.47-20.93	17	21.48	0.4	1.86	22.29-20.77	0.42	0.19
CCL	18	20.38	0.35	1.71	21.26-19.57	17	20.37	0.32	1.57	20.86-19.85	0.10	0.98
ONL	23	19.17	0.54	2.81	20.07-18.37	18	19.21	0.34	1.76	20.04-18.84	4.30	0.76
$WC^1_C^1$	16	5.76	0.18	3.12	5.96-5.32	16	5.82	0.2	3.43	6.12-5.49	0.05	0.36
$WM^3_M^3$	22	9.1	0.29	3.18	9.55-8.44	18	9.18	0.2	2.17	9.48-8.62	1.25	0.32
ZB	23	14.01	0.41	2.92	14.60-13.10	15	13.8	0.46	3.33	14.54-13.35	0.68	0.14
IW	23	5.2	0.21	4.03	5.55-4.51	18	5.38	0.25	4.64	6.02-5.03	0.10	**0.02**
MB	19	10.27	0.2	1.94	10.62-9.71	15	10.03	0.38	3.78	10.57-9.24	4.71	**0.04**
HBS	21	9.45	0.55	5.82	10.40-8.26	17	9.71	0.37	3.81	10.36-9.01	1.96	0.10
$LC^1_M^3$	18	9.23	0.19	2.05	9.66-8.86	17	9.35	0.47	5.02	10.88-8.86	2.99	0.30
BBC	23	10.25	0.25	2.43	10.61-9.75	18	10.29	0.17	1.65	10.72-10.01	3.56	0.48
$LM^1_M^3$	23	5.28	0.28	5.30	6.22-4.67	18	5.09	0.22	4.32	5.60-4.59	0.24	**0.02**
$LC^1_P^4$	18	3.7	0.21	5.67	3.99-3.20	17	3.76	0.22	5.85	4.15-3.41	0.00	0.42
LMD	21	17.53	0.52	2.96	18.77-16.49	16	17.51	0.38	2.17	18.25-16.90	2.04	4.88
HPC	22	6.01	0.3	4.99	6.67-5.25	16	6.22	0.31	4.98	7.02-5.81	0.11	**0.04**
LP3	21	1.67	0.16	9.58	1.95-1.31	16	1.8	0.36	20	2.37-1.16	11.62	0.21
WP3	21	1.22	0.21	17.2	1.68-0.82	17	1.39	0.23	16.54	1.75-1.07	0.86	**0.02**
INFO	23	5.94	0.21	3.53	6.34-5.45	18	6.08	0.34	5.59	6.87-5.76	2.96	0.13
$LI^1_M^3$	18	10.74	0.45	4.18	11.23-9.11	16	10.82	0.28	2.58	11.21-10.14	0.10	0.57
$WP^4_P^4$	21	6.33	0.32	5.05	6.86-5.40	16	6.4	0.2	3.12	6.87-6.01	1.12	0.43
$LM_1_M_3$	20	5.9	0.21	3.55	6.40-5.63	16	5.93	0.14	2.36	6.20-5.65	2.09	0.69
$LC_1_M_3$	20	9.96	0.25	2.51	10.52-9.37	15	9.94	0.19	1.91	10.26-9.64	0.10	0.86
$LP_4_M_3$	20	7.1	0.22	3.09	7.69-6.72	15	7.09	0.12	1.69	7.40-6.88	3.50	0.87
$LI_1_M_3$	20	11.45	0.24	2.09	12.00-11.10	15	11.42	0.21	1.83	11.76-10.94	0.06	0.69
$LC_1_P_4$	20	3.63	0.17	4.68	3.87-3.13	15	3.65	0.11	3.01	3.83-3.46	0.23	0.68
$LP_2_P_4$	19	2.64	0.17	6.43	2.99-2.41	14	2.65	0.13	4.90	2.88-2.46	2.12	0.83
$LM_1_M_2$	20	3.86	0.16	4.14	4.22-3.45	16	3.97	0.16	4.03	4.29-3.71	0.01	**0.04**
$LC_1_M_1$	20	5.81	0.22	3.78	6.13-5.29	15	5.9	0.12	2.03	6.18-5.71	3.12	0.18

www.SID.ir

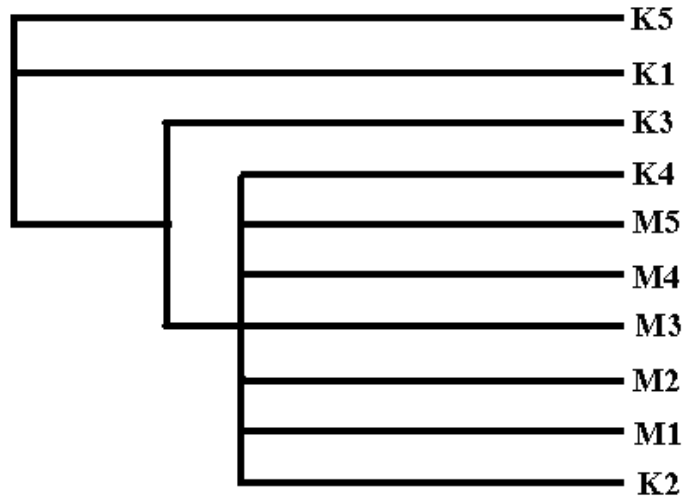


شکل ۲- نتایج حاصل از عمل Restriction enzyme های *EcoRV* (ردیف ۳) ، *Nde I* (ردیف ۲) بروی قطعه تکثیر شده از ژن سیتوکروم b (ردیف ۱)، M= مارکر

پس از تعیین توالی محصول PCR، میزان همولوژی آن با توالیهای موجود در بانک ژنی (با استفاده از BLAST search) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که قطعه تکثیر شده دارای همولوژی بسیار بالایی با ژن سیتوکروم b از خفاش *M. blythii* می باشد (٤، ۱۱، ۱۳ و ۲۰). آنالیز توالی قطعه تکثیر شده از ژن سیتوکروم b تمام نمونه های مورد مطالعه در این تحقیق با روشهای Neighbor-Joining ،Maximum Parsimony و Maximum Likelihood با استفاده از برنامه نرم افزاری PHYLIP (Version 3.6) انجام شد.

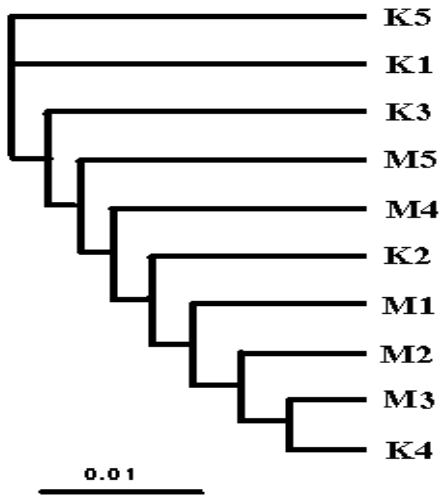
دندروگرام حداکثر پارسیمونی (MP) حاصل از آنالیز توالیهای بدست آمده از نمونه های مورد مطالعه از دو غار مورد بررسی در شکل ۳ ارائه شده است. کمترین تغییرات تکاملی، بین تمام نمونه های ماهیدشت (M) و برخی نمونه های کیله سفید (K2، K3، K4) مشاهده می شود که موید قرار گرفتن این نمونه ها در یک شاخه است. تغییرات تکاملی کاملاً مشخصی بین نمونه های جمعیت غار کیله سفید (K) وجود دارد و این نمونه ها همانند نمونه های جمعیت ماهیدشت (M) در یک ردیف قرار نمی گیرند.

دندروگرام حداکثر شباهت (ML) حاصل از آنالیز توالیهای بدست آمده از نمونه های فوق الذکر کمترین احتمال تغییرات بین تمام نمونه های ماهیدشت (M) و برخی نمونه های کیله سفید (K2، K3، K4) را نشان می دهد (شکل ٤). بعبارت دیگر این نمونه ها کمترین تغییرات تکاملی را از خود نشان می دهند.

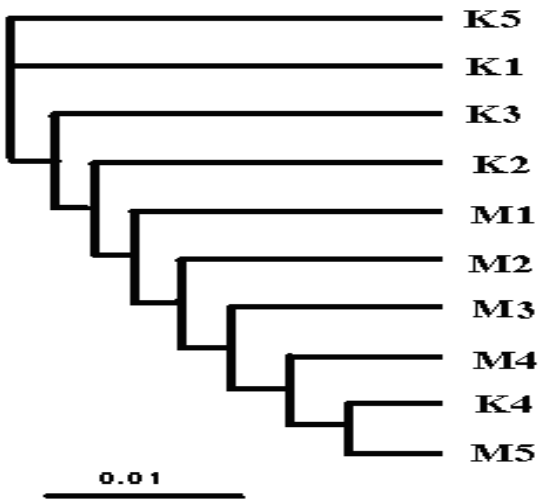


شکل ۳- دندروگرام MP حاصل از آنالیز توالیهای بدست آمده از ۱۰ نمونه از دو غار ماهیدشت (M) و کیله سفید (K)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٤- دندروگرام ML حاصل از آنالیز توالیهای بدست آمده از ۱۰ نمونه از دو غار ماهیدشت (M) و کیله سفید (K)



شکل ٥- دندروگرام NJ حاصل از آنالیز توالیهای بدست آمده از ۱۰ نمونه از دو غار ماهیدشت (M) و کیله سفید (K)

در شکل ٥ دندروگرام همسایگی (NJ) حاصل از آنالیز توالیهای بدست آمده از این نمونه ها از دو غار ذکر شده ارائه می شود. در این دندروگرام کمترین فاصله تکاملی بین نمونه های ماهیدشت و نمونه های K2، K3، K4 می‌باشد که از نظر تغییرات تکاملی، بیشترین مشابهت را در دندوگرام MP و کمترین احتمال تغییرات را در دندروگرام ML دارند. به جز نمونه های غار ماهیدشت که از همدیگر واگرایی ندارند، نمونه های غار کیله سفید واگرایی داشته و برخی از آنها با نمونه های غار ماهیدشت مشابهت نشان می دهند. بطورکلی در این دندوگرامها گروهبندی مشخصی بین جمعیتها وجود ندارد به این معنی که جمعیتهای غارها از هم منشعب نمی شوند و همپوشانی و اختلاط جمعیتها به وضوح دیده می شود. هر چند تشابه و عدم واگرایی بین نمونه های ماهیدشت وجود دارد اما افراد این دو غار جمعیتهای مجزایی را تشکیل نمی دهند.

www.SID.ir

بطور کلی در این تحقیق ارزیابی الگوهای اصلی تنوع جغرافیایی در جمعیتهای ایرانی خفاش *Myotis blythii* در شمال دشت بین النهرین (غار کیله سفید) و زاگرس میانی (ماهیدشت) که به فاصله حدود ۲۰۰ کیلومتر از یکدیگر و در دو سوی یک شیب محیط زیستی کلان قرار گرفته و دارای شرایط اکولوژیک متفاوت بوده، تا حد ایجاد دو منطقه آب و هوایی کاملاً متفاوت، با استفاده از صفات مورفولوژیکی و خصوصیات ملکولی مورد مطالعه قرار گرفت. براساس این مطالعه جمعیتهای این دو غار در سطح گونه همپوشانی نسبتاً زیادی دارند و نمی توان این دو جمعیت را درسطح زیرگونه از یکدیگر جدا نمود. علیرغم وجود شرایط الولوژیکی کاملاً متفاوت این دو غار، بنظر می رسد بعلت قدرت پرواز بالای خفاشها، فاصله ۲۰۰ کیلوکتر بین این دو منطقه قادر به ایزوله کردن جمعیتهای این دو غار نمی باشد. بعبارت دیگر این امر باعث بوجود آمدن اختلاط جمعیتی بین آنها و ایجاد یک تاکسون واحد شده است.

منابع

1- Benda, P., and Horacek, I. (1995). Geographic variation in three species of *Myotis* (Mammalia: Chiroptera) in south of the Western Palearctics. Acta Soc. Zool. Bohem., 59, 17-39

2- Bickham, J. W., Patton J. C., Schlitter, D. A., Rautenbach, I. L. Honeycutt, R. L. (2004). Molecular phylogenetics, Karyotypic diversity, and partition of the genus *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). Molecular phylogenetics and evolution. 33: 333-338.

3- Borkhausen, M.B., (1797). Biertes Befchlecht. Die Fledermaus Nat. Hist., London, 165–168

4- Castella V., Ruedi M., Excoffier L., Ibanez C., Arlettaz R., and Hausser J. (2000). Is the *Gibraltar strait* a brrier to gene flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)?. Mol. Ecol. 9(11): 1761-1772.

5- Cheesman, R.E., (1921). Report on a collection of mammals made by Col. J. E. B. Hotson in Shiraz, Persia. Jour. Bombay Nat. Hist.Soc, 27:573-581

6- DeBlase (1980). The Bats of Iran: Systematic, Distribution, Ecology. Fidldiana Zoology, New Senries.4: 1-424

7- Farias, I. P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H. and Meyer, A., (2001). The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. Journal of Molecular Evolution. 53: 89-103.

8- Harrison, and Lewis (1961). The large Mouse-eared bats of the Middle East, with description of a new subspecies. J. Mammal., 42:372-380

9- Hemmatti, Z., (2002). Geographic variation in the Mouse-eared bat *Myotis blythii* (Chiroptera; Vespertilionidae) in Western Zagross Mts. MSc Dissertation, Razi University.

10- Hodgkinson, H. V., Birungi, J., Quintan, M., Dettze, R. and Munstermann, L. E., (2003). Mitochondrial cytochrome b varation in populations of the visceral leishmaniasis vector lutzomyia longipalpis across eastern brazil. The American Sodety of Tropical Medicine and Hygiene. 69(4): 386-392.

11- Ibanez C., Garcia-Mudarra J.L., Ruedi M., Stadelman B., and Juste J. (2006). The Iberian contribution to cryptic diversity in european bats. Acta Chirot. 8(2): 277-297.

12- Irwin, D. M., Kocher, T. D. And Wilson, A. C., (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. Journal of molecular evolution. 32: 128-144.

13- Jones G., Parsons S., Zhang S., Stadelmann B., Benda P., and Ruedi M. 2006. Echolocation calls, wingshape, diet and phylogenetic diagnosis of the endemic chinese bat *Myotis pequinius*. Direct submission to NCBI.

14- Kawai, K. Nikaido, M. Harada, M. Matsumura, S. Lin, K. Wu, Y. Hasegawa, M. and Okada, N., (2003). The status of the Japanese and East Asian bats of the genus Myotis (Vespertilionidae) based on mitochondrial sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 28: 297–307

15- Koopman, K.F., (1994). Chiroptera: systematics. In: Niethammer, J., Schliemann, H., Starck, D. (Eds.), Handbook of Zoology, vol. 8, pt. 60, Mammalia. Walter de Gruyter Press, Berlin, pp.1–217.

Archive of SID
www.SID.ir

16- Lay, D. M., (1967). A study of the mammals of Iran, resulting from the street Expedition of 1962-63. Fieldiana Zool. 54: , 1-182

17- Mayer, E., (1971). Principles of systematic Zoology. Oxford University Press. Tata McGRAW-HILL publishing company ltd. New delhi

18- Pestano, J., Brown, RP., Suarez, NM., Benzal, J. and Fajardo, S., (2003). Intraspecific evolution of canary island plecotine bats, based on mtDNA sequences. Heredity. 90: 302-307.

19- Piaggio, A. J., Valdez, E. W., Bogan, M. A. and Spicer, G. S., (2002). Systematic of *Myotis* occultus (Chiroptera: Vespertionidae) inferred from sequences of two mitochondial genes. Journal of mammalogy. 83(2): 386-395.

20- Ruedi M. & Mayer F., (2001). Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. Mol. Phylogen. Evol. 21: 436–448.

21- Sambrook J., Fritsch E. F. , Manniatis T., (1989). Molecular Cloning; A laboratory mannual, 2nd edition Edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

22- Sharifi, M., (2004). Postnatal growth in the Lesser Mouse-eared bat (*Myotis blythii)*. Mammalia, 68(4) 283-289.

23- Strelkov, p. p., (1972). Myotis blythii (Tomes, 1857): Distribution, Geographical Variability and Differences from *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797). Acta THERIOL., 17: 355-380

24- Thomas, O., (1906). On a collection of mammals from Persia and Armenia presented to the British Museum by Col. A.C. Balilward. Proc. Soc. London, 1905, II(35) : 519-527

25- Topal, G., (1971) Morphological studies on the os penis of bats in the Carpathian Basin. Ann. Hist. Nat. Mus. Hungary 50 (New Series 9): 331–342, 1958.

26- McCracken G. F., and Vege S., (2001). Microsatellite genotypes of big brown bats (Eptesicus fuscus: Vespertilionidae, Chiroptera) obtained from their feces. Acta Chiropterologica, 3(2): 237-244.

27- Worthington-Wilmer, J., & Barratt, E., (1996). A non lethal method of tissue sampling for genetic studies of chiropterans. Bat Res. News. 37(1), 1-3.

Archive of SID

www.SID.ir

The status of the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythii)* populations occurring in northern mesopotamian plain and mid-zagros mountains in western of iran based on mitochondrial sequences

Vatandoost J.[1,3], Zamani M.R.[2], Motallebi M.[2], and Sharifi M.[3]

[1]**Department of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem Univ., Sabzevar**

[2]**National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran**

[3] **Razi Univ. Environmental Research Center, Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah**

Abstract

Morphological features and mitochondrial cytocrhome-b DNA sequences were analyzed to study geographic variation in two populations of the less mouse-eared bat *Myotis blythii* (Thomes, 1906) occurring in two contrasting environments in northern Mesopotamian plain and mid-zagros. Mitochondrial cytochrome-b fragments were amplified from wing samples to examine population boundaries and phylogenetic relationships with other such populations. DNA sequences for phylogenetic survey were used in PHYLIP software including maximum-parsimony, maximum-likelihood and neighbor-joining method. Comparison between cranial measurements from all specimens collected in these two areas indicates that some attributes have significant differences. Molecular analysis demonstrate that specimens from mid-zagros mountains show a greater genetic cohesiveness. However, phylogenetic analyses of cytochrome-b don't reveal a clade of haplotypes from western populations in the northern mesopotamian plain.

Key words: PCR, cytochrome b, PHYLIP, *Myotis blythii*

Archive of SID

www.SID.ir