

УДК 599.42 57.063.7

НЕОБЫЧНО КРУПНЫЕ ВОСТОЧНЫЕ ДЛИННОКРЫЛЫ, *MINIOPTERUS FULIGINOSUS* – СМЕЩЕНИЕ ПРИЗНАКОВ ИЛИ РЕЗУЛЬТАТ ГИБРИДИЗАЦИИ?

© 2024 г. С. В. Крускоп^{1,2,*}, С. С. Жукова³

Представлено академиком РАН В. В. Рожновым

Поступило 10.12.2023 г.

После доработки 11.01.2024 г.

Принято к публикации 12.01.2024 г.

В ходе изучения морфологической изменчивости длиннокрылов (*Miniopterus*) мы обнаружили, что экземпляры, происходящие из вьетнамской провинции Каобанг и определенные как *M. fuliginosus*, по размеру ближе к более крупному виду – *M. magnater*. Анализ митохондриальных генов определенно помещает эти экземпляры в первый вид. В то же время морфометрический анализ по 21 черепному параметру определенно ставит эти экземпляры ближе к *M. magnater* и показывает их отличия от *M. fuliginosus* из разных частей ареала. Мы предполагаем, что в горах севера Вьетнама и юга Китая *M. fuliginosus* в силу не известных пока обстоятельств занимает нишу более крупного вида. Однако недостаточные данные по ядерным маркерам допускают и гибридное происхождение этой популяции, заимствовавшей мтДНК другого вида.

Ключевые слова: рукокрылые, длиннокрылы, видовые границы, изменчивость, морфометрия, молекулярная генетика.

DOI: 10.31857/S2686738924020218, **EDN:** WDNMFZ

ВВЕДЕНИЕ

Длиннокрылы (*Miniopterus*) – род летучих мышей, широко распространенный в Старом Свете и Австралии. Из-за морфологического однообразия «традиционная» систематика принимала существование сравнительно небольшого числа видов (13–19), включая *Miniopterus schreibersii sensu lato*, ареал которого практически совпадал с ареалом рода [1, 2]. Использование молекулярно-генетического подхода показало, что видовое разнообразие рода было сильно недооценено. В настоящее время в составе рода признают около 40 видов [3], а в пределах бывшего *M. schreibersii* выделено несколько филогенетических линий видового уровня, большая часть которых не родственна собственно *M. schreibersii* [4]. Одну из таких линий представляет собой вос-

точный длиннокрыл, *M. fuliginosus*, ареал которого охватывает Южную, Юго-Восточную и Восточную Азию от востока Афганистана до Тайваня, Японии и южного Приморья [3, 5, 6].

В процессе работы с коллекционными материалами по длиннокрылам Юго-Восточной Азии выяснилось, что экземпляры из провинции Каобанг (северный Вьетнам), определенные как *M. fuliginosus*, по размерам черепа заметно крупнее своих конспецификов и приближаются к *M. magnater*. Оба вида присутствуют в фауне севера Индокитая и юга Китая [7], и филогенетические взаимоотношения между ними ясны не до конца [8]. Последние авторы указывают на значительное перекрытие размеров между видами, что несколько противоречит ранее опубликованным данным [9, 10].

Нами были проанализированы данные по двум митохондриальным и одному ядерным генам, чтобы подтвердить видовую идентификацию спорных особей и попытаться проверить предположение о гибридации. Также мы сравнили доступные выборки коллекционных экземпляров обоих видов, чтобы понять, действительно ли экземпляры из Каобанга не соответствуют видовой изменчивости *M. fuliginosus*.

¹Зоологический музей Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

²Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам

³Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: selysius@mail.ru

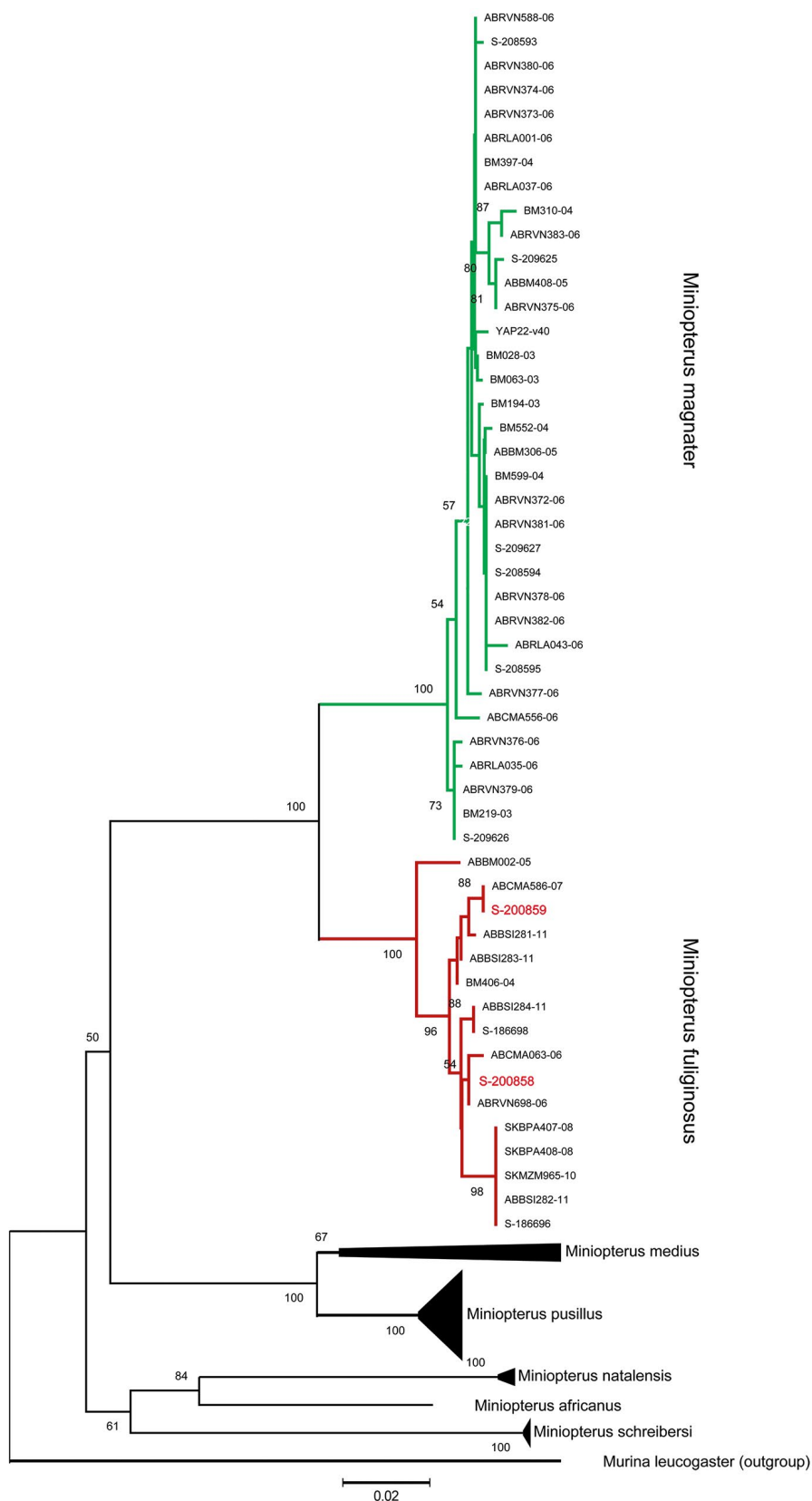


Рис. 1. Филогенетические взаимоотношения видов рода *Miniopterus* по данным анализа митохондриального гена *COI*; для данного гена доступна наиболее репрезентативная выборка последовательностей. Экземпляры из провинции Каобанг отмечены красным.

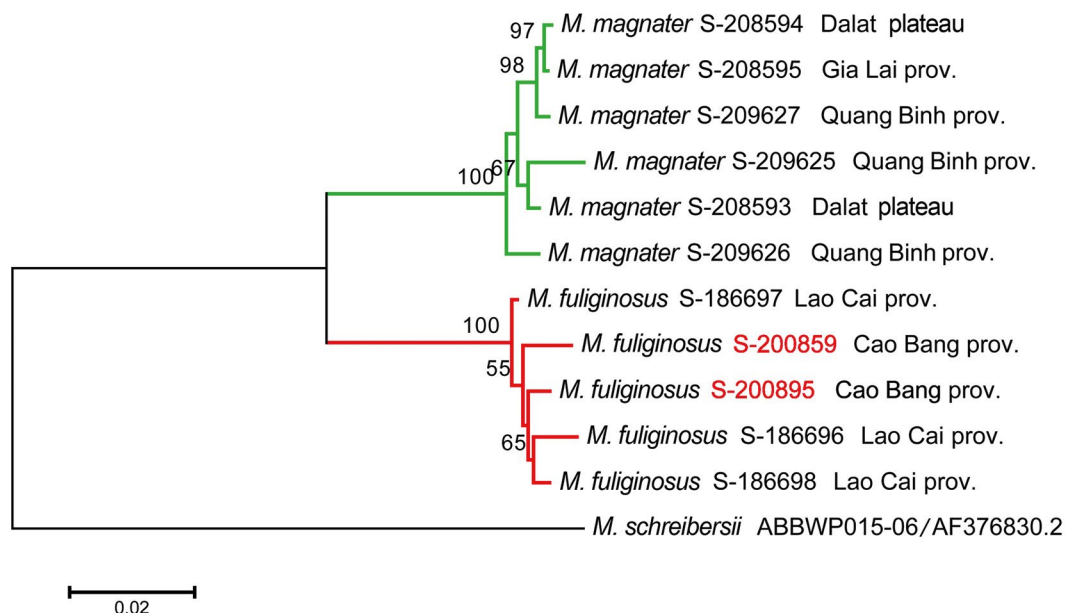


Рис. 2. Филогенетические взаимоотношения представителей рода *Miniapterus* по данным конкатената двух митохондриальных генов (*COI* и *cytb*). В анализ включены только оригинальные сиквенсы, кроме *M. schreibersii* из Италии, взятого в качестве внешней группы. Экземпляры из провинции Каобанг отмечены красным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Геномную ДНК выделяли из фиксированных в этаноле проб тканей стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации [11]. Были получены последовательности митохондриальных генов *cytb* (1042 bp) и *COI* (652 bp), и ядерного гена *RAG2* (1234 bp). Последовательности праймеров взяты из опубликованных работ [12, 13, 14]. Реакция амплификации осуществлялась при следующих условиях: первичная денатурация — 94 °C в течение 3 мин.; затем 35 циклов, включающих денатурацию — 94 °C в течение 45 сек., отжиг с функцией touch down — 68–65 ° в течение 1 мин., синтез — 72 °C в течение 1. Конечный синтез осуществлялся при 72 °C в течение 7 мин. Опыты выполнены на приборе My Cyclex BioRAD. Контроль амплификации проводили в 1% агарозном геле. Очистку продуктов ПЦР проводили с помощью набора Diatom DNA Clean-Up. Автоматическое секвенирование проведено на секвенаторе ABI PRISM 3500xl. Всего получено 35 оригинальных генетических последовательностей для 14 экземпляров длиннокрылов; еще 30 последовательностей двух генов были получены из ГенБанка и 57 последовательностей гена *COI* были взяты из базы BOLD. Номера использованных музейных экземпляров (обозначены литерой S) и номера ГенБанка и BOLD указаны на рис. 1–2.

Последовательности выровнены с помощью программ BioEdit v7.1.3. и SeqMan Pro v.7.1. [15, 16] и скорректированы вручную. Реконструкция филогенетических деревьев выполнена методами максимального правдоподобия (ML) при по-

мощи программ IQ-Tree и MEGA 10. Для определения достоверности полученной топологии ML использовали процедуру bootstrap с 500 репликами.

Для морфометрического анализа было измерено 178 экземпляров азиатских видов *Miniapterus*, в том числе 118 *M. fuliginosus* из разных частей видового ареала и 17 *M. magnater* из материковой Азии. После предварительного анализа из рассмотрения были исключены выборки мелких видов, а также очень крупные *M. cf. magnater* с Новой Гвинеи, сильно искажавшие результаты. В результате в окончательный анализ были включены 132 экземпляра двух видов. Были использованы материалы Зоологического музея МГУ и Зоологического института РАН (Россия), Национального музея науки и природы и Музея префектуры Аомори (Япония), Национального музея естественных наук и Зоологического музея Тайбейского университета (Тайвань), Музея естественной истории Университета принца Сонгкла (Таиланд), Музея зоологических исследований Александра Кёнига и Зоологических коллекций Баварии (Германия). Были выполнены следующие краниальные измерения (сокращения указаны в скобках): наибольшая длина черепа (TL), кондильбазальная длина (CBL), кондилоканинная длина (CCL), мастоидная ширина черепа на уровне слуховых булл (MW), ширина черепной коробки (BCW), высота затылка от нижнего края мышелков до затылочного-теменного шва (OH), наименьшая ширина заглазничного сужения (POW), ростральная ши-

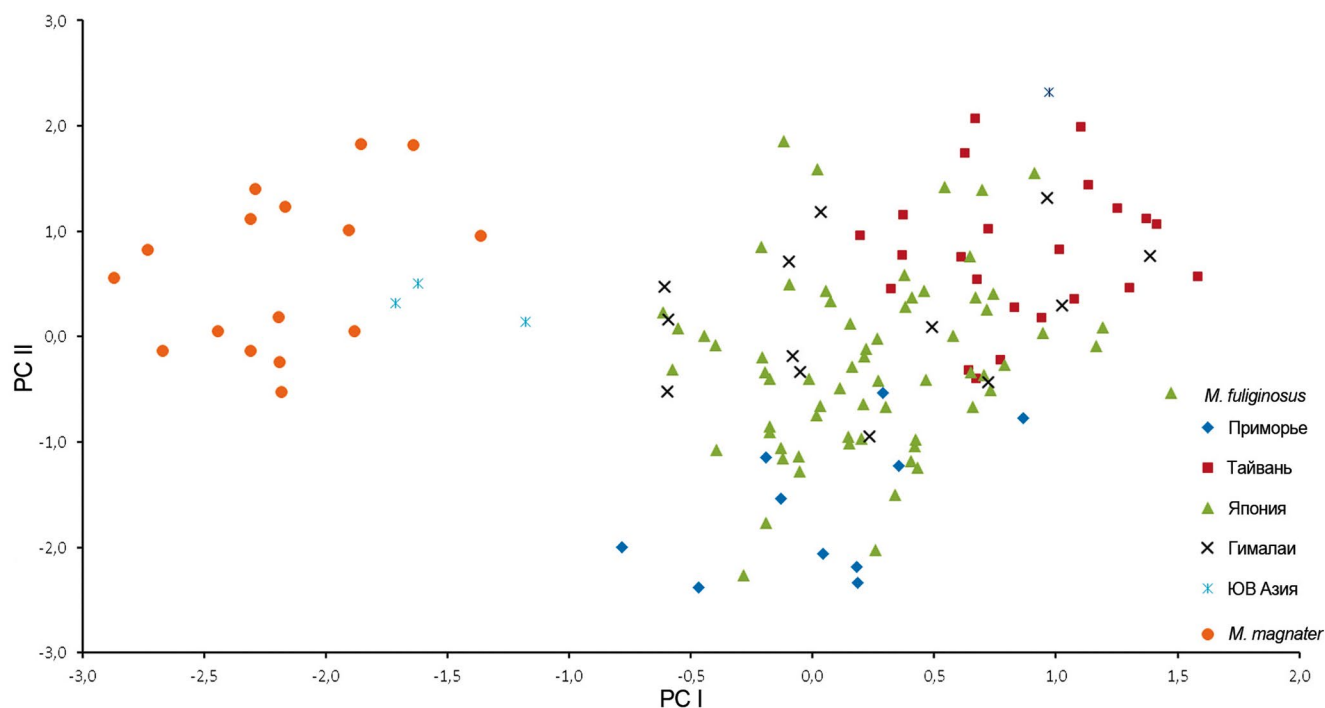


Рис. 3. Распределение 132 экземпляров длиннокрылов (*Miniapterus fuliginosus* и *M. magnater*) в пространстве первых двух факторов (главных компонент), рассчитанных для 21 черепного промера. Первый фактор отрицательно скоррелирован с общими размерами.

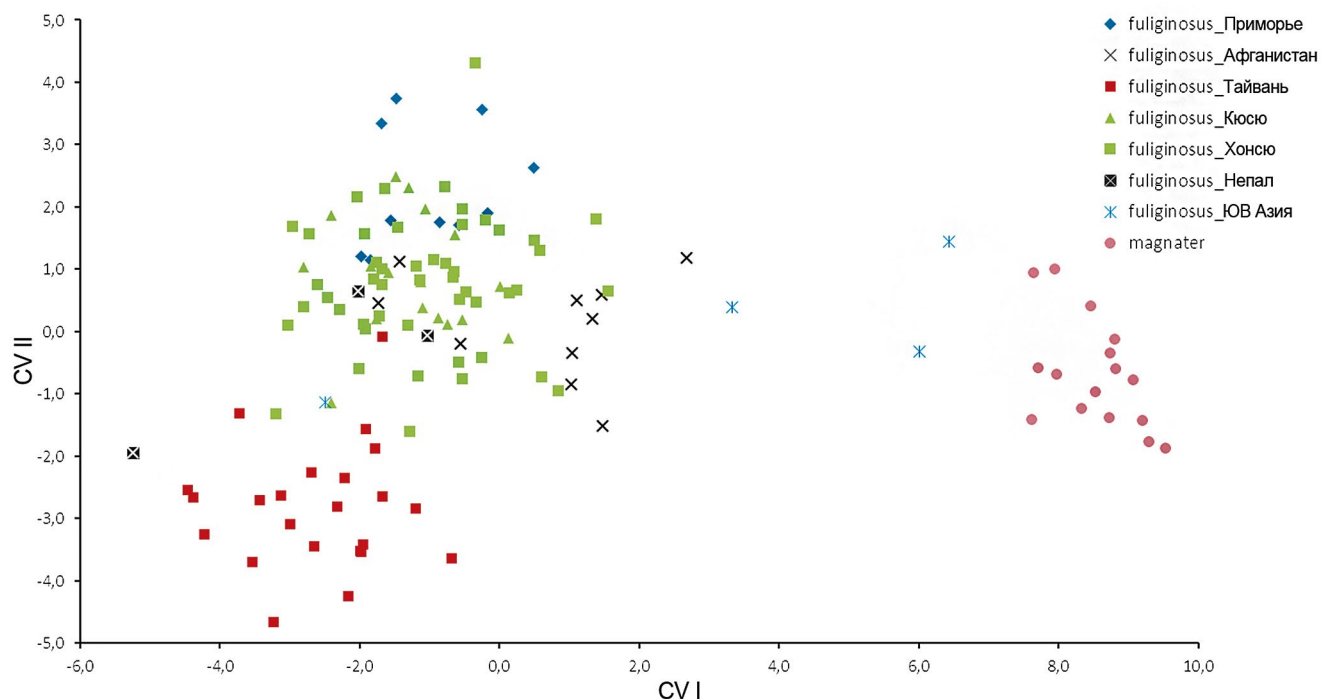


Рис. 4. Распределение 132 экземпляров длиннокрылов (*Miniapterus fuliginosus* и *M. magnater*) в пространстве первых двух канонических переменных, рассчитанных методом дискриминантного анализа для 21 черепного промера. Экземпляры из Непала (типовая территория *M. fuliginosus*) и Юго-Восточной Азии включены в анализ как «неопределенные».

рина на уровне подглазничного отверстия (RW), ростральная длина от подглазничного отверстия до альвеолы внешнего резца (RL), ширина меж-

ду наружными краями верхних клыков (C-C), ширина между наружными краями М3 (М3М3), длина C–М3 (СМ3), длина молярiformного ряда

Таблица 1. Квадраты дистанций Махаланобиса между центроидами шести обучающих выборок, использованных в анализе (5 выборок *M. fuliginosus* и 1 *M. magnater*; под диагональю) и достоверность различий между выборками (*p*-критерий; над диагональю), и квадраты дистанций Махаланобиса трех экземпляров из Каобанга от каждой из обучающих выборок

Обучающая выборка	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. Приморье	—	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2. Афганистан	16.621	—	0.000	0.000	0.000	0.000
3. Тайвань	32.089	24.347	—	0.000	0.000	0.000
4. Кюсю	13.249	12.603	16.273	—	0.006	0.000
5. Хонсю	9.394	9.169	17.245	3.493	—	0.000
6. <i>M. magnater</i>	104.162	68.405	128.529	105.270	90.081	—
S-200858	110.482	73.650	140.339	96.889	92.613	47.113
S-200859	42.961	47.762	73.201	60.403	50.103	57.422
S-200897	80.377	57.968	98.958	74.768	67.681	23.756

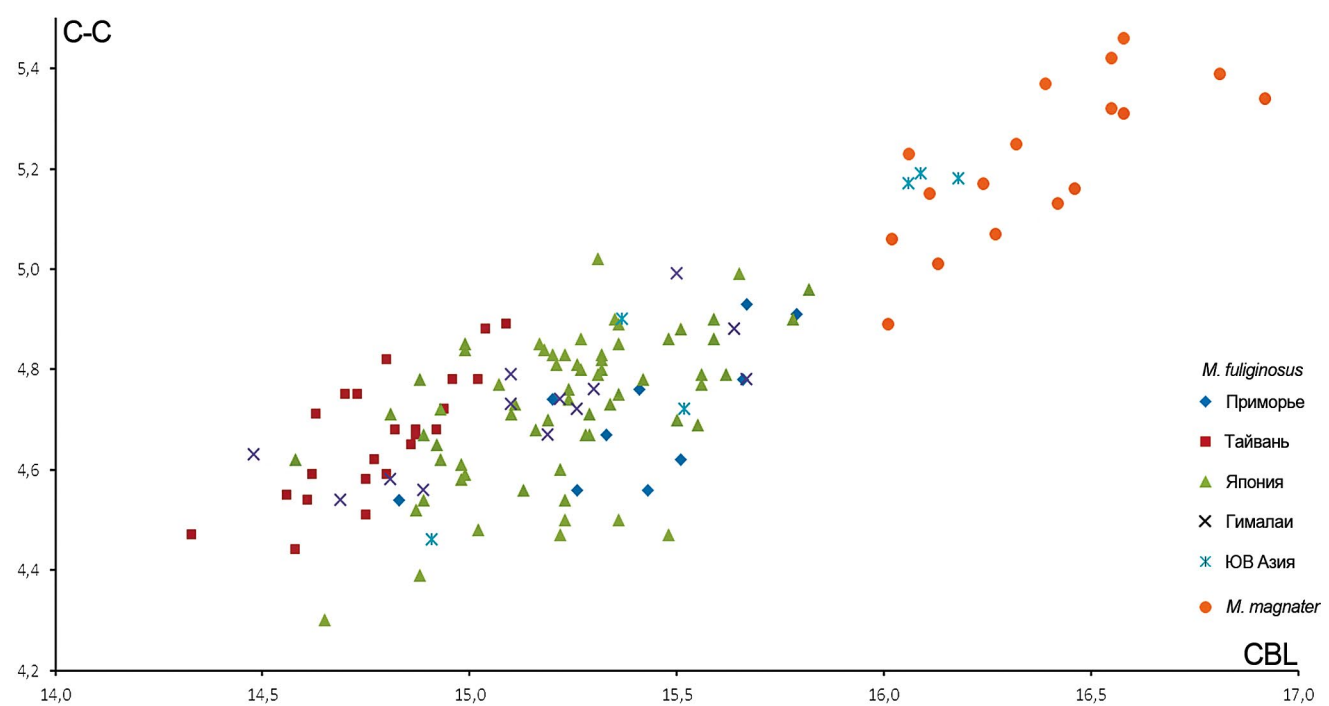


Рис. 5. Сравнение 134 экземпляров длинокрылов (*Miniopterus fuliginosus* и *M. magnater*) по значениям двух черепных промеров: кондилобазальной длины черепа (CBL) и ширины между внешними краями клыков (C-C). Три экземпляра из провинции Каобанг соответствуют промерам *M. magnater*.

верхней челюсти (P4M3), длина основания цингулюма верхнего клыка (C), длина костного нёба от переднего края клыков (Pal), ширина задней части костного нёба (PalW), ширина между внешними краями гленоидных ямок (GIW), ширина между внешними краями затылочных мыщелков (ConW), длина зубного ряда нижней челюсти (см³), длина нижней челюсти от альвеолы i¹ до заднего края суставного отростка (MdL), высота нижней челюсти до вершины венечного отростка (MdH).

Для оценки характера изменения количественных признаков был проведен анализ главных компонент (PC) и дискриминантной функции (DF) с использованием соответствующих модулей STATISTICA для Windows версии 7.0. Обучающий набор для расчета квадратов дистанций Махаланобиса и апостериорных вероятностей в рамках DF-анализа включал пять географических выборок *M. fuliginosus* “Приморье”, “Афганистан”, “Тайвань”, “Кюсю”, “Хонсю”) и выборку материковых *M. magnater*. Часть экземпляров, в том числе обсуж-

даемые экземпляры из провинции Каобанг, были включены в анализ как “неопределенные”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как и в ранее опубликованных работах [8], митохондриальные гены хорошо разделяют *M. fuliginosus* и *M. magnater* (рис. 1, 2): средние дистанции между кладами составили 6.0% для *cytb*, 6.85% для *COI* и 6.44% для конкатената обоих генов. При этом экземпляры из провинции Каобанг однозначно определяются как *M. fuliginosus*.

Единственный ядерный ген, *RAG2*, к сожалению, не разделяет обсуждаемые виды, формируя единую хорошо поддержанную кладу азиатских длиннокрылов (включающую также *M. medius* и *M. australis*). Очевидно, что для получения приемлемой филогенетической реконструкции необходимо использовать несколько ядерных ДНК-маркеров.

РС-анализ показывает неплохое разделение *M. fuliginosus* и *M. magnater* по первому фактору (рис. 3). Сумма значений общей изменчивости первых двух факторов превышает 79%. На ненормализованных данных первый фактор скоррелирован с большинством размерных параметров, на нормализованных (*varimax normalized*) — в первую очередь, с длинами зубных рядов. Почти все экземпляры *M. fuliginosus* образуют единое облако. Размещение географических выборок в нем неравномерно, часть их не перекрывают друг а по одному или двум факторам, что свидетельствует о наличии определенной географической изменчивости, нуждающейся в дальнейшем изучении. Выборка *M. magnater* хорошо обособлена, и экземпляры из провинции Каобанг определенно тяготеют к ней, а не к *M. fuliginosus*.

Данные дискриминантного анализа разделяют *M. magnater* и *M. fuliginosus* ожидаемо лучше (рис. 4): квадраты дистанций Махаланобиса между ними в 3–11 раз больше, чем между центроидами разных выборок *M. fuliginosus* (табл. 1). При этом сами географические выборки последнего вида также демонстрируют определенные различия; наиболее обособленной оказывается выборка с о. Тайвань. Недостоверными ($p > 0.001$) оказались различия только между выборками с островов Хонсю и Кюсю. Из трех измеренных экземпляров из провинции Каобанг два ассоциируются с *M. magnater*, хоть и лежат на графике за пределами распределения особей этого вида, тогда как третий по значениям квадратов дистанций Махаланобиса занимает промежуточное положение (см. табл. 1).

Практически по всем абсолютным значениям черепных промеров измеренные экземпляры из Каобанга укладываются в изменчивость *M. magnater* и несколько крупнее *M. fuliginosus* (рис. 5). Из 21 промера

только значения четырех (МЗМЗ, СМЗ, Р4МЗ и МдL) оказались чуть ниже минимальных значений для *M. magnater*. В то же время наибольшая и кондиллобазальная длины черепа и длина зубного ряда экземпляров из Каобанга превышают максимальные значения для *M. fuliginosus* и больше средних значений для этого вида на 6.6–7.0, 6.0–6.8 и 6.3–8.9%, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Miniopterus fuliginosus и *M. magnater* крайне сходны морфологически, различаясь, по сути, только размерами [9, 10] и генетически [8, 17]; различия в форме козелка [17] малы и не вполне надежны. Тем не менее наши данные показывают, что два вида вполне можно различать по морфометрии при наличии достаточных обучающих выборок. Единственным исключением среди имевшихся в нашем распоряжении материалов оказались экземпляры с горы Фиаок в провинции Каобанг. Примечательно, что эти экземпляры, по абсолютным линейным размерам определенно относимые к *M. magnater*, по результатам морфометрического анализа все же не идентичны ему, а занимают в некотором смысле промежуточное положение. Таким образом, животные из Каобанга оказываются определенно принадлежащими к *M. fuliginosus* по митохондриальной ДНК и более близкими к *M. magnater* по морфометрии. Эта ситуация может быть объяснена либо смещением признаков у конкретной популяции, либо ее гибридным происхождением (заимствованием митохондриальной ДНК у *M. fuliginosus*).

Ограниченная гибридизация с заимствованием мтДНК не единична среди рукокрылых [18, 19]. С другой стороны, у *Miniopteridae* она пока не описана; два близкородственных вида *Miniopterus* в Средиземноморье не демонстрируют потока генов в зоне симпатрии [20]. Однако малый объем полученных данных по ядерным генам не позволяет подтвердить или опровергнуть предположение о заимствовании митохондриальной ДНК. Если в дальнейшем новые данные подтвердят эту версию, это станет первым подобным документированным случаем для семейства *Miniopteridae*.

Неоднозначные данные по морфометрии (при вполне видимых абсолютных размерных различиях) говорят в пользу версии о смещении признаков в сторону увеличения размеров у восточных длиннокрылов. В работе [Li et al., 8] упомянуто заметное перекрывание размеров черепа между *M. fuliginosus* и *M. magnater* в Китае и соседних частях Вьетнама. Можно предположить, что такие необычно крупные *M. fuliginosus* присутствуют в низкогорьях южных провинций Китая. Такого смещения признаков в сторону увеличения размера было бы логичнее ожидать в регионах, далеких от зоны контакта *M. fuliginosus* и *M. magnater*. Остается предположить (если мы все же имеем дело

не с гибридизацией), что в горах провинции Каобанг (и, вероятно, на юго-востоке материкового Китая) *M. fuliginosus* по каким-то причинам занимает нишу именно *M. magnater*, соответственно, приближаясь по размерам к последнему. Очень слабая изученность экологии обоих видов не позволяет делать более детальные предположения.

Ситуация с экземплярами из Каобанга наглядно показывает, что, хотя в общем случае виды длиннокрылов и можно разделять методами морфометрии, морфологические определения (а соответственно, представления о границах ареалов и биотопических предпочтениях) требуют проверки молекулярно-генетическими методами. В любом случае, описанное перекрытие размеров двух обсуждаемых видов в Китае [8] не является типичным и связано либо с неверно определенными *M. magnater* с заимствованной мтДНК, либо ограниченным числом популяций *M. fuliginosus*, выходящим за рамки обычной размерной изменчивости своего вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы крайне признательны администрации Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН и Российско-Вьетнамского совместного научного и технологического тропического центра за возможность работы с материалами с территории Вьетнама, хранителям и кураторам всех перечисленных научных коллекций за предоставление доступа к коллекционным материалам. Работа выполнена на материальной базе кафедры зоологии позвоночных биологического факультета и Зоологического музея МГУ им. М. В. Ломоносова при содействии администрации этих подразделений и соответствует теме НИР Зоологического музея № 121032300105-0.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koopman K.F. *Chiroptera: Systematics*, vol. VIII of *Mammalia*, New York: Walter de Gruyter, 1994. P. 60.
2. Simmons N.B. Order Chiroptera, in *Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference*. 3rd Edit. V. 1. Wilson D.E., Reeder D.M. Eds., Baltimore Johns Hopkins Univ. Press, 2005.
3. Ibáñez C. and Juste J. Family Miniopteridae (Long-fingered Bats), in *Handbook of the Mammals of the World*. V. 9: Bats, Wilson D. E. and Mittermeier R. A. Eds., Barcelona: Lynx Edicions, 2019.
4. Appleton B. R., McKenzie J. A., Christidis L. Molecular systematics and biogeography of the bent-wing bat complex *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817) (Chiroptera: Vespertilionidae). *Mol. Phyl. Evol.*, 2004. V. 31. № 2, P. 431–439.
5. Endo K., Iida K., Nunome M., et al. Phylogeography of *Miniopterus fuliginosus* (Chiroptera) with special reference to Jeju Island, South Korea, *Mammalia*, 2019. V. 83. № 6, P. 610–614.
6. Тиунов М. П., Крусков С. В., Орлова М. В. Рукокрылые Дальнего Востока России и их эктопаразиты. М.: Перо, 2021.
7. Wilson D. E. Order Chiroptera, in *A guide to the Mammals of China*, Smith A.T., Xie Y., Eds., Princeton: Princeton Univ. Press, 2008.
8. Li S., Sun K., Lu G., et al. Mitochondrial genetic differentiation and morphological difference of *Miniopterus fuliginosus* and *Miniopterus magnater* in China and Vietnam, *Ecol. Evol.*, 2015. V. 5. № 6. P. 1214–1223.
9. Maeda K. Studies on the classification of *Miniopterus* in Eurasia, Australia, and Melanesia, *Honyurui Kagaku* (Mammalian Science), 1982. Suppl. 1. P. 1–176.
10. Kruskop S.V. Bats of Vietnam. Checklist and an identification manual. 2nd edition, revised and supplemented, Biodiversity of Vietnam series. Moscow: KMK Ltd., 2013.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. N. Y.: Cold Spring Harbour Lab. Press, 1989, 2nd ed.
12. Baker R.J., Porter C.A., Patton J.C., Van Den Bussche T.A. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on Rag2 DNA sequences, *Occas. Pap. Mus. Texas Tech. Univ.*, 2000. V. 202. P. 1–16.
13. Artyushin I.V., Kruskop S.V., Lebedev V.S., Bannikova A.A. Molecular phylogeny of Serotines (Mammalia, Chiroptera, *Eptesicus*): evolutionary and taxonomical aspects of the *E. serotinus* species group, *Biol. Bull.*, 2018. V. 45, № 5, pp. 469–477.
14. Ivanova N.V., Clare E.L. and Borisenko A.V. DNA barcoding in Mammals, in *DNA Barcodes: Methods and Protocols*, Kress W.J. and Erickson D.L., Eds., NJ: Humana Press, 2012.
15. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleotide*, 1999, V. 41, P. 95–98.
16. Burland T.G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software, *Methods Mol. Biol.*, 1999. V. 132, P. 71–91.
17. Kusuminda T., Mannakkara A., Ukuwela K.D.B., et al. DNA barcoding and morphological analyses reveal a cryptic species of *Miniopterus* from India and Sri Lanka, *Acta Chiropt.*, 2022, V. 24, № 1, P. 1–17.
18. Furman A., Çoraman E., Çelik Y. E. et al. Cytonuclear discordance and the species status of *Myotis myotis* and *Myotis blythii* (Chiroptera), *Zoologica Scripta*, 2014, V. 43, № 6, P. 549–561.
19. Çoraman E., Dietz C., Hempel E., et al. Reticulate evolutionary history of a Western Palaearctic Bat complex explained by multiple mtDNA introgressions in secondary contacts, *J. Biogeogr.*, 2019, V. 46, P. 343–354.
20. Bilgin R., Gürün K., Maracı Ö., et al. Syntopic occurrence in Turkey supports separate species status for *Miniopterus schreibersii schreibersii* and *Miniopterus schreibersii pallidus* (Mammalia: Chiroptera), *Acta Chiropt.*, 2012. V. 14, № 2, P. 279–289.

ARE ABNORMALLY LARGE EASTERN BENT-WING BATS, *MINIOPTERUS FULIGINOSUS* REPRESENT FEATURE SHIFT OR RESULT OF HYBRIDISATION?

S. V. Kruskop^{a, b, #}, S. S. Zhukova^c

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

^a*Zoological Museum of Moscow M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation*

^b*Joint Russian-Vietnamese Tropical Scientific Research and Technology Center, Hanoi, Vietnam*

^c*Biological faculty of Moscow M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: selysius@mail.ru*

During a study of morphological variation in bent-wing bats (*Miniopterus*), we found that specimens originating from the Cao Bang province of Vietnam, identified as *M. fuliginosus*, were closer in size to the larger species, *M. magnater*. Mitochondrial gene analysis clearly places these specimens in the former species. At the same time, morphometric analysis of 21 cranial measurements definitely puts these specimens closer to *M. magnater* and shows their differences from *M. fuliginosus* samples from different parts of the species range. We assume that in the low mountains of northern Vietnam and southern China, *M. fuliginosus*, due to as yet unknown circumstances, occupies the niche of a larger species. However insufficient data on nuclear markers also assume a hybrid origin of this population, which borrowed the mtDNA of another species..

Keywords: chiroptera, bent-wing bats, species delimitation, variability, morphometry, molecular genetics.