

УДК 599.4 57.065

ОПЫТ ПОСТРОЕНИЯ ФИЛОГЕНИИ ЛИСТОНОСОВ РОДА *HIPPOSIDEROS* ПО ЯДЕРНЫМ ГЕННЫМ МАРКЕРАМ

© 2020 г. А. П. Юзефович¹, И. В. Артюшин¹, А. А. Распопова¹, А. А. Банникова¹, С. В. Крускоп^{2,*}

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 23.03.2020 г.

После доработки 14.04.2020 г.

Принято к публикации 15.04.2020 г.

Род *Hipposideros* — один из крупнейших родов рукокрылых. Новейшие исследования применительно к его азиатским представителям были сделаны только на митохондриальных маркерах либо на единичных ядерных. В настоящей работе, используя выборку, включающую все основные группы видов, мы сравнили результаты филогенетических построений, основанные на митохондриальных, на единичных ядерных генах и на множественных ядерных маркерах, проанализированных с использованием алгоритма MRP (Matrix representation with parsimony). Последние дают наиболее подержанную и хорошо интерпретируемую филогенетическую реконструкцию. Была показана монофилия крупных азиатских листоносов, претендующих на самостоятельный таксон ранга подрода, а также монофилия ряда видовых комплексов, парафилетических по данным анализа мтДНК.

Ключевые слова: рукокрылые, систематика, филогения, ядерная ДНК, Hipposideridae

DOI: 10.31857/S2686738920040253

ВВЕДЕНИЕ

Hipposideros — центральный род в семействе Hipposideridae и один из крупнейших родов млекопитающих, включающий не менее 65 современных видов [1]. Большинство авторов используют систему, предложенную Хиллом [2], в рамках которой род был поделен на несколько групп видов, с очень приблизительной оценкой иерархии взаимоотношений между ними. Недавние молекулярно-генетические исследования [3, 4] подтвердили монофилию рода *Hipposideros* (в какой-то были сомнения [5, 6]), при условии возведения групп видов “*commersoni*” и “*cyclops*” в ранг самостоятельных родов — *Macronycteris* и *Doryrhina* соответственно. Единственная работа, основанная на множественном использовании ядерных генов [4] сфокусирована на специфических африканских линиях и практически не уделяет внимания структуре собственно рода *Hipposideros*, особенно его азиатских представителей. Таким образом, филогенетическая структура рода остается малоизученной. В то же время результаты

генного баркодинга [7] и частные исследования отдельных групп видов (напр. [8, 9]) показывают, что и видовое разнообразие рода недооценено.

Располагая материалом по большинству групп видов рода *Hipposideros* (в первую очередь — из Юго-Восточной Азии), мы построили схему филогенетических отношений по нескольким генетическим маркерам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Геномную ДНК выделяли из фиксированных в этаноле проб тканей стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации [10]. Были получены последовательности митохондриального гена цитохрома b (*cytb*; 1129 п.о.) и фрагменты семи ядерных генов (ABHD11, 460 bp; ACOX2, 569 bp; COPS, 722 bp; RAG2, 1035 bp; ROGD12, 501 bp; SORBS2, 594 bp; и THY, 546 bp). Выбор этих ядерных маркеров определен их вариабильностью и информативностью при изучении альфа-таксономии млекопитающих [11]. Для *cytb* и SORBS2 были использованы оригинальные праймеры (H_cyt_Rh: TAGAATTTTCAGCTTTGGGTGCT, L_cyt_Rh: AAACCACGACCAATGAC-ATGAAA, SORBS2_L730a: CCATCGAGTCTYTGCTGGAGGAAG и SORBS2_R1300a: CCTTCTCTTTTCAGC-CTTAATYTGGTAC). Для остальных ядерных маркеров последовательности праймеров были взяты из опубликованных работ [11–13]. Реакция амплификации включала

¹ Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Зоологический музей Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: selysius@mail.ru

35 циклов и осуществлялась при следующих условиях: денатурация — 94°C в течение 30 с, отжиг — 59°C (для *cytb*) и 60°C (для ядерных генов) в течение 1 мин, синтез — 72°C в течение 1 мин. Конечный синтез осуществлялся при 72°C в течение 6 мин. Опыты выполнены на приборе My Cycler 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 34 последовательности *cytb* и 213 последовательностей ядерных генов для 19 видов; виды родственного рода *Aselliscus* взяты в качестве внешней группы.

Последовательности выровнены с помощью программ BioEdit v7.1.3. и SeqMan Pro v.7.1. и скорректированы вручную. Реконструкция филогенетических деревьев выполнена методами максимального правдоподобия (ML) и максимальной экономии (MP) в программах RAUP* 4.0b10 и MEGA 5 и методом байесова анализа (BA) с помощью программы MrBayes 3.1.2. Далее выборка частных деревьев, полученных ML методом, была объединена в супердерево с использованием алгоритма MRP [14] при помощи программы RAxML (v8.2.9) с моделью GTRGAMMA. Для определения достоверности полученной топологии использовали процедуру “stratified bootstrap” со 100 репликациями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наши данные по гену *cytb* в целом согласуются с ранее опубликованными (напр. [3]). Топологии деревьев, построенных методами Байеса и ML, не имели существенных различий. Монофилия рода (относительно *Aselliscus*) поддержана на дереве, построенном методом Байеса (рис. 1).

Монофилия всех крупных форм рода имеет поддержки на нижней границе значимых. Среди крупных листоносов базальное положение занимает *H. diadema*. Вид *H. alongensis* занял сестринское положение к группе “swinhoei” (а не к “armiger”, как традиционно считали). *H. armiger* из Вьетнама оказался сестринским к *H. pendleburyi* (Таиланд) и *H. armiger terasensis* (Тайвань). В комплексе “larvatus” базальное положение заняла мелкая форма из Таиланда. Также отличия уровня вида от прочих включенных в анализ форм имеет *H. cf. poutensis* (из Северного Вьетнама). Популяции из Южного и Центрального Вьетнама, относимые к *H. grandis*, объединены в компактный кластер с другой формой из Таиланда.

Среди мелких листоносов многие клады оказались не поддержанными. Базальное положение ко всему роду занял *H. calcaratus*. Африканские *H. ruber*, *H. cafer* и *H. fuliginosus* в составе “Афри-

канской клады” и азиатские *H. galeritus*, *H. cervinus* образуют хорошо поддержанные монофилетические ветви. Группа “bicolor” в узком понимании имеет хорошие поддержки только методом Байеса. Базальное положение в ней занял индийский *H. durgadasi*. Два распространённых вида, *H. gentilis* и *H. cineraceus*, парафилетичны: *H. gentilis* из равнинных лесов юга Вьетнама и с Центрального Нагорья занимают сестринское положение к *H. khaokhouayensis*, а *H. cineraceus* из Малайзии — к *H. bicolor* s. str. из Таиланда.

Большинство ядерных генов, проанализированных по-отдельности, не дали деревьев с хорошо поддержанной топологией. Узлы внутривидовых дивергенций по отдельным ядерным генам не имеют значимых поддержек, как не имеет поддержек и монофилия рода в целом (относительно *Aselliscus*). Наиболее информативные деревья (большинство узлов которых, однако, также не имеет значимых поддержек) дают интрон TNY (рис. 2) и экзон RAG2.

Дерево, полученное для семи ядерных генов методом MRP, разрешило все узлы дивергенции надвидового уровня с максимальными поддержками (рис. 3), в том числе и базальное положение африканского *H. jonesi*. Все крупные азиатские листоносы формируют монофилетичную кладу. Среди них самое базальное положение занимает *H. diadema*. Ветка *H. alongensis* отходит базальнее, чем *H. swinhoei*. Последний занимает сестринское положение к кладе “armiger/larvatus”. В отличие от данных по митохондриальной ДНК, разделение *H. armiger* и *H. griffini* внутри данной клады не поддержано. Клады, соответствовавшие видовым комплексам “armiger” и “larvatus” имеют максимальные поддержки. Из них вторая имеет хорошо поддержанную внутреннюю дивергенцию, возможно, видового уровня. В частности, обособлена мелкая форма из северного Вьетнама (*H. cf. poutensis*) (рис. 4а).

Предполагавшееся родство африканских мелких листоносов и группы “galeritus” [2] на MRP-дереве не поддержано, однако родство обеих линий с группой “bicolor” несомненно. При этом азиатский *H. galeritus* образует более базальную кладу, чем африканские виды. Оба широко распространённых в Индокитае вида, парафилетичные по данным митохондриальной ДНК, формируют монофилетические клады. При этом *H. gentilis* из равнинных лесов Южного Вьетнама формирует в своей кладе наиболее базальную ветвь (рис. 4б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К сожалению, на настоящий момент не от всех видов, проанализированных по митохондриальным генам, удалось получить достаточный мате-

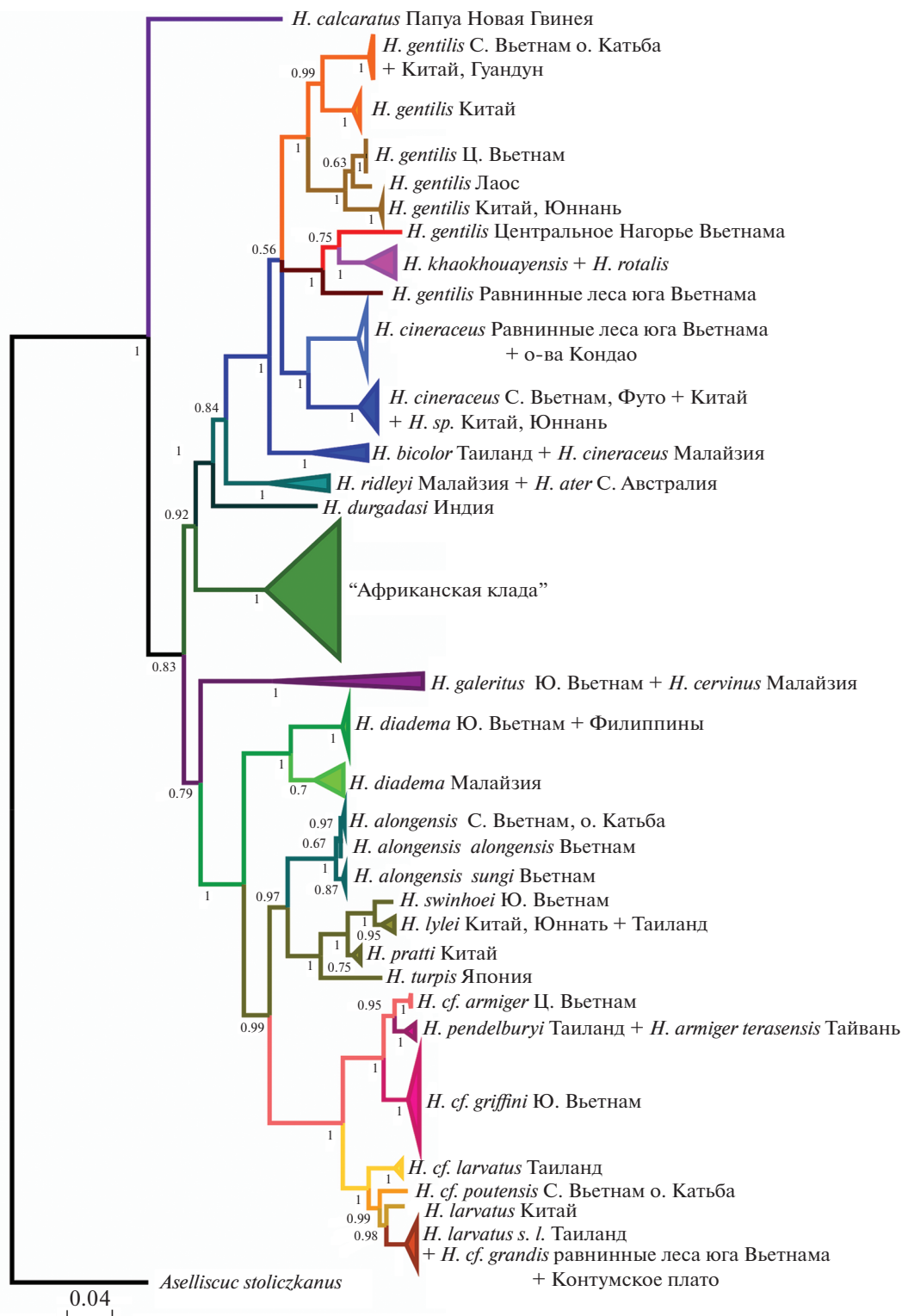


Рис. 1. Дерево филогенетических отношений внутри рода *Hipposideros* по последовательностям митохондриального гена *cyt b*, построенное методом Байеса (апостериорные вероятности получены для цепи в 6000000 генераций).

риал для включения их в итоговое MRP-дерево. Однако даже предварительные результаты показывают эффективность использованного подхода. Показано, что результаты анализа отдельных

ядерных генов могут быть использованы лишь как аргументы “за” или “против” в решении вопросов филогении рукокрылых, однако объединение топологий нескольких маркеров дает име-

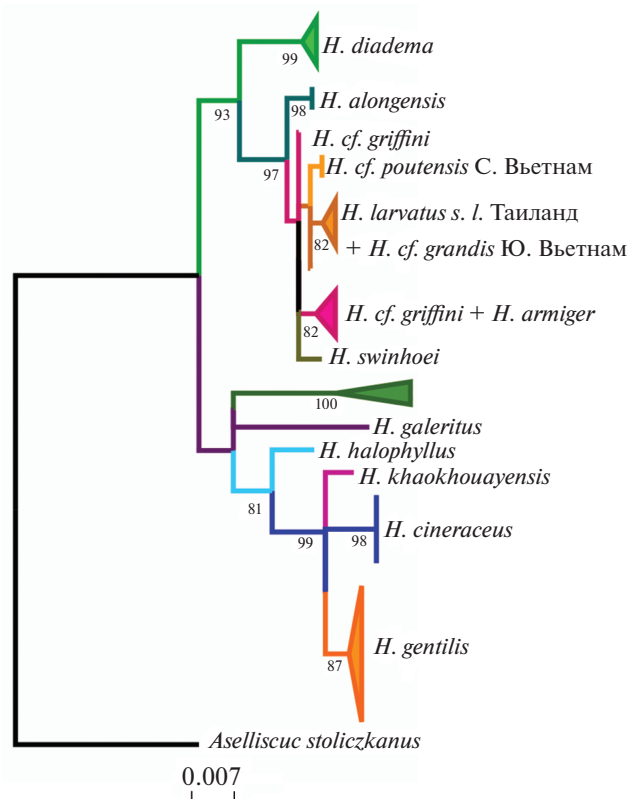


Рис. 2. Дерево филогенетических отношений внутри рода *Hipposideros* по данным ядерного интрона ТНУ, построенное методом Максимального подобия (ML). Под узлами ветвей указаны значения бутстреп-поддержек (получены из 1000 реплик).

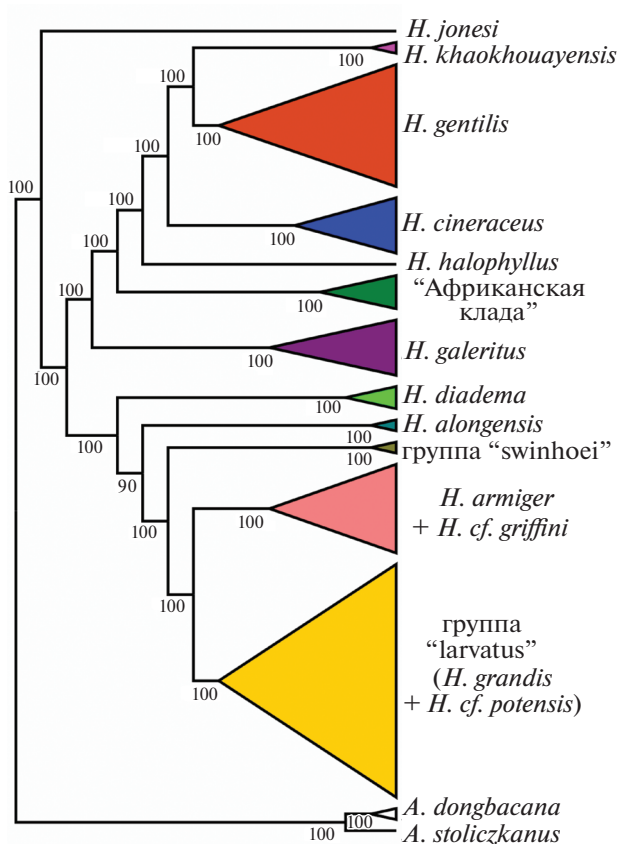


Рис. 3. Обобщенное дерево филогенетических отношений внутри рода *Hipposideros*, полученное по 7 ядерным генам методом Matrix Representation Parsimony (MRP). Виды рода *Aselliscus* использованы в качестве внешней группы. Под узлами ветвей указаны значения бутстреп-поддержек (получены из 1000 реплик).

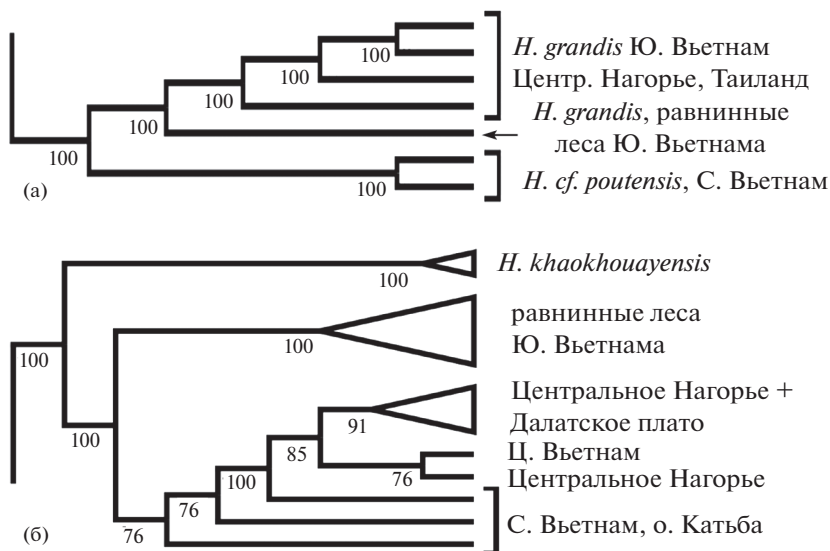


Рис. 4. Фрагменты филогенетического дерева, полученного по 7 ядерным генам методом MRP: а) филогенетические отношения форм комплекса "larvatus"; б) филогенетические отношения вьетнамских форм *H. gentilis*. Под узлами ветвей указаны значения бутстреп-поддержек (получены из 1000 реплик).

ющую высокие поддержки и хорошо интерпретируемую филогенетическую гипотезу.

В более частных аспектах подтверждено, что крупные азиатские листоносы представляют собой монофилетичную группу, заслуживающую ранг подрода, для которого в качестве действительного названия может быть использовано *Phyllorhina* Вонапарте 1837. Окончательное решение о названии требует изучения *H. speoris*, типового для *Hipposideros*, который пока не был вовлечен в молекулярные исследования, но особенности его морфологии [15] позволяют предполагать родство с мелкими, а не с крупными листоносами. Положение на дереве *H. galeritus* позволяет предположить, что мелкие африканские листоносы происходят от азиатских предков. Вид *H. alongensis*, вопреки ожиданиям, не является частью комплекса “*larvatus/armiger*”. Для комплексов форм, считавшихся парафилетическими (*H. larvatus* s. lato, *H. gentilis* и *H. cineraceus*), показано существование монофилетических клад. В качестве причины противоречий можно подозревать древние интрогрессии митохондриальной ДНК (известной и в других семействах рукокрылых; напр. [13]). Детальное рассмотрение этих ситуаций — предмет отдельных публикаций с применением большего массива генетических данных, включая данные по Y хромосоме, зарекомендовавшие себя в решении сложных таксономических ситуаций альфа-уровня.

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.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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 № АААА-А16-116021660077-3. А также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ гранта 17-04-00689а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monadjem A., Soisook P., Thong V.D., et al. Family Hipposideridae (Old World Leaf-nosed Bats) / Eds. Wilson D.E., Mittermeier R.A. Handbook of the Mammals of the World, Volume 9: Bats. Barcelona: Lynx Edicions, 2019. 1008 p.
2. Hill J.E. A revision of the genus *Hipposideros* // Bulletin of British Museum (Natural History). 1963. V. 11. № 1. P. 1–129.
3. Murray S.W., Campbell P., Kingston T., et al. Molecular phylogeny of hipposiderid bats from Southeast Asia and evidence of cryptic diversity // Molecular Phylogeny and Evolution. 2012. V. 62. P. 597–611.
4. Foley N.M., Goodman S.M., Whelan C.V., et al. Towards navigating the Minotaur’s labyrinth: cryptic diversity and taxonomic revision within the speciose genus *Hipposideros* (Hipposideridae) // Acta Chiropterologica. 2017. V. 19. № 1. P. 1–18.
5. Bogdanowicz W., Owen R.D. In the Minotaur’s labyrinth: The phylogeny of the bat family Hipposideridae / Eds. Kunz T.H., Racey P.A. Bat biology and conservation. Washington: Smithsonian Institution Press, 1998.
6. Wang H., Liang B., Feng J., et al. Molecular phylogenetic of Hipposiderids (Chiroptera: Hipposideridae) and Rhinolophids (Chiroptera: Rhinolophidae) in China based on mitochondrial cytochrome b sequences // Folia Zoologica. 2003. V. 52. № 3. P. 259–268.
7. Francis C.M., Borisenko A.V., Ivanova N.V., et al. The Role of DNA Barcodes in Understanding and Conservation of Mammal Diversity in Southeast Asia // PLoS ONE, 2010. V. 5. № 9. e12575.
8. Guillen-Servent A., Francis C.M. A new species of bat of the *Hipposideros bicolor* group (Chiroptera: Hipposideridae) from Central Laos, with evidence of convergent evolution with Sundaic taxa // Acta Chiropterologica. 2006. V. 8. № 1. P. 39–61.
9. Kruskop S.V. Dull and bright: cryptic diversity within the *Hipposideros larvatus* group in Indochina (Chiroptera: Hipposideridae) // Lynx, nová série (Praha). 2015. V. 46. P. 29–42.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning — a laboratory manual. Sec. ed. N.Y.: Cold Spring Harbour Lab. Press, 1989. 385 p.
11. Igea J., Juste J., Castresana J. Novel intron markers to study the phylogeny of closely related mammalian species // BMC Evolutionary Biology. 2010. V. 10. № 369. P. 1–13.
12. Matthee C.A., Burzclaff J.D., Taylor J.F., et al. Mining the mammalian genome for artiodactyl systematics // Systematic Biology. 2001. V. 50. P. 1–24.
13. Artyushin I.V., Bannikova A.A., Lebedev V.S., et al. Mitochondrial DNA relationships among North Palaearctic *Eptesicus* (Vespertilionidae, Chiroptera) and past hybridization between Common Serotine and Northern Bat // Zootaxa. 2009. V. 2262. P. 40–52.
14. Ragan M.A. Matrix representation in reconstructing phylogenetic relationships among the eukaryotes // Biosystems. 1992. V. 28. № 1. P. 47–55.
15. Dar T.H., Kamalakannan M., Venkatraman C., et al. New record of *Hipposideros speoris* (Chiroptera: Hipposideridae) from Myanmar hidden in the National Zoological Collections of the Zoological Survey of India // Mammalia. 2018. V. 83. № 5. P. 513–515.

ATTEMPT TO RECONSTRUCT PHYLOGENY OF THE *HIPPOSIDEROS* LEAF-NOSED BATS BASED ON NUCLEAR GENE MARKERS

A. P. Yusefovich^a, I. V. Artyushin^a, A. A. Raspopova^a, A. A. Bannikova^a, and S. V. Kruskop^{b,#}

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

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

[#]e-mail: selysius@mail.ru

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

The genus *Hipposideros* is one of the largest bat genera. The latest research of its Asian representatives has been done only with mitochondrial markers or single nuclear ones. In the present study the sample of all the main species groups have been used. The results of phylogenetic constructs based on mitochondrial, on single nuclear genes and on multiple nuclear markers analyzed using the MRP algorithm (Matrix representation with parsimony) have been compared. The latter provide the most supported and well-interpreted phylogenetic reconstruction. Monophily of the large Asian leaf-nosed bats has been shown claiming to be an independent taxon of the subgenus rank, as well as monophily of several species complexes which are paraphyletic according to mtDNA analysis.

Keywords: bats, taxonomy, phylogeny, nuclear DNA, Hipposideridae