

УДК 599.4 57.063.7

ПАРАФИЛИЯ НЕТОПЫРЕЙ (*PIPISTRELLUS*; VESPERTILIONIDAE) ПОДТВЕРЖДАЕТСЯ АНАЛИЗОМ ЯДЕРНЫХ ГЕННЫХ МАРКЕРОВ

© 2022 г. С. С. Жукова¹, Е. Н. Соловьева², И. В. Артюшин¹, С. В. Крускоп^{2,3,*}

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 15.08.2022 г.

После доработки 01.09.2022 г.

Принято к публикации 08.09.2022 г.

Существуют свидетельства того, что и в ныне принятом составе род настоящих нетопырей, *Pipistrellus*, может быть парафилетичным. Нами впервые изучены филогенетические отношения между большинством надвидовых таксонов подтрибы *Pipistrellina* на основании анализа последовательностей трех ядерных генов (RAG2, APOB и DMP1). Наши данные свидетельствуют в пользу монофилии самой подтрибы, однако определенно показывают, что род *Pipistrellus* в современном понимании парафилетичен относительно вечерниц, *Nyctalus*, и толстопалых нетопырей, *Glischropus* (оба таксона хорошо обособлены морфологически). Более того, вечерницы оказались крайне близки к “западной” кладе *Pipistrellus*. Вероятно, *Pipistrellus* должен быть разделен на два или более самостоятельных рода, либо *Nyctalus* и *Glischropus* должны быть включены в его состав в качестве подродов.

Ключевые слова: рукокрылые, систематика, филогения, ядерная ДНК, границы таксонов

DOI: 10.31857/S2686738922060361

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении десятилетий род нетопыри, *Pipistrellus*, был своего рода таксономической “мусорной корзиной”, объединяя мелких гладконосых летучих мышей с одной парой малых предкоренных зубов в верхней челюсти [1, 2]. Однако в результате морфологических, кариологических и молекулярно-генетических исследований [3–5] многие виды были исключены из его состава и перенесены в самостоятельные рода, зачастую неродственные собственно *Pipistrellus* (такие как *Hypsugo*, *Falsistrellus*, *Neoromicia*, *Arielulus*, *Perimyotis* и др. [6]). В принятом ныне объеме, род *Pipistrellus* несомненно объединяет формы, связанные сравнительно близким родством [4, 7], однако вопрос его монофилии остается открытым. Группа видов “*rueppeli*”, очевидно делавшая *Pipistrellus* парафилетичным, была выделена в самостоятельный род *Vansonia* [8]. Однако монофилия остальных

ных *Pipistrellus* всерьез не обсуждалась, хотя отдельные опубликованные данные указывали на то, что настоящие нетопыри, вероятно, парафилетичны относительно таких признанных родов, как *Nyctalus* и *Glischropus* [7–9].

Объем подтрибы *Pipistrellina* здесь принят в понимании [10] и соответствует трибе *Pipistrellini* согласно [6, 11]. Чтобы проверить гипотезу о парафилии *Pipistrellus*, нами были получены последовательности трех ядерных генов для ряда видов этого рода, а также родственных родов, и на их основе осуществлен филогенетический анализ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Геномную ДНК выделяли из фиксированных в этаноле проб тканей стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации [12]. Были получены последовательности трех ядерных генов (RAG2, 1234 bp; DMP1, 886 bp; и APOB, 889 bp). Выбор этих ядерных маркеров определен их вариабельностью и представленностью в ГенБанке, что позволило расширить анализируемую выборку. Последовательности праймеров взяты из опубликованных работ [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 с, отжиг с функцией touch down – 68–65° в течение 1 мин, синтез – 72°C в течение 1 мин. Конечный синтез осуществлялся при 72°C в течение

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

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

³ Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам

*e-mail: selysius@mail.ru

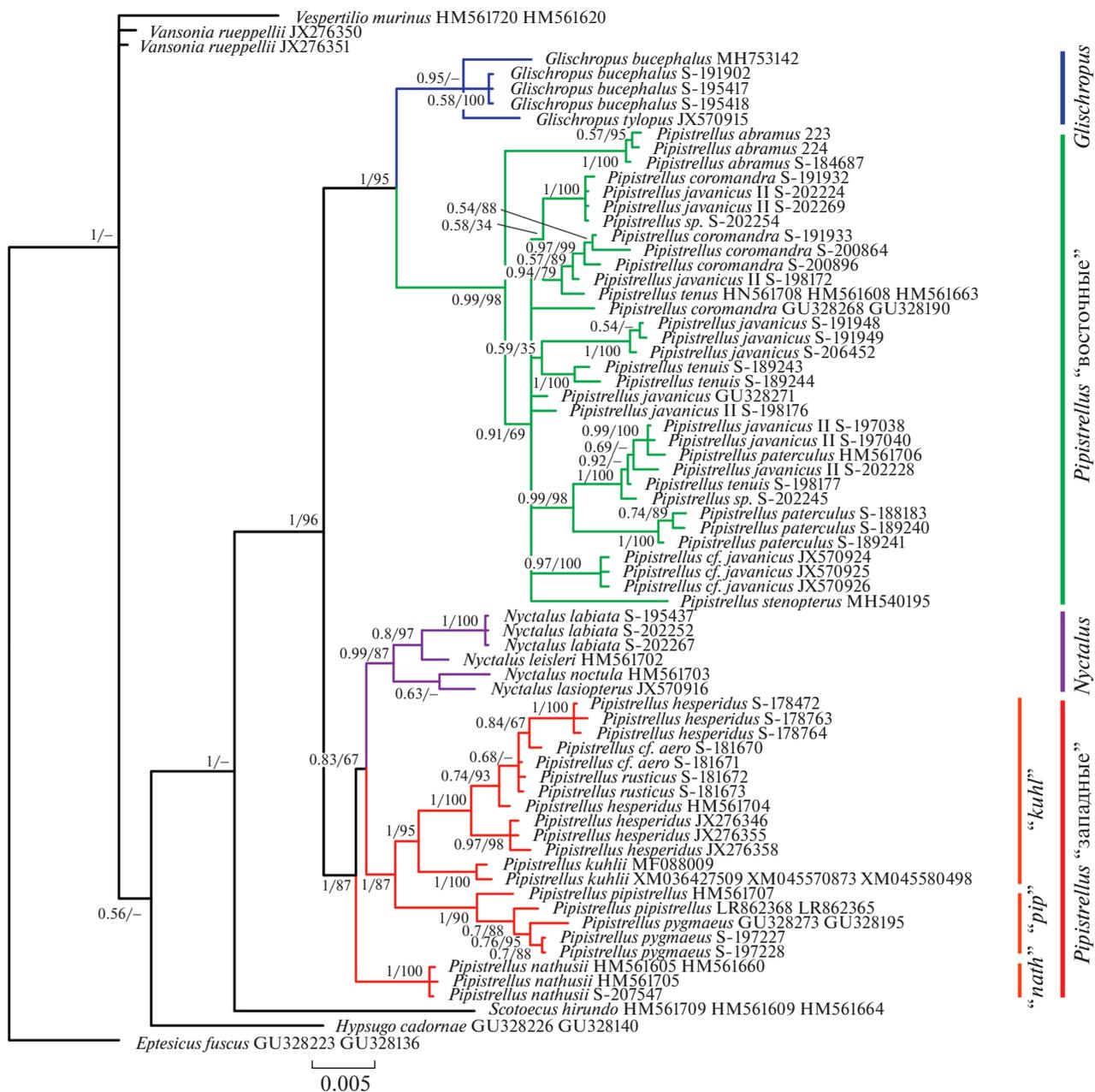


Рис. 1. Дерево филогенетических отношений подтрибы Pipistrellina по расширенному набору последовательностей ядерных генов APOB, DMP1, RAG2, построенное методом Байеса (апостериорные вероятности получены для цепи в 5 000 000 генераций), поддержки над или под узлами обозначают апостериорные вероятности/значения бутстрепа, полученные анализом ML. Цветом выделены четыре основных обсуждаемые клады; группы видов нетопырей “западной” клады: “nath” – *nathusii*, “pip” – *pipistrellus*, “kuhl” – *kuhl*.

ние 7 мин. Опыты выполнены на приборе Mu Cyclar 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 119 последовательностей ядерных генов для 11 видов; еще 66 последовательностей 10 видов были получены из ГенБанка. Виды ро-

дов *Eptesicus*, *Vespertilio* и *Hypsugo* взяты в качестве внешней группы. Номера использованных музейных экземпляров (обозначены литерой S) и номера ГенБанка 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. Анализ конкатенированных последовательностей выполнен в двух вариантах: “расширенном”, с максимальным

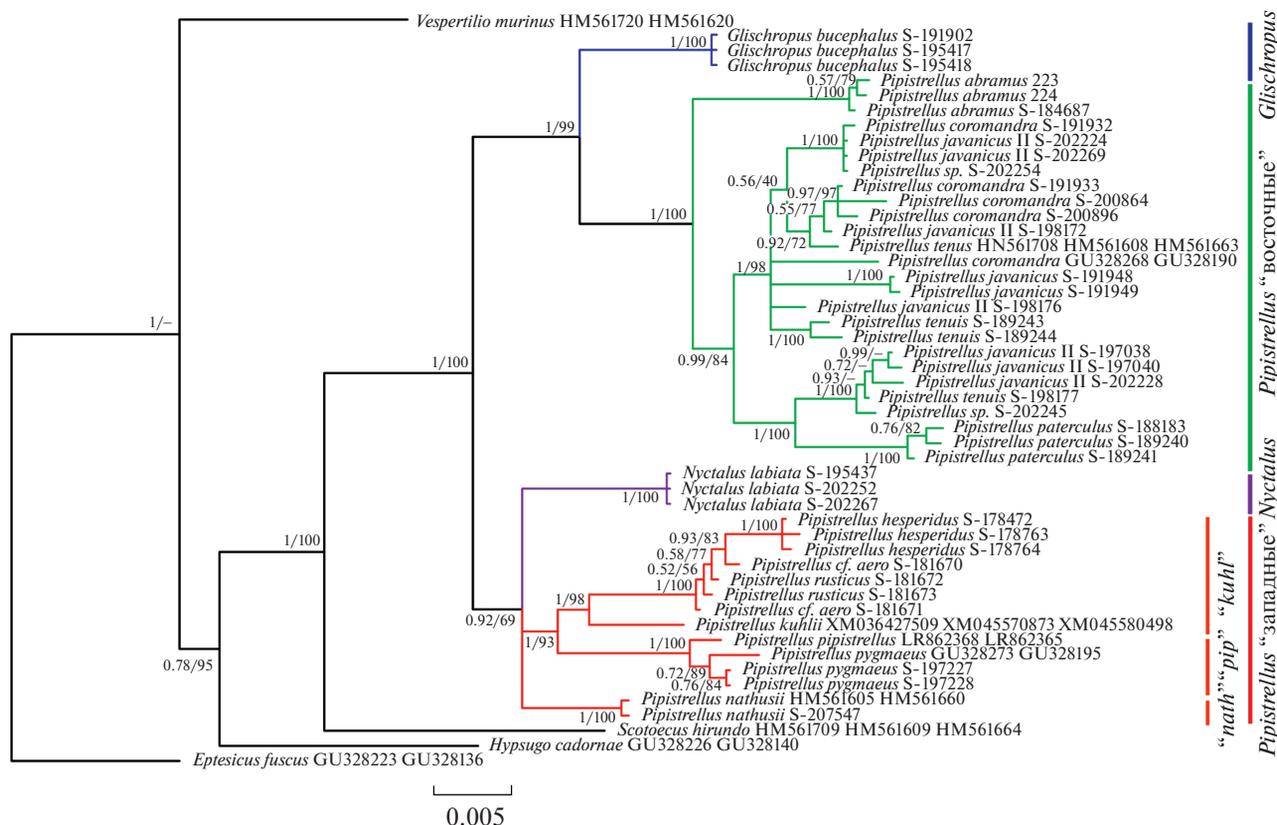


Рис. 2. Дерево филогенетических отношений подтрибы Pipistrellina по сокращенному набору последовательностей ядерных генов APOB, DMP1, RAG2, построенное методом Байеса (апостериорные вероятности получены для цепи в 5000000 генераций), цифры над узлами обозначают апостериорные вероятности/значения бутстрэпа, полученные анализом ML. Обозначения таксонов как в рис. 1.

таксономическим покрытием, и "сокращенном", куда включены только экземпляры, для которых получены последовательности хотя бы двух генов из трех.

Реконструкция филогенетических деревьев выполнена методами максимального правдоподобия (ML) при помощи программы IQ-Tree и методом байесова анализа (BA) с помощью программы MrBayes 3.1.2. Для определения достоверности полученной топологии ML использовали процедуру "bootstrap" с 1000 репликами. Некорректированные меж- и внутригрупповые *p*-дистанции посчитаны в программе MEGA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наши данные как по каждому отдельному гену, так и по конкатенированным последовательностям в целом согласуются с ранее опубликованными (напр., [7, 9]). Топологии деревьев, построенных методами Байеса и ML, не имели существенных различий. Монофилия подтрибы Pipistrellina относительно *Eptesicus* и *Vespertilio* поддержана на дереве, построенном по конкатенату методом Байеса (рис. 1, 2). Положение рода

Hypsugo (представленного видом *H. cadornae*) спорно, в ряде реконструкций он занимает сестринское положение к Pipistrellina либо корневое положение внутри нее. Роды *Vansonia* (*V. rueppeli*) и *Scotoecus* (*S. hirundo*), судя по полученным реконструкциям, принадлежат к кладе Pipistrellina, но их положение относительно друг друга неоднозначно.

Монофилия клады Pipistrellina в узком смысле (*Pipistrellus*+*Nyctalus*+*Glischropus*) имеет высокие поддержки на всех полученных реконструкциях. Она разделяется на две клады следующего порядка, одна из которых включает "западные" виды нетопырей (группы видов "pipistrellus", "kuhlii" и "nathusii") и род *Nyctalus*, а вторая — "восточные" виды нетопырей (группы видов "javanicus" и "stenopterus") и род *Glischropus*.

В "западной" кладе все три группы видов нетопырей монофилитичны и имеют максимальные поддержки. Положение *Nyctalus* неоднозначно: на некоторых деревьях, построенных по отдельным генам, вечерницы объединяются с группой видов "nathusii"; при "сокращенном" наборе таксонов формируется неразрешимая трихотомия

Таблица 1. Некорректированные *p*-дистанции (%) по расширенному набору конкатенатов генов яДНК: межгрупповые дистанции под диагональю, внутригрупповые – на диагонали, над диагональю – стандартная ошибка. Дистанции для *P. abramus* рассчитаны отдельно от остальных “восточных” *Pipistrellus*

	<i>P. abramus</i>	<i>Glischropus</i>	“восточные” <i>Pipistrellus</i>	группа видов “ <i>kuhlii</i> ”	<i>P. nathusii</i>	<i>Nyctalus</i>	группа видов “ <i>pipistrellus</i> ”
<i>P. abramus</i>	0.08	0.39	0.22	0.35	0.40	0.36	0.38
<i>Glischropus</i>	2.53	0	0.33	0.37	0.57	0.38	0.43
“восточные” <i>Pipistrellus</i>	1.99	2.40	1.17	0.31	0.36	0.30	0.34
группа видов “ <i>kuhlii</i> ”	3.70	2.80	3.64	0.63	0.29	0.26	0.26
<i>P. nathusii</i>	3.69	2.71	3.49	1.96	0	0.28	0.41
<i>Nyctalus</i>	3.55	2.76	3.26	2.17	1.63	0	0.28
группа видов “ <i>pipistrellus</i> ”	3.71	3.11	3.51	2.15	2.71	2.17	0.48

Таблица 2. Некорректированные *p*-дистанции (%) по сокращенному набору конкатенатов генов яДНК: межгрупповые дистанции под диагональю, внутригрупповые – на диагонали, над диагональю – стандартная ошибка

	“восточные” <i>Pipistrellus</i>	<i>Glischropus</i>	<i>Nyctalus</i>	“западные” <i>Pipistrellus</i>
“восточные” <i>Pipistrellus</i>	1.33	0.33	0.31	0.29
<i>Glischropus</i>	2.41	0.00	0.39	0.37
<i>Nyctalus</i>	3.29	2.76	0.00	0.23
“западные” <i>Pipistrellus</i>	3.59	2.88	2.13	1.44

Nyctalus – группа “*nathusii*” – группы “*pipistrellus*” и “*kuhlii*”.

В “восточной” кладе на всех реконструкциях род *Glischropus* занимает базальное положение. Все включенные в анализ “восточные” нетопыри формируют хорошо поддержанную монофилетическую группу. При этом базальное положение в ней занимает *P. abramus*, а не морфологически обособленный *P. stenopterus*.

Анализ каждого из ядерных генов дает в среднем более низкие поддержки большинства узлов, однако в целом топология этих деревьев не противоречит вышеописанной. Все три гена поддерживают монофилию подтрибы *Pipistrellina*, при этом во всех случаях род *Scotoecus* занимает в ней базальное положение. Разделение нетопырей на “западных” и “восточных” также поддержано каждым из генов, однако по гену *RAG2* монофилия “западной” клады имеет низкую поддержку, а данные по гену *DMP1* исключают *Glischropus* из “восточной” клады, делая равноценным членом неразрешенной трихотомии. Род *Nyctalus* на всех реконструкциях объединяется с “западной” кладой нетопырей.

Стоит отметить, что значение генетических *p*-дистанций между “восточными” и “западными” нетопырями выше, чем между этими кладами (и входящими в них группами видов) и родами

Glischropus и *Nyctalus* (табл. 1, 2). Аналогичную ситуацию демонстрируют опубликованные ранее дистанции по митохондриальным генам, хоть и посчитанные для меньшей таксономической выборки [9].

Таким образом, по нашим данным, род *Pipistrellus* в современном понимании безусловно парафилетичен относительно родов *Nyctalus* и *Glischropus*. Более того, генетическая линия морфологически обособленного рода *Nyctalus* с высокой вероятностью располагается внутри “западной” клады *Pipistrellus*, будучи обособленной от групп видов “*pipistrellus*” и “*kuhlii*” не в большей степени, чем группа “*nathusii*”. Все это говорит о необходимости пересмотра границ рода *Pipistrellus* и в целом таксономических границ в подтрибе *Pipistrellina*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные полностью подтверждают предположение о парафилии рода *Pipistrellus* в современном его понимании. Из ныне признанных надвидовых таксонов подтрибы *Pipistrellina* в нашем анализе отсутствует только род *Scotozous* (который еще не был изучен генетически). Однако его добавление в филогенетическую реконструкцию будет ставить вопрос только о его собствен-

ном статусе и не должно повлиять на относительное положение *Pipistrellus*, *Nyctalus* и *Glischropus*. Таким образом, “восточная” клада нетопырей должна быть выделена в самостоятельный таксон группы рода (род или подрод). При этом абсолютное большинство названий таксонов группы рода в пределах *Pipistrellus* s. lato было предложено для представителей “западной” клады (напр., [17]); единственное исключение — название *Alionoctula*, предложенное для морфологически обособленной группы видов “*stenopterus*” [9]. Таким образом, выделение “восточной” клады в самостоятельный род должно быть сопряжено с введением нового названия. Однако описание такого таксона требует уточнения его границ (за счет увеличения числа проанализированных видов) и составления его морфологического диагноза. Такая работа, определенно, должна быть сделана в ближайшем будущем.

Трактовка уровня таксономических различий между полученными кладами неоднозначна. Вечерниц традиционно рассматривают как хорошо обособленный самостоятельный род, однако его положение на филогенетическом дереве предполагает, что не только группа видов “*javanicus*”, но, возможно, и группа видов “*nathusii*” должны рассматриваться как самостоятельные роды. Альтернативным вариантом может быть рассмотрение всех групп видов нетопырей, а также *Nyctalus* и *Glischropus* как подродов в составе *Pipistrellus*, что противоречит предполагаемому времени дивергенции этих таксонов (средний миоцен [18, 19]). Аналогичные ситуации можно наблюдать и в других таксонах рукокрылых, например, в Molossinae (см. [20]). Таким образом, наше исследование, помимо решения конкретной таксономической проблемы, приобретает и методологическое значение.

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. 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 (№ гранта 22-24-00017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hill J.E., Harrison D.L. The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of *Pipistrellus* and *Eptesicus*, and the descriptions of a new genus and subgenus // Bulletin of the British Museum (Natural History), 1987. V. 52. P. 225–305.
2. Koopman K.F. Chiroptera: Systematics, VIII. Mammalia, part 60. New York: Walter de Gruyter, 1994. 217 p.
3. Horaček I., Hanak V. Generic status of *Pipistrellus savii* and comments on classification of the genus *Pipistrellus* (Chiroptera, Vespertilionidae) // Myotis, 1986. V. 23–24. P. 9–16.
4. Volleth M., Bronner G., Göpfert M.C., et al. Karyotype comparison and phylogenetic relationships of *Pipistrellus*-like bats (Vespertilionidae; Chiroptera; Mammalia) // Chromosome Research, 2001. V. 9. № 1. P. 25–46.
5. Kearney T.C., Volleth M., Contrafatto G., Taylor P.J. Systematic implications of chromosome GTG-band and bacula morphology for southern African *Eptesicus* and *Pipistrellus* and several other species of Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) // Acta Chiropterologica, 2002. V. 4. № 1. P. 55–76.
6. Moratelli R., Burgin C., Cláudio V., et al. Family Vespertilionidae (Vesper Bats) / Eds Wilson D.E., Mittermeier R.A. Handbook of the Mammals of the World, Volume 9: Bats. Barcelona: Lynx Edicions, 2019. 1008 p.
7. Roehrs Z.P., Lack J.B., Van Den Bussche R.A. Tribal phylogenetic relationships within Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) based on mitochondrial and nuclear sequence data // Journal of Mammalogy, 2010. V. 91. № 5. P. 1073–1092.
8. Koubínová D., Irwin N., Hulva P., et al. Hidden diversity in Senegalese bats and associated findings in the systematics of the family Vespertilionidae // Frontiers in Zoology, 2013. V. 10. № 48. P. 1–16.
9. Kruskop S.V., Solovyeva E.N., Kaznadzey A.D. Unusual *Pipistrellus*: taxonomic position of the Malayan Noctule (*Pipistrellus stenopterus*; Vespertilionidae; Chiroptera) // Zoological Studies, 2018. V. 57. № 60. P. 1–15.
10. Крусков С.В. Отряд Chiroptera / Ред Павлинов И.Я., Лисовский А.А. Млекопитающие России: систематико-географический справочник. Москва: Т-во научных изданий КМК, 2012. 604 с.
11. Hooper S.R., Van den Bussche R.A. Molecular phylogenetics of the chiropteran family Vespertilionidae // Acta Chiropterologica, 2003. V. 5. Suppl. P. 1–63.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning — a laboratory manual. Sec. ed. N.Y.: Cold Spring Harbour Lab. Press, 1989. 385 p.
13. 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 // Occasional Papers of Museum of the Texas Technical University, 2000. V. 202. P. 1–16.
14. 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 // Biology Bulletin, 2018. V. 45. № 5. P. 469–477.

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 in Molecular Biology*, 1999. V. 132. P. 71–91.
17. Ellerman J.R., Morrison-Scott T.C.S. Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758 to 1946. Second ed. London: British Museum (Natural History), 1966. 810 p.
18. Lack J.B., Van Den Bussche R.A. Identifying the confounding factors in resolving phylogenetic relationships in Vespertilionidae // *Journal of Mammalogy*, 2010. V. 91. № 6. P. 1435–1448.
19. Rosina V.V., Sinitsa M.V. Bats (Chiroptera, Mammalia) from the Turolian of Ukraine: phylogenetic and biostratigraphic considerations // *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie*, 2014. V. 272. № 2. P. 147–166.
20. Ammerman L.K., Lee D.N., Tipps T.M. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera) // *Journal of Mammalogy*, 2012. V. 93. № 1. P. 12–28.

PARAPHYLY OF THE PIPISTRELLES (*PIPISTRELLUS*; VESPERTILIONIDAE) IS CONFIRMED BY THE ANALYSIS OF THE NUCLEAR GENE MARKERS

S. S. Zhukova^a, E. N. Solovyeva^b, I. V. Artyushin^a, and S. V. Kruskop^{b,c,#}

^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

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

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

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

There are evidences that the genus *Pipistrellus* (true pipistrelles) in its current understanding may be paraphyletic. We have studied for the first time the phylogenetic relationships between the majority of supraspecific taxa of the subtribe Pipistrellina based on the analysis of the sequences of three nuclear genes (RAG2, APOB, and DMP1). Our data support the monophyly of the subtribe itself, but definitely show that the genus *Pipistrellus* in the modern sense is paraphyletic with respect to noctules, *Nyctalus*, and thick thumb pipistrelles, *Glischropus* (which both are morphologically distinct taxa). Moreover, noctules are extremely close to the “western” clade of *Pipistrellus*. The latter genus should probably be divided into two or more separate genera, or *Nyctalus* and *Glischropus* should be treated as its subgenera.

Keywords: Chiroptera, taxonomy, phylogeny, nuclear DNA, taxonomic boundaries