

На правах рукописи

ГОРОБЕЙКО
Ульяна Васильевна

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВОСТОЧНОЙ НОЧНИЦЫ *MYOTIS PETAH*
HOLLISTER, 1912 НА ЮГЕ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ**

1.5.12 - зоология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2022

Работа выполнена в лаборатории эволюционной зоологии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Картавецва Ирина Васильевна, д.б.н, с.н.с., ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН, главный научный сотрудник лаборатории эволюционной зоологии и генетики, г. Владивосток.

Официальные оппоненты:

Докучаев Николай Евгеньевич, д.б.н., с.н.с., ФГБУН «Институт биологических проблем Севера ДВО РАН», зав. лабораторией экологии млекопитающих, г. Магадан.

Романенко Светлана Анатольевна, д.б.н., ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики животных, г. Новосибирск.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Москва.

Защита состоится «15» февраля 2022 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630 091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 11. Факс: +7 (383) 2170 973, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН и на сайте института www.eco.nsc.ru.

Автореферат разослан: _____ 202_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических
наук



Петрожицкая
Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Отряд Chiroptera Blumenbach, 1779 - одна из наиболее богатых в плане видового состава групп млекопитающих и одновременно одна из самых малоизученных групп. Рукокрылые играют важную роль в окружающей среде и в жизни человека, летучие мыши и их паразиты могут выступать в роли переносчиков многих опасных заболеваний. По разным оценкам, отряд Chiroptera насчитывает порядка 1400 видов, в фауне Дальнего Востока России - 18 видов, в том числе 6 видов рода *Myotis* - Ночниц (Тиунов, 2011; Крускоп, 2012; Тиунов и др., 2021).

Традиционная систематика рукокрылых во многом построена на морфологических признаках, что в некоторых группах рукокрылых способствовало объединению слабо различающихся по морфологии видов в единый широкоареальный политипический вид. Одна из таких групп - род *Myotis*: пять из шести дальневосточных видов ночниц изначально были описаны как восточные формы в составе видов с транс-палеарктическим распространением. Надежными диагностическими признаками в систематике рода *Myotis* могут служить молекулярно-генетические (Horaček, Hanak, 1984; Yoshiyuki, 1989; Matveev et al., 2005; Kruskop et al., 2012; Ruedi et al., 2015) и кариологические характеристики, в особенности положение ядрышковых организаторов (ЯО-районы) и участков структурного гетерохроматина на хромосомах (Harada, Yoshida, 1978; Volleth, 1987; Ono, Obara, 1994; Volleth, Heller, 1994; 2012). Всё это позволяет говорить об актуальности комплексного подхода к анализу внутривидовой изменчивости при изучении данной группы.

Восточная ночница, *Myotis petax* Hollister, 1912, - один из наиболее распространенных азиатских видов рукокрылых и первый по встречаемости среди видов рукокрылых на юге Дальнего Востока России (Тиунов и др., 2021). До недавнего времени восточная ночница входила в состав водяной ночницы *M. daubentonii* Kuhl, 1819, но выделена в самостоятельный вид на основании совокупности морфометрических и молекулярно-генетических данных (Kruskop, 2004; Matveev et al., 2005). Восточная ночница имеет обширный ареал, включающий островные популяции, высокую плотность на зимовках и в кормовых станциях, что делает его потенциальным модельным объектом для изучения внутривидовой изменчивости. Вместе с тем,

M. petax является слабоизученным видом, в особенности в генетическом аспекте, что делает актуальным изучение его внутривидовой изменчивости и структуры вида.

Степень разработанности темы. На основании морфологических данных, для вида *Myotis petax* описано 4 подвида – один номинативный для территории Сибири (Hollister, 1912), три для Дальнего Востока: *M. p. ussuriensis* Ognev, 1927, *M. p. loukashkini* Shamel, 1942, *M. p. chasanensis* Tiunov, 1997. Данные подвиды различаются по комплексу краниометрических параметров (Тиунов, 1997; Kruskop, 2004; Wang et al., 2010; Тиунов и др., 2021). Ранее было установлено, что границы распространения подвида *M. p. petax* охватывают южную Сибирь (Kruskop, 2004; Крускоп, 2012), *M. p. ussuriensis* распространён в прибрежной и островной части Дальнего Востока (Тиунов, 1997; Kruskop, 2004; Wang et al., 2010; Крускоп, 2012; Тиунов и др., 2021). *M. p. chasanensis* в части работ объединяли с *M. p. loukashkini* в один подвид, населяющий Забайкалье, Приамурье и, возможно, юг Приморья (Kruskop, 2004; Крускоп, 2012; Тиунов и др., 2021), в других - *M. p. chasanensis* рассматривался как отдельный подвид, ареал которого ограничен Хасанским районом Приморского края (Тиунов, 1997).

Данные о внутривидовой генетической изменчивости восточной ночницы отсутствуют. Проведенные ранее молекулярно-генетические исследования в основном были направлены на поиск межвидовых различий между видами-двойниками *M. petax* и *M. daubentonii*, при этом с территории Дальнего Востока России в анализе были изучены только небольшие выборки *M. petax*. Так, анализ коротких диспергированных повторов ДНК (SINEs) проведён для особей восточной ночницы из Сибири и Дальнего Востока: Приморского края (n = 1), республики Бурятия (n = 1), республики Тыва (n = 1), республики Алтай (n = 3) и Алтайского края (n = 1), что позволило показать межвидовые различия *M. petax* и *M. daubentonii* (Matveev et al., 2005). ДНК-штрихкодирование с использованием частичной последовательности гена COI мтДНК проведено для 23 особей *M. petax* из республики Алтай (n = 4), Тывы (n = 7), Забайкальского края (n = 2), Приморского края (n = 1), Сахалинской области (n = 5), Монголии (n = 3) и Китая (провинция Хейлунцзян, n = 1) подтвердило, что из видов-двойников *M. petax* и *M. daubentonii* на территории Сибири и Дальнего Востока обитает только *M. petax* (Kruskop et al., 2012).

Оценить изменчивость на внутривидовом уровне и выявить структуру вида позволяют такие переменные последовательности, как ген *cyt b* и контрольный регион мтДНК. В тоже время, уровень различий по последовательностям гена *cyt b* мтДНК восточных ночниц с Дальнего Востока России ($n = 1$) и из Китая ($n = 17$) был низким ($GD = 0,2\%$) (Wang et al., 2010), а частичная последовательность контрольного региона мтДНК известна лишь для одной особи из Китая (Lu et al., 2013). Для четырёх восточных ночниц из Южной Кореи секвенирована полная последовательность митохондриального генома (Hwang et al., 2016).

Филогенетический анализ, проведенный на основании последовательностей гена *cyt b* мтДНК и ядерного гена *Rag2* ($n = 1$, Новосибирск), показал, что наиболее близким к *Myotis petax* является не *M. daubentonii*, в состав которого он входил ранее, а дальневосточный вид *M. macrodactylus* (Temminck, 1840) и восточноазиатские *M. pilosus* Peters, 1869 и *M. fimbriatus* (Peters, 1871) (Ruedi et al., 2013, Ruedi et al., 2015).

Кариотип *M. petax* слабо исследован, известна только рутинная окраска хромосом, с описанием числа и морфологии хромосом, для особей из Южной Кореи (Yoo, Yoon, 1992) и Приморского края РФ (Кораблев и др., 1989). Диплоидное число хромосом *M. petax* типично для видов рода *Myotis* и равно 44, число плеч аутосом (NFa) было различным у приморских (NFa = 50) и корейских особей (NFa = 52).

Цели и задачи исследования. Цель работы выяснить закономерности морфологической и генетической изменчивости *M. petax* на юге Дальнего Востока России, необходимые для уточнения внутривидовой структуры. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- исследовать особенности кариологической изменчивости с использованием методов дифференциально-окрашенных хромосом;
- изучить особенности половой, возрастной и географической изменчивости краниометрических параметров;
- проанализировать особенности изменчивости переменного участка контрольного региона мтДНК.

Научная новизна. В диссертационной работе впервые реализован комплексный подход к анализу внутривидовой изменчивости *M. petax* в восточной части ареала, расположенной в материковой части юга Дальнего Востока России, включая

морфологический, кариологический и молекулярно-генетический методы.

Применение методов дифференциальной окраски хромосом, впервые позволило показать кариологические отличия восточной ночницы от других видов рода *Myotis* и индивидуальные различия особей *M. petax* по содержанию и локализации гетерохроматина.

Впервые исследована вариабельность участка контрольного региона мтДНК восточной ночницы: выявлены вариации по длине последовательности в зависимости от числа повторов, географические различия по числу и вариантам повторов, а также описан короткий дополнительный R1-повтор, встречающийся в отдельных выборках *M. petax*. Установлено, что особи *M. petax*, отловленные на зимовке, представлены различными генетическими линиями по последовательностям контрольного региона.

Сравнение генетических и морфометрических данных позволило показать, что на юге Дальнего Востока России, помимо двух известных подвидов: *M. p. ussuriensis* и *M. p. chasanensis*, обитает «приамурская» форма восточной ночницы, отличающаяся по совокупности краниометрических признаков и последовательностям мтДНК.

Теоретическая и практическая значимость. Мониторинг состояния природных популяций рукокрылых, в том числе и исследование их морфологической и генетической изменчивости, имеет важное прикладное значение, в особенности на Дальнем Востоке России, где рукокрылые остаются слабо исследованной группой. Проведенная работа вносит значительный вклад в изучение генетической изменчивости и внутривидовой структуры одного из наиболее распространенных и часто встречающихся азиатских видов рукокрылых восточной ночницы *M. petax*.

Установлено, что *M. petax* имеет уникальные для ночниц генетические особенности: высокую внутривидовую изменчивость по содержанию гетерохроматина в кариотипе и дополнительный R1-повтор в контрольном регионе мтДНК. Вид может быть использован как модельный объект при изучении изменчивости по тандемным повторам в контрольном регионе мтДНК, поскольку отличается от других видов рукокрылых низкой или отсутствующей гетероплазмией по длине нуклеотидной последовательности при высокой изменчивости контрольного региона.

Методология и методы исследования. В настоящей работе проведен анализ внутривидовой изменчивости восточной нощницы комплексом методов, включающих классический морфологический анализ, хромосомный анализ и молекулярно-генетические методики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Дифференциальные GTG-, CBG- и AgNOR-окрашивания хромосом осуществлены по стандартным методикам (Seabright, 1971; Sumner, 1972; Howell et al., 1975; Miller et al., 1976). При анализе и микрофотографировании окрашенных препаратов использовали микроскоп AXIOSKOP 2 Plus (Zeiss, ФРГ), цифровую камеру и программное обеспечение META Systems (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия) Лаборатории микроскопии «Биотехнология и генетическая инженерия» (центра коллективного пользования ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН). Раскладки хромосом по парам сделаны в программе Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0.

Обработку крапиометрических данных по 16 параметрам произвели методами пошагового дискриминантного анализа в программе Statistica для Windows (www.statsoft.com). Для сравнения с дальневосточными выборками был использован материал из коллекции ЗМ МГУ, в том числе проанализированный в предшествующих морфологических исследованиях (Kruskop, 2004; Matveev et al., 2005).

Амплификация фрагментов мтДНК осуществлялась стандартной ПЦР в термоциклере MyCycler™ Thermal Cycler (Biorad, США) с использованием пар праймеров, смоделированных в настоящем исследовании. Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 3130 (Applied Biosystems, США) ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток).

Редактирование и выравнивание полученных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit 7.0.9.0. Внутривидовая нуклеотидная и гаплотипическая изменчивость подсчитана при использовании пакета программ DnaSP6 (Hall, 1999). Филогенетические реконструкции с использованием метода максимального правдоподобия (ML) и расчет попарных р-дистанции, включая определение наиболее

подходящей филогенетической модели с помощью программы ModelTest, выполнены в программе MEGA 5.05. 100 (Tamura et al., 2011). При построении сети гаплотипов использовано программное обеспечение Network 10 и метод “median joining”.

Личный вклад. Отлов животных, отбор проб для молекулярно-генетического анализа, приготовление хромосомных суспензий, окраска и анализ кариотипов, анализ полученных нуклеотидных последовательностей, ручная очистка черепов для морфологического анализа, снятие краниометрических промеров и обработка морфологических данных выполнены автором самостоятельно. Выделение ДНК и секвенирование нуклеотидных последовательностей были выполнены при участии автора.

Положения, выносимые на защиту.

1. Выявление внутривидовой структуры восточной ночницы возможно комплексным морфометрическим анализом с акцентом на локализацию гетерохроматинового материала на хромосомах и изменчивость контрольного региона мтДНК.

2. Повышенное генетическое разнообразие восточных ночниц в Приморском крае обусловлено присутствием в зимовочных колониях особей различных генетических линий по последовательностям контрольного региона мтДНК.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена комплексным подходом к анализу изменчивости на разных уровнях: от анализа фенотипа классическим морфологическим методом до особенностей структуры хромосом и вариаций последовательностей мтДНК. Полученные разными методиками результаты согласуются между собой, подкреплены рисунками и данными в таблицах, все материалы настоящего исследования задокументированы и соответствуют протоколам исследования и записям в лабораторных журналах.

Апробация результатов работы. Материалы диссертации были представлены на III Всероссийской конференции молодых ученых (Улан-Удэ, 2013), VII Всероссийской научной конференции (Биробиджан, 2018), Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium (Vladivostok, 2019), а также на ежегодных молодежных конференциях-конкурсах ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (Владивосток, 2014, 2018, 2019).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 10 публикаций, в том числе 3 публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК и входящих в базы цитирования Web of Science и Scopus.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений, а также трех приложений. Диссертация изложена на 136 страницах, содержит 34 таблицы и 18 рисунков. Список литературы содержит 151 источник, из них 112 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность своему научному руководителю, д.б.н. Картавцевой И.В. - за неоценимую помощь на всех этапах работы, к.б.н. Шереметьевой И.Н. - за помощь в работе над рукописью диссертации и овладении статистическим и молекулярно-генетическим методами анализа, Казакову Д.В. (Х-БИО, ТюмГУ) – за сотрудничество в полевых работах, к.б.н. Гуськову В.Ю. – за помощь в получении сиквенсов. Отдельная благодарность членам Владивостокского Спелеоклуба, сотрудникам Зейского и Комсомольского заповедников за помощь в организации экспедиций и полевых работ. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ-18-34-00285 мол_а, рук. Горобейко У.В.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В первой части главы описана история изучения рукокрылых на Дальнем Востоке России, рассмотрена проблематика и актуальность изучения дальневосточных представителей рода *Myotis*. Во второй подглаве обсуждена внутривидовая изменчивость видов рода *Myotis* на разных уровнях, включая морфологические характеристики, особенности кариотипа и изменчивость по нуклеотидным последовательностям. Заключительная часть главы посвящена характеристике объекта исследования, *M. petax*. Приведены морфологическое описание вида, данные по распространению и биологии, подвидовая структура и история изучения восточной ночницы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал настоящего исследования. В основу работы легли оригинальные сборы *M. petax*, отловленных в 2012-2018 гг. на территории Амурской области, Приморского и Хабаровского краев, республики Бурятия ($n = 30$). Отлов в летнее время производили паутинными сетями в кормовых станциях, зимой - ручным сбором в местах гибернации. В рамках краниометрического анализа помимо собственных данных, был исследован материал из коллекции Зоологического музея Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова. Всего промерено 92 черепа восточных ночниц из 28 регионов.

Исследованы хромосомные характеристики 8 особей восточной ночницы из двух регионов юга Дальнего Востока России. Последовательности первой субъединицы гена цитохромоксидазы (COI) исследованы для 23 особей *M. petax* и депонированы в GenBank под номерами MT383996-384013. Для 26 особей восточной ночницы получены последовательности контрольного региона D-петли митохондриальной ДНК.

Кариологический анализ. Суспензии хромосом получали прямым методом (Ford, Hamerton, 1956) и кратковременной культурой клеток красного костного мозга (Графодатский, Раджабли, 1988). Дифференциальные GTG-, CBG- и AgNOR-окрашивания хромосом осуществлены по стандартным методикам (Seabright, 1971; Sumner, 1972; Howell et al., 1975; Miller et al., 1976).

Морфологический анализ. Для краниометрического анализа использованы 16 параметров. Обработку данных производили методами пошагового дискриминантного анализа и анализа главных компонент в программе Statistica для Windows

Молекулярно-генетический анализ. ДНК-штрихкодирование применялось для уточнения видовой принадлежности особей, определенных по морфологии как *M. petax*, но отловленных в новых для вида локалитетах, либо в колониях, где совместно встречались несколько видов ночниц.

Для оценки внутривидовой генетической изменчивости проанализирована наиболее варибельная часть последовательности контрольного региона D-петли мтДНК.

Праймеры, использованные в работе, были смоделированы самостоятельно: для гена COI – прямой MPCO+ (5'-ATTTGCAATTCAATGTGTATT-3') и обратный MPCO- (3'-

ATAGCTCATACCATTCSTAT-5'), для контрольного региона – прямой МРСР+ (5'-ATCAATTATACTGGTCTTGTA-3') и обратный МРСР- (3'-AAGCTGTTAATTTTCATATGT-5').

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДНК-штрихкодирование и изменчивость по последовательностям COI. Все ночницы, отловленные в смешанных колониях и новых для вида локалитетах Дальнего Востока России и определенные как *M. petax* по морфологическим признакам, в действительности принадлежат к данному виду. В зимовочных колониях расположенных в пещерах Приморского края восточная ночница встречалась совместно с амурской, сибирской и длиннопалой ночницами, в смешанной колонии в Хабаровском крае – с амурской ночницей.

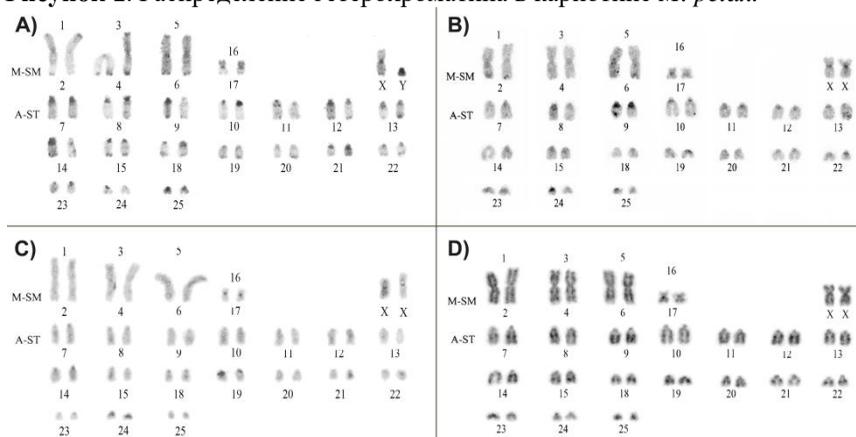
В материковой части Дальнего Востока России выявлено три (G1–3) гаплотипа COI и девять (G1–9) гаплотипов для *M. petax* на всем ареале, гаплотип G2 описан впервые (Gorobeyko et al., 2020). Для восточной ночницы характерны слабые генетические различия между отдельными особями, не превышающие 0,8%, и низкое нуклеотидное разнообразие по последовательностям COI.

Хромосомная изменчивость *M. petax* на юге Дальнего Востока России. Показано, что кариотипы *M. petax* из двух популяций юга Дальнего Востока России (Приморский край и Амурская область) одинаковы: $2n = 44$, $NFa = 52$. Распределение ЯО-районов и участков структурного гетерохроматина в кариотипе *M. petax* описаны впервые (Gorobeyko et al., 2020). Установлено, что у восточной ночницы прицентромерные ЯО-районы расположены на 12 акроцентрических парах №№ 7, 9, 10, 12, 13, 15, 18, 20, 21 и с 23 по 25.

Особи *M. petax* из Приморского края и Амурской области заметно различались по числу и локализации гетерохроматиновых блоков, их СВГ-окрашенные кариотипы представлены на рисунке 1 (А-D). Обнаружена внутривидовая изменчивость содержанию гетерохроматина в кариотипе: по наличию или отсутствию гетерохроматинового короткого плеча на самой маленькой паре аутосом, характерного для *M. petax* из Южной Кореи (Yoo, Yoon, 1992); по наличию прителомерных блоков гетерохроматина, ранее известных только для трех видов *Myotis* из Китая (Li et al., 2007;

Wang et al., 2009; Peng et al., 2011); а также по наличию интерстициальных блоков гетерохроматина.

Рисунок 1. Распределение гетерохроматина в кариотипе *M. petax*.



Примечание: А – 3259♂, Приморский край (PR11), В - 3338♀, Амурская область (ZEA), С - 3865♀, Приморский край (PR12), D – GTG-окрашенный кариотип 3865♀.

В кариотипе всех исследованных особей выявлены гетероморфные по содержанию гетерохроматина пары. Ранее внутривидовой полиморфизм отдельных гетерохроматиновых участков на одной или двух хромосомных парах отмечался для видов евразийских ночниц. Обнаруженная нами внутривидовая изменчивость по содержанию гетерохроматина в кариотипе *M. petax* не типична для видов ночниц.

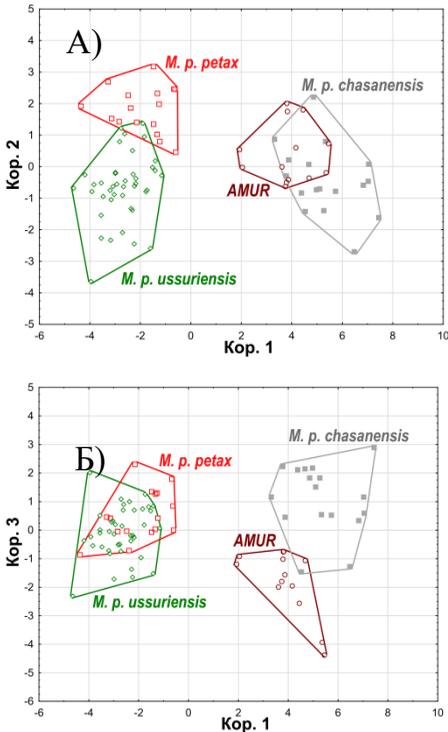
Краниометрическая изменчивость восточных ночниц. Проведенный анализ половой изменчивости краниометрических признаков свидетельствует об отсутствии в исследуемой выборке *M. petax* заметных различий в размерах черепа у самок и самцов, что позволило в дальнейшем не разделять выборки по половому признаку.

Попарное сравнение 13 региональных выборок по Т-критериям и два этапа последовательного дискриминатного анализа позволили объединить выборки в 4 обобщенные выборки: Манчжурия (MAN), Хасан (HAS), Приамурье (AMUR) и Сибирь (SIB).

На третьем этапе дискриминатного анализа обобщенные выборки разделились на два кластера по первой канонической

переменной: первый - «хасанская» и «приамурская» формы (HAS+AMUR), второй - «маньчжурская» и «сибирская» формы (MAN+SIB). При этом «маньчжурская» и «сибирская» формы различались по второй канонической переменной (рисунок 2А), а хасанская» и «приамурская» формы – по третьей (рисунок 2Б).

Рисунок 2. Дискриминантный анализ объединенных выборок *M. petax*



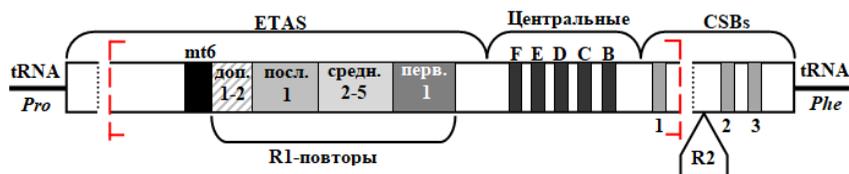
Три из выявленных морфологических форм соответствуют уже известным подвидам восточной ночницы: «сибирская» - *M. p. petax* (SIB), «маньчжурская» - *M. p. ussuriensis* (MAN) и «хасанская» - *M. p. chasanensis* (HAS). Ночницы «приамурской» формы не относятся ни к одному ранее известному подвиду восточной ночницы. Сравнение с известными для вида литературными данными показало, что ширина между молярами восточных ночниц «приамурской» формы выходит за рамки минимальных и максимальных значений признаков, описанных для вида и на 3,43% больше прежнего максимального значения для вида.

Изменчивость *M. petax* по последовательностям контрольного региона. Исследована последовательность контрольного региона мтДНК восточной ночницы (рис. 3), длина варьировала от 907 до 1212 п.н. Гетероплазмия по длине нуклеотидной последовательности отсутствовала.

Для восточной ночницы характерно высокое нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие по последовательностям

контрольного региона (Таблица 1). Выявлено повышенное нуклеотидное разнообразие в популяциях Приморского края.

Рисунок 3. Исследованный участок контрольного региона мтДНК.



Примечание. Рисунок представляет собой компиляцию схематических изображений контрольного региона из других работ (Wilkinson, Charman, 1991; Liu et al., 2009).

Проанализирована изменчивость по R1-повторам контрольного региона мтДНК. Все особи *M. petax* имели по одному первому R1-повтору (81 п.н.) и последнему R1-повтору (81 п.н.), число средних R1-повторов варьировало от 2 до 5 повторов длиной 81 п.н.. Помимо этого, у всех особей из Амурской области (ZEA) и одной особи из Приморского края (PRI2) между последовательностью mt6 и последними повторами обнаружены 1-2 коротких дополнительных повтора длиной 30 п.н.. Данный тип повторов впервые описан не только для вида, но и для рукокрылых в целом.

Таблица 1. Генетическое разнообразие *M. petax* по последовательности контрольного региона мтДНК.

Локалитет	N	H	S	Pi	h±SD	π±SD
Без повторов (554 п.н.)						
Приморский край (PRI)	9	6	15	5	0,833±0,127	0,00812±0,00230
Амурская область (ZEA)	9	3	1	1	0,556±0,165	0,00100±0,00030
Хабаровский край (КОМ)	4	3	5	-	0,833±0,222	0,00451±0,00157
Бурятия (BUR)	4	3	5	1	0,833±0,222	0,00481±0,00156
Южная Корея (KOREA)	4	1	-	-	0	0
Китай (KIT2)	1	1	-	-	0	0
Всего	31	17	42	28	0,935±0,026	0,01648±0,00238
С повторами (875-1180 п.н.)						
Приморский край (PRI)	9	7	45	16	0,917±0,092	0,01625±0,00346
Амурская область (ZEA)	9	6	9	1	0,833±0,127	0,00249±0,00103
Хабаровский край (КОМ)	4	4	18	1	1±0,177	0,00959±0,00326
Бурятия (BUR)	4	3	15	5	0,833±0,222	0,00872±0,00233
Южная Корея (KOREA)	4	4	7	-	1±0,177	0,00338±0,00102
Китай (KIT2)	1	1	-	-	0	0
Всего	31	25	91	63	0,972±0,017	0,02314±0,00256

Примечание: N – число особей в локальной выборке; H – число гаплотипов; S – число замен; Pi – число парсимонийзначимых замен; h±SD – гаплотипическое разнообразие; π±SD – нуклеотидное разнообразие.

Проведенное попарное сравнение нуклеотидных замен для последовательности контрольного региона выявило бимодальное распределение, что при высоком гаплотипическом ($h \pm SD: 0,972 \pm 0,017$) и высоком нуклеотидном разнообразии ($\pi \pm SD: 0,02314 \pm 0,00256$) может указывать на генетически разнообразную панмиктическую популяцию, либо на генетическую неоднородность восточной ночницы и наличие различных групп гаплотипов.

Подсчитаны варианты каждого типа R1-повторов и их встречаемость в популяции и географическая приуроченность отдельных повторов (Таблица 2).

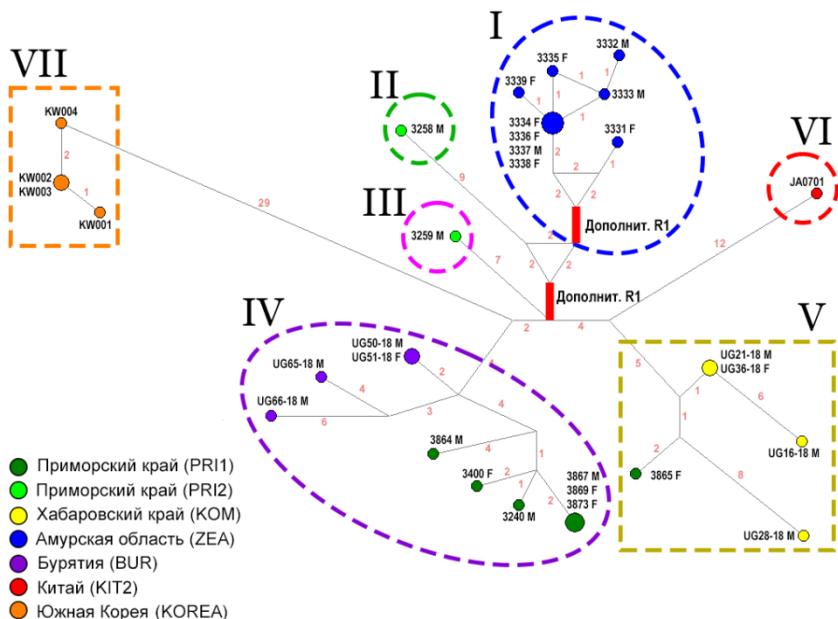
Таблица 2. Географическая приуроченность R1-повторов *M. petax*.

выборки	R1 add	R1L	R1M	R1F	Число повторов		
					min	max	Среднее
KOREA		L13	M28, M29, M30, M31	F7	6	6	6
KIT2		L5	M5, M6, M19	F11	5	5	5
ZEA	A1, A2, A3	L1, L2, L4	M1, M2, M3, M4	F5	4+2*	6+2*	5,2
КОМ		L6, L7, L8	M16, M18, M19 , M20, M21, M24	F10, F12, F13	5	6	5,25
PR11		L6, L9, L12	M8 , M11, M13, M17, M22, M23, M25, M26	F2, F3, F4, F12	5	7	5,8
PR12	A4	L1, L3	M1, M3 , M7, M27	F6, F9	4	5+1*	4,5
BUR		L9, L10, L11	M4, M8 , M9, M10, M12, M14, M15	F1, F8	5	6	5,5

Примечание. *- дополнительный повтор. R1L – последние повторы, R1M – средние повторы, R1F – первые повторы, R1 add – дополнительные повторы. Жирным шрифтом выделены повторы, обнаруженные более чем в одной популяции.

На рисунке 4 приведена сеть гаплотипов восточной ночницы, построенная по частичной последовательности контрольного региона. В полученной сети отсутствует центральный гаплотип и все гаплотипы объединяются в семь генетических линий (I-VII). Наибольшее генетическое разнообразие, выявленное у восточных ночниц, отловленных в пещерах Приморского края (PR11 и PR12), свидетельствует о том, что в пещеры на зимовку собираются особи, принадлежащие к разным генетическим линиям по последовательностям мтДНК. В то же время, *M. petax* относится к оседлым видам и не замечена в дальних миграциях (Тиунов, 1997; Kawai, 2009).

Рисунок 4. Сеть гаплотипов контрольного региона мтДНК *M. petax*.



Примечание: разные генетические линии выделены на рисунке разными цветами и римскими цифрами. I – «зейская» линия, включающая особей с двумя дополнительными повторами, II – «приморская» линия с одним дополнительным повтором, III – вторая «приморская» линия, IV – «бурятско-приморская» линия, V – «приамурская» линия, VI – «китайская» линия, VII – «корейская» линия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проанализирована внутривидовая изменчивость *M. petax* в восточной части ареала, на юге Дальнего Востока России.

Поскольку в зимовочных колониях, расположенных в пещерах Приморского края, восточная нощница встречается совместно с другими видами нощниц: амурской, сибирской и длиннопалой, для видовой идентификации особей во всех исследованных локалитетах проведен анализ ДНК-штрихкодирования, подтвердивший, что все нощницы в выборке принадлежат к виду *Myotis petax*. Сравнительный анализ последовательностей COI мтДНК восточной нощницы показал, что для дальневосточных особей характерно низкое нуклеотидное разнообразие последовательностей COI, при котором генетические различия между отдельными особями, не

превышают 0,8%. В материковой части юга Дальнего Востока России выявлено три гаплотипа COI (G1-3), из которых гаплотип G2 был описан впервые для вида.

Исследование хромосом *M. petax* позволило установить, что ее диплоидное число ($2n = 44$) типично для видов рода *Myotis*. Число плеч аутосом ($NFa = 52$) одинаково у всех исследованных особей и отличается как от ранее опубликованного для *M. petax* из Приморского края с $NFa = 50$ (Кораблев и др., 1989), так и для ночниц из Южной Кореи (Yoo, Yoon, 1992), поскольку число плеч последних было равно 52 за счет самой маленькой пары акроцентриков, несущей добавочное гетерохроматиновое плечо, а не короткого эухроматинового плеча на седьмой паре акроцентриков. На юге Дальнего Востока России короткое гетерохроматиновое плечо на самой маленькой паре акроцентриков у *M. petax* отсутствует.

Внутривидовая изменчивость по содержанию гетерохроматинового материала в хромосомах восточной ночницы выявлена впервые. Помимо изменчивости по наличию гетерохроматинового короткого плеча, в кариотипе особей *M. petax* из Приморского края обнаружены отчетливые прителомерные блоки гетерохроматина (Gorobeyko et al., 2020), которые ранее были описаны только для видов *Myotis* из Китая (Li et al. 2007; Wang et al., 2009; Peng et al., 2011). Интерстициальные блоки гетерохроматина на хромосомах известны для евразийских видов ночниц (Volleth, Heller, 1994, 2012), но ни для одного вида ранее не были описаны интерстициальные блоки на парах №№8, 11, 18, обнаруженные у особи из Приморского края.

В кариотипе всех исследованных особей выявлены гетероморфные по содержанию гетерохроматина пары. Внутривидовая изменчивость по распределению структурного гетерохроматина на хромосомах, выявленная у восточной ночницы, значительно выше, чем известно для рода *Myotis* (Harada, Yoshida, 1978; Volleth, Heller, 1994, 2012). Ранее подобный внутривидовой полиморфизм по содержанию гетерохроматина был описан для двух видов семейства Vespertilionidae: *Pipistrellus abramus* (Temminck, 1840) и *Vespertilio sinensis* Peters, 1880 (Ando et al., 1980; Harada et al., 1987; Ando et al., 1987; Ono, Obara, 1994; Ono, Yoshida, 1997; Lin et al., 2002; Wu et al., 2009; Gorobeyko, Kartavtseva, 2019).

Локализация ядрышкообразующих организаторов в прицентромерных районах хромосом и их число (12 ЯО-районов) для вида определены впервые. Данная характеристика позволяет дифференцировать восточную ночницу от других видов ночниц,

включая вид-двойник *M. daubentonii*, и может быть использована как дополнительный видовой признак

В исследуемой выборке *M. petax* не выявлены половая и возрастная изменчивость краниометрических признаков. Установлено, что значение ширины между молярами для восточных ночниц из Приамурья выходит за рамки максимальных значений признака, описанных для вида ранее, и на 3,43% превышает предыдущее максимальное значение. Высокая вариабельность и широкое перекрытие значений морфометрических признаков приводит к тому, что однозначно разделить отдельные выборки возможно только по совокупности краниометрических параметров.

Кластерный анализ краниометрических данных исследуемых выборок позволил выделить четыре морфологической формы *M. petax* - три на юге Дальнего Востока России: «маньчжурскую», «хасанскую» и «приамурскую», и одну «сибирскую» в западной части ареала (горы Алтай, в том числе республика Тыва). Три из выделенных форм можно соотнести с известными подвидами: *M. p. petax* – с особями «сибирской» формы, *M. p. ussuriensis* – с ночницами «маньчжурской» формы, *M. p. chasanensis* – «хасанской» формой. Особи четвертой «приамурской» формы (оз. Долгое Амурской области и окрестности г. Комсомольска-на-Амуре Хабаровского края) географически близки к месту первоописания подвида *M. p. loukashkini*, но отличаются по размерным характеристикам и не могут быть отнесены ни к *M. p. loukashkini*, ни к одному ранее описанному подвиду восточной ночницы.

Ночницы «приамурской» формы по совокупности характеристик наиболее близки к особям подвида *M. p. chasanensis*. Наибольший вклад в первую каноническую переменную, отделяющую ночниц из Хасана и Приамурья от всех остальных ночниц, вносили ширина мозговой капсулы, ширина мастоидной области, ширина рострума, ширина между внешними краями верхних клыков и длина верхнего зубного ряда. По сравнению с остальными восточными ночницами эти две группы обладают в среднем более длинным черепом и широкой мозговой капсулой при меньшей длине и ширине верхнего зубного ряда. Ночницы из Хасана и Приамурья отличались по третьей канонической переменной, в которую наибольший вклад внесли ширина мозговой капсулы, ширина рострума, ширина между верхними клыками и длина верхнего зубного ряда.

Вторая каноническая переменная разделяла ночниц из Сибири и Маньчжурии, наибольший вклад в неё вносили длина рострума, ширина рострума, ширина мастоидной области и межглазничная ширина. *M. p. petax* характеризуются немного меньшими размерами

череп, чем «хасанские» и «приамурские» ночницы, но более коротким и широким рострумом, в то время как у *M. p. ussuriensis* череп короче, но рострум длиннее и уже. Длина верхнего зубного ряда у *M. p. ussuriensis* и *M. p. petax* больше, чем у *M. p. chasanensis* и ночниц «приамурской» формы.

Анализ литературных данных показал, что при сопоставлении средних значений морфометрических параметров - длина предплечья, кондило-базальная длина, ширина мозговой капсулы, скуловая ширина и межглазничная ширина особей *M. petax* из Южной Кореи превышают средние значения, описанные для ночниц из других регионов, за исключением восточных ночниц из Хасанского района. Остальные средние значения краниометрических параметров, кроме высоты черепной коробки, у особей из Хасана и Кореи также совпадают. Это позволяет предположить, что ареал подвида *M. p. chasanensis* не ограничивается Хасанским районом Приморского края, но захватывает Корейский полуостров.

Изменчивость по последовательностям контрольного региона характеризовалась не только нуклеотидными заменами, но и вариациями по длине нуклеотидной последовательности за счет различного числа R1-повторов. Гетероплазмия по длине нуклеотидной последовательности для восточной ночницы обнаружена не была. Всего для вида, включая последовательности GenBank, обнаружено 25 вариантов контрольного региона, для Дальнего Востока России – 17 гаплотипов. Изменчивость последовательностей контрольного региона у восточных ночниц выше, чем последовательностей COI, генетические дистанции между отдельными особями в выборке достигали 5,3%, что почти вдвое превышает ранее описанные значения изменчивости контрольного региона для *M. bechsteinii*: 0,6-2,9% (Petri et al., 1996). Парные генетические р-дистанции между особями внутри группы варьировали от 0 до 5,3% и были сопоставимы с р-дистанциями между группами (0,1-4,3%).

Обнаружены все три характерных для рода *Myotis* типа повторов: все особи *M. petax* имели по одному первому R1-повтору (81 п.н.) и последнему R1-повтору (81 п.н.), число средних R1-повторов варьировало от 2 до 5 повторов длиной 81 п.н.. Помимо этого, у всех особей из окрестностей г. Зея Амурской области выявлены 2 коротких дополнительных R1-повтора длиной 30 п.н., у одной особи из пещеры Спасская Приморского края выявлен 1 дополнительный R1-повтор. Данный тип повторов описан как для восточной ночницы, так и для рукокрылых впервые.

Для восточной ночницы характерна внутривидовая изменчивость по числу, вариантам и сочетаниям R1-повторов. У разных особей повторы встречались в различных сочетаниях, полные совпадения по повторам наблюдались только у двух особей из Бурятии, двух особей из Приморья, четырёх особей из Амурской области.

Среди исследованных особей *M. petax* можно выделить семь генетических линий (I-VII), сходных как по нуклеотидной последовательности, так и по сочетанию вариантов R1-повторов. Наиболее удалена от остальных выборок восточных ночниц по числу замен VII группа - *M. petax* из Южной Кореи. Группы I и II, отличаются от всех остальных линий по наличию дополнительных R1-повторов в контрольном регионе: двух у особей из Амурской области (группа I) и одного у особи из пещеры Спасской Приморского края (группа II). Вторая особь из пещеры Спасской также выделяется в отдельную обособленную линию III. Вторая большая группа IV включает особей из Бурятии и пещеры Приморский Великан Приморского края. В линию V входят восточные ночницы из Хабаровского края и одна особь из пещеры Приморский Великан. Отдельную генетическую линию (VI) составляет особь из Китая.

Наибольшее генетическое разнообразие выявлено у *M. petax*, отловленных в пещерах Приморского края на зимовке. Так, восточные ночницы из пещеры Приморский Великан включают две генетические линии, одна из которых составляет единую группу IV с *M. petax* из Бурятии, а другая родственна ночницам из Хабаровского края (V). Отловленные в пещере Спасской особи значительно отличаются друг от друга по нуклеотидным заменам и наличию дополнительного повтора (II и III). Восточные ночницы, пойманные в летний период в Амурской области (I), Хабаровском крае (II) и республике Бурятия (III), являются более однородными группами. Это свидетельствует о том, что у оседлого вида *M. petax* в пещеры на зимовку собираются летучие мыши, принадлежащие к разным генетическим линиям по последовательностям мтДНК. Наличием четырех различных линий, по-видимому, обусловлено и повышенное нуклеотидное разнообразие восточных ночниц из Приморского края.

Распределение гаплотипов COI и контрольного региона мтДНК можно отчасти соотнести с подвидами и формами, выявленными на основании данных морфометрического анализа. По всей видимости, с номинативным подвидом ассоциированы гаплотипы COI - G7 и G8, выявленные у алтайских и тувинских особей. С подвидом *M. p. ussuriensis* связаны, по меньшей мере, шесть гаплотипов COI (G1-6)

и пять разных генетических линий (I-V) по последовательности контрольного региона мтДНК. Особи, морфологически принадлежащие к «приамурской» форме, имели один гаплотип COI (G2) и составляли отдельную генетическую линию V по последовательности контрольного региона. Таким образом, восточные нощницы «приамурской» формы образуют единую группу по краниометрическим характеристикам и последовательностям мтДНК.

Восточная нощница, *Myotis petax*, имеет уникальные генетические особенности: высокую внутривидовую изменчивость по содержанию гетерохроматина в кариотипе, дополнительный R1-повтор в контрольном регионе мтДНК, и отличается высокой морфологической изменчивостью, что требует дальнейшего исследования. Вид может быть использован как модельный объект при изучении изменчивости по тандемным повторам в контрольном регионе, поскольку отличается от других видов рукокрылых отсутствием гетероплазмии по длине нуклеотидной последовательности при высокой изменчивости контрольного региона.

ВЫВОДЫ

1. В кариотипе *M. petax* число хромосом ($2n = 44$), число плеч аутосом ($NFa = 52$), количество и локализация ядрышкообразующих районов (12 ЯО-районов) стабильны. Восточной нощнице свойственна внутривидовая изменчивость в распределении гетерохроматинового материала на хромосомах, заключающаяся в наличии или отсутствии прителомерных и интерстициальных гетерохроматиновых блоков, а также короткого плеча на самой маленькой паре аутосом.

2. На юге Дальнего Востока России у *M. petax* не выявлены половые различия по морфометрическим признакам, что дает возможность исследовать изменчивость в неразделенных по полу выборках. Краниометрические параметры восточной нощницы имеют высокий уровень изменчивости. Размах значений параметров перекрывается при сравнении разных выборок.

3. По данным краниометрического анализа и последовательностям мтДНК на юге Дальнего Востока России обитает «приамурская» форма восточной нощницы, которая отличается от ранее описанных дальневосточных подвидов. Ширина между молярами «приамурской» формы на 3,43%

превышает ранее установленные пределы изменчивости данного параметра для *M. petax*.

4. У восточной ночницы существует географическая изменчивость по числу, вариантам и сочетаниям R1-повторов контрольного региона мтДНК. У особей из окрестностей г. Зеи Амурской области и пещеры Спасская Приморского края присутствуют дополнительные R1-повторы длиной 30 п.н., ранее не известные для рукокрылых.

5. Повышенное генетическое разнообразие, обнаруженное у восточной ночницы в Приморском крае, связано с присутствием особей различных генетических линий по последовательностям контрольного региона мтДНК на зимовках в пещерах Приморского края.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК:

1. Картавцева И.В., Горобейко У.В., Тиунов М.П. Современное состояние хромосомных исследований Рукокрылых (Chiroptera) Дальнего Востока России. // Зоологический журнал. 2014. Т. 93, № 7. С. 887–900. doi: 10.7868/S0044513414070083

2. Gorobeyko U.V., Kartavtseva I.V. Karyology of the Bats from the Russian Far East. // In: Larramendy M., Soloneski S. (Eds). Cytogenetics – Past, Present and Further Perspectives. IntechOpen. 2019. P. 75–97. doi: 10.5772/intechopen.78767

3. Gorobeyko U.V., Kartavtseva I.V., Sheremetyeva I.N., Kazakov D.V., Guskov V.Yu. DNA-barcoding and a new data about the karyotype of *Myotis petax* (Chiroptera, Vespertilionidae) in the Russian Far East. // Comparative cytogenetics. 2020. V. 14, № 4. P. 483–500. doi: 10.3897/CompCytogen.v14i4.54955

Статьи, опубликованные в периодических изданиях:

4. Горобейко У.В. О применении хромосомного метода в исследовании рукокрылых (Chiroptera) Дальнего Востока России. // Научный фонд "Биолог" Ежемесячный научный журнал. 2014. №. 2. С. 55–57.

5. Горобейко У.В. Об истории изучения летучих мышей во Владивостоке за последнее столетие. // Региональные проблемы. 2018. Т. 21, №. 2. С. 33–38. doi: 10.31433/1605-220X-2018-21-2-33-38

6. Горобейко У.В., Шереметьева И.Н., Казаков Д.В. Краниометрическая изменчивость восточной ночницы *Myotis petax* Hollister, 1912 (Vespertilionidae, Chiroptera) на юге Дальнего Востока России. // Биота и среда природных территорий. 2021. № 3. С. 71–87. doi: 10.37102/2782-1978_2021_3_5

Работы, опубликованные в материалах всероссийских и международных конференций:

7. Горобейко У.В., Картавцева И.В., Тиунов М.П. Хромосомная изученность рукокрылых (Chiroptera) Дальнего Востока России. // Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы: материалы III Всероссийской конференции молодых ученых. (Улан-Удэ, 16-21 сентября 2013 г.). Улан-Удэ, 2013. С. 5–7.

8. Горобейко У.В., Картавцева И.В. О хромосомной изменчивости восточной ночницы (*Myotis petax*) на Дальнем Востоке России. // Современные проблемы регионального развития (Электронный ресурс): тезисы VII Всероссийской научной конференции, (Биробиджан, 9-11 октября 2018 г.). Биробиджан, 2018. С.158–159. doi: 10.31433/978-5-904121-22-8-2018-158-159

9. Gorobeyko U.V., Kartavtseva I.V., Guskov V.Yu., Sheremetyeva I.N., Kazakov D.V. Intraspecific genetic variability in the far eastern bat *Myotis petax* based on mtDNA nucleotide sequence data. // Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics: Program and Abstract of International Symposium. Vladivostok. 2019. P. 24.

10. Казаков Д.В., Шумкина А.П., Горобейко У.В., Ботвинкин А.Д., Морозов О.Н. Сворминг рукокрылых в Сибири и на Дальнем Востоке. // Экологические особенности биологического разнообразия: материалы VIII Международной конференции. Душанбе, 2019. С. 76–77.