

海南属种新纪录——中华山蝠的回声定位 信号、栖息地及序列分析

朱光剑¹, 韩乃坚², 洪体玉³, 谭敏³, 于冬梅¹, 张礼标^{1,*}

(1. 广东省昆虫研究所, 广州 510260; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101;
3. 广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 2007年11月, 在海南岛脊椎动物调查过程中, 于南部陵水黎族自治县一处电线杆内捕到1只雄性蝙蝠标本, 通过形态特征和线粒体DNA ND1基因序列鉴定, 确认为蝙蝠科(Vespertilionidae)山蝠属(*Nyctalus*)的中华山蝠(*N. plancyi*), 该属、该种均为海南省翼手目新纪录。其主频为33–34 kHz, 脉冲持续1.3–1.9 ms; 栖息于电线杆内; 与四川中华山蝠DQ435074的ND1一致度达到99%。

关键词: 中华山蝠; 海南岛; ND1基因; 新纪录; 栖宿地

中图分类号: Q959.833 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853-(2008)04-0447-05

Echolocation Call, Roost and ND 1 Sequence Analysis of New Record of *Nyctalus plancyi* (Chiroptera: Vespertilionidae) on Hainan Island

ZHU Guang-jian¹, Han Nai-jian², HONG Ti-yu³, TAN Min³, YU Dong-mei¹, ZHANG Li-biao^{1,*}

(1. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China; 2. Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: One male bat was captured by mist-net on a telegraph pole in the Li Autonomous County, Hainan Island in November 2007. It was identified as *Nyctalus plancyi* (Chiroptera: Vespertilionidae) based on the morphological data and mitochondrial ND1 gene sequence, and presented as the first record from Hainan Island. *N. plancyi*, which roosted daily on a telegraph pole in Hainan Island, emitted a pulse with an energy frequency between 33 - 34 kHz, and pulse duration between 1.3-1.9 ms, maximum identity based on ND1 sequence analysis between Hainan Island and Sichuan was 99%.

Key words: *Nyctalus plancyi*; Hainan Island; ND1 gene; New record; Day-roost site

山蝠属 (*Nyctalus*) 隶属于蝙蝠科 (Vespertilionidae), 包含 8 个种, 该属仅 2 种在国内有分布, 分别是中华山蝠 (*Nyctalus plancyi*) 和大山蝠 (*N. aviator*) (Simmons, 2005), 前者分布于安徽、江苏、上海、浙江、福建、台湾、江西、广东、香港、广西、湖南、湖北、贵州、云南、四川和台湾 (Simmons, 2005; Wang, 2003); 后者则见于内蒙古、黑龙江、吉林、河南、上海和安徽 (Wang, 2003)。海南此前未见该属蝙蝠种类的分布记录。

1 研究地点和方法

1.1 研究地点

海南省陵水保亭黎族自治县位于海南岛南部 (N18°37', E109°57')。年降雨量在 2000 mm 以上, 气候温热高湿 (Xu et al, 1983)。研究点周围有大片农田和多条灌溉渠。附近散布居民村落, 植被主要是人工栽培乔木, 有荔枝 (*Litchi chinensis*)、龙眼 (*Dimocarpus longan*) 和菠萝蜜 (*Artocarpus heterophyllus*) 等, 另有多丛粉单竹林 (*Bambusa*

收稿日期: 2008-04-01; 接受日期: 2008-05-21

基金项目: 中华人民共和国科学技术基础性工作专项 (2006FY110500)

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhanglibiao334@126.com

第一作者简介: 男, 硕士, 研究方向为动物生态学。E-mail: zhugi609@hotmail.com

chungii), 灌木稀少。

1.2 测量和声音录制

2007年11月,在海南岛兽类资源考察过程中,用雾网从一处水泥电线杆内捕到1只雄性蝙蝠,形态鉴定为蝙蝠科山蝠属中华山蝠,用游标卡尺测量外部形态数据(精确到0.1mm),用便携式电子秤测量体重(精确到0.1g)。测量结束后,把Avisoft UltraSoundGate(116型,德国)通过USB接口连接到笔记本电脑,采样频率设置为500kHz,FFT为512格式,打开Avisoft Recorder USG软件包实时录制回声定位信号。分析声音时,将Avisoft Bioacoustics Hardlock接入USB口,打开Avisoft SASLab Pro(德国)软件,在哈明窗(Hamming window)下,从语谱图(spectrogram)分析起始频率(start frequency)、终止频率(end frequency)、脉冲间隔(interpulse interval)和脉冲时间(duration);从能谱图(power spectrum)分析主频(最大能量处的频率)。

1.3 线粒体ND1基因的扩增与分析

使用直径3mm的打孔器采集该蝙蝠个体的翼膜,保存在无水乙醇中。随后的基因组提取使用QIAGEN公司的基因组提取试剂盒,步骤完全按照说明书操作,基因组最后溶于200 μ L的AE中,根据1%的琼脂糖电泳检测其浓度大致为20ng/ μ L。

扩增ND1基因的引物为L16s(5'-CCTCGATGT-TGGATCAGG-3')和HtMet(5'-GTATGGGCCCCG-ATAGCTT-3')(Cao et al, 1998)。扩增反应体系为50 μ L,包括TaKaRa公司的Premix Taq®(Ex Taq™ Version, code: DRR003A)25 μ L,10 μ mol/L的引物各1 μ L,20ng/ μ L的DNA模板1 μ L,最后用水补齐。扩增条件为:94°C预变性5min;94°C变性30s,55°C退火30s,72°C延伸1min,循环30次;72°C延伸10min。扩增反应在东胜创新实验技术有限公司的东胜·龙PCR仪(EDC-810型)上进行。经1%琼脂糖电泳检测目的条带,使用的DNA marker为D2000[购自天根生化科技(北京)有限公司]。随后将这些产物直接送到上海英俊公司进行纯化和双向测序,测序使用ABI 3730型自动分析仪。测序结果利用Bioedit 7.0.5.3软件包进行序列拼接。

我们使用MEGA4.0(Tamura et al, 2007)内嵌的Clustal W(Thompson et al, 1994)将拼接到的原始序列(一般在1300bp左右)在GenBank上进

行nBLAST搜索(参数设置为默认),以确认该序列中ND1基因的范围以及物种可能的归属,之后将序列在GenBank中注册。

2 结果

2.1 形态特征

捕获的标本编号GD0064,现存于广东省昆虫研究所。该号标本为雄性,体型中等,体重29.2g,头体长(吻端至肛门)74.5mm,前臂长51.0mm,耳大,钝角三角形状,耳壳后缘延伸至颌角后缘,耳垂延伸至口角下缘。耳屏明显,耳屏基部细弱,中间弯曲加粗,成肾形。翼狭且长,距缘膜明显,尾较长。被浓密黑褐色体毛,鼻吻部被毛稀疏,腹面体毛为黄褐色。第一指较短,指垫明显,第五掌骨长<第四掌骨长<第三掌骨长,指骨长较掌骨长为短,第五掌骨第一指骨和第二指骨长之和不及第五掌骨的一半。后足较为粗壮。

头骨平缓而宽阔,鼻吻部短而宽,矢状脊低矮,眶间距收缩明显,额骨不突出。上颌门齿2枚,第二门齿退化,弱小,犬齿1枚,前白齿2枚,第1前白齿退化,白齿3枚,白齿具4尖,齿根2裂,

齿式 $\frac{2 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 3}{3 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 3} = 34$ (图1)。

2.2 回声定位信号和栖息地

中华山蝠的回声定位信号由两个较为陡峭的下扫谐波组成,能量集中在第一谐波上,能量最高时的频率出现在33—34kHz,脉冲持续1.3—1.9ms,脉冲间隔为39.8—40.1ms,频宽(第二谐波的最高频率与基波的最低频率之差)较宽,达50kHz(图2)。同时,调查中发现中华山蝠白天栖息在高约6m、底部半径近20cm、顶部半径不足5cm的圆柱形水泥电线杆里,栖息位置位于距电线杆顶端1m处的位置,顶部有水泥封口形成的自然掩体,在网捕过程中观察到出飞个体3只,得到标本1号。

2.3 ND1序列分析结果

经1%琼脂糖电泳,观察到在DNA marker 1000—2000bp条带之间有一明亮条带(图3)。测序拼接后的原始序列通过BLAST分析,去除了两端的非ND1基因片段,获得完整的ND1序列(957bp)。该序列的GenBank注册号为EU573078。

BLAST的结果显示该序列与网上已知的两条来自四川的中华山蝠序列DQ435074(Thabah et al, 2007)和AB079820(Kawai et al, 2002)具有99%的最大一致性,而与其他物种均在85%以下。

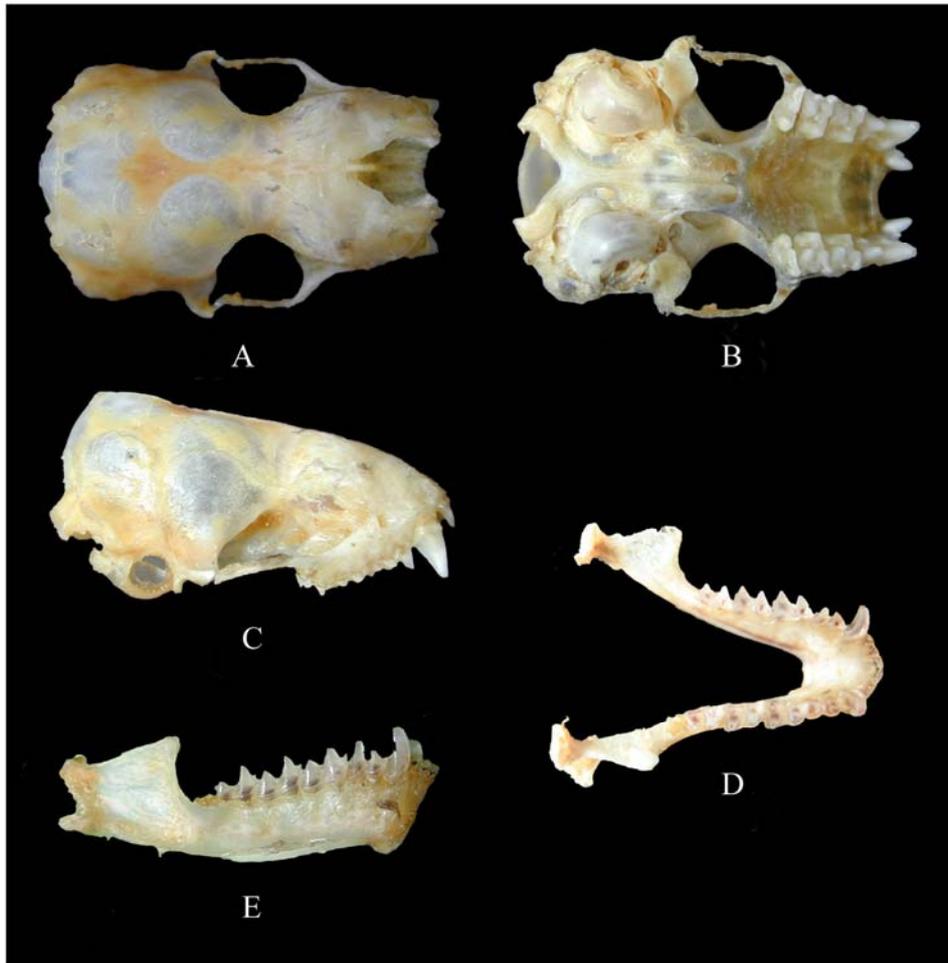


图 1 中华山蝠头骨

Fig. 1 Skull photo of *Nyctalus plancyi*

A: 上颌正面观 Cranium, dorsal view; B: 上颌腹面观 Cranium, ventral view; C: 上颌侧面观 (右) Cranium, right side view; D: 下颌 Mandible; E: 下颌侧面观 (右) Mandible, right side view.

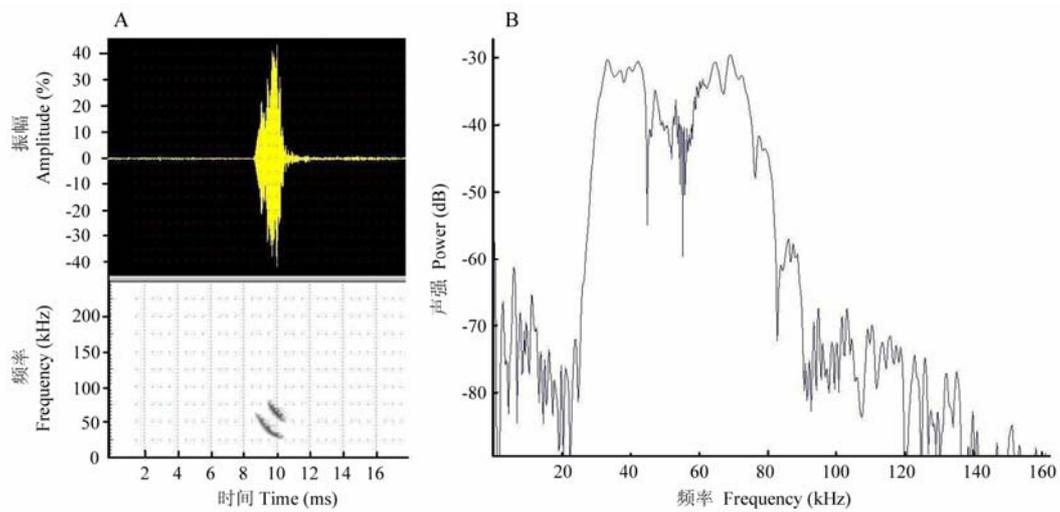


图 2 海南中华山蝠回声定位信号

Fig. 2 Echolocation calls of *Nyctalus plancyi* in Hainan Island

A: 语谱图 Spectrogram; B: 能量谱图 Power spectrum.

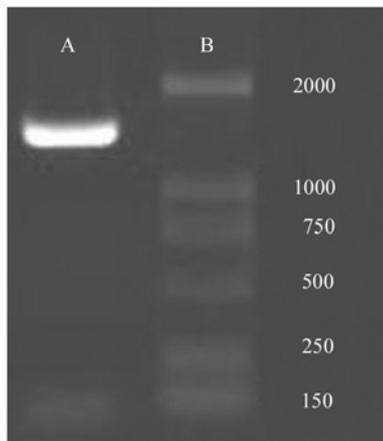


图 3 海南山蝠的 1% 琼脂糖电泳图
Fig. 3 1% agarose gel electrophoresis map of *Nyctalus plancyi* from Hainan

A: GD0064; B: DNA marker.

使用 MEGA4.0 软件计算该 3 条序列两两间的遗传距离, 发现海南的山蝠与 DQ435074 为 0.42%, 与 AB079820 为 0.52%, 而 DQ435074 和 AB079820 之间为 0.31%。

3 讨论

山蝠属属下的物种分类地位比较混乱, Wang (2003) 认为在中国分布有 3 个种: 褐山蝠 (*N. noctula*), 包括新疆亚种 (*N. n. meklenburzevi*) 及华北亚种 (*N. n. plancei*); 绒山蝠 (*N. velutinus*) 和 大山蝠 (*N. aviator*)。中华山蝠 (*N. plancyi*) 曾被误拼为 *N. plancei* (Simmons, 2005), 与 *N. furvus* 一起被 Corbet (1978) 和 Corbet & Hill (1992) 归入褐山蝠; 绒山蝠和褐山蝠华北亚种又被合并后定为中华山蝠 (Wang et al, 1990), 其分布区被认定为我国华东以及台湾地区 (Simmons, 2005)。而褐山蝠广泛分布于欧洲至乌拉尔山脉、高加索地区到阿尔及利亚、土耳其、以色列、阿曼、土库曼斯坦西部、哈萨克斯坦西部、乌兹别克斯坦、吉尔吉斯斯坦、塔吉克斯坦到西伯利亚西南部、喜马拉雅山脉、南部到缅甸、越南和马来西亚, 并不包括中国 (Simmons, 2005)。而 *Nyctalus furvus* 也仅见于日本 (Simmons, 2005)。因此, 国内记录的山蝠应该包括中华山蝠和 大山蝠两种。中华山蝠一般前臂长不超过 54 mm, 而 大山蝠前臂较长一般超过 54 mm (Wang et al, 1990)。海南山蝠标本前臂长为 51.0 mm, 与四川的中华山蝠的 ND1 序列相似度达到

99%, 确认为中华山蝠。

中华山蝠此次在海南岛为属和种新纪录。一些蝙蝠能够长距离迁徙, 其中, 寻求季节变化后的避难所以满足其对食物、环境、温度等的需求, 是蝙蝠迁徙的重要原因之一 (Amengual et al, 2007)。普通长翼蝠 (*Miniopterus schreibersii*) 平均迁徙距离超过 120 km (Serra-Cobo et al, 1998), 而智利鼠耳蝠甚至能迁徙 140 km 的距离, 甚至能跨越海峡到温暖的地方寻求躲避 (Amengual et al, 2007)。褐山蝠和纳氏伏翼 (*Pipistrellus nathusii*) 被认为是仅有的几种进行长距离迁徙的种 (Gerell, 1987; Amengual, 2007), 中华山蝠具有很强的飞行能力, 所以我们推测海南岛等热带岛屿可能是这些迁徙蝙蝠种类的过冬场所。

我们将海南岛的中华山蝠与四川以及北京的相比较, 三地中华山蝠除了体重 (体重差异可能是因为不同采集季节造成的) 之外, 其他的形态差异可能与样本数和系统误差有关; 头骨方面, 海南标本眶间宽为 5.8 mm, 北京的中华山蝠为 7.3 mm, 收缩明显, 其他指标较为接近 (Chen et al, 2002)。山蝠一般栖息于老建筑如房屋中的天花板、柱梁、房檐等处的缝隙中 (Wang et al, 1990), 也见于树洞 (Luo et al, 1993), 尚未见栖息于电线杆内的报道。中华山蝠体型较大, 回声定位叫声的主频率较低 (33 kHz), 脉冲时程较长, 低频声可以探测较远的距离而能量衰减较慢 (Bogdanowicz et al, 1999)。山蝠飞行速度较快, 与其低频和长脉冲的叫声相结合, 适合远距离探测猎物或其他目标。因此, 推测山蝠适合在开阔的地区捕食和飞翔, 这与我们所发现的栖宿地周围的开阔环境相吻合。多谐波的脉冲结构也有利于收集尽可能多的环境信息, 在相对复杂的环境中提高捕食的准确度 (Neuweiler, 1989)。

Baker & Brandley (2006) 认为物种在遗传上是隔离的, 且应具有一致的序列差异水平。他们比较了翼手目 *Cyt b* 基因的遗传距离, 证明在蝙蝠中种内差异小于 5.9%, 而种群内差异小于 3.8%。尽管我们在本研究中使用的是 ND1 而非 *Cytb*, 但根据蝙蝠科蝙蝠的 ND1 与 *Cytb* 具有大致相等的进化速率 (Ruedi & Mayer, 2001), 由于 ND1 基因序列的遗传差异仅为 0.31%—0.52%, 我们可以肯定从海南采到的 1 只蝙蝠个体属于山蝠属中华山蝠, 它们还可能属于同一个种群。而较小的遗传差异也可间接反映山蝠是具有很强迁徙和扩散能力的物种。然

而, 由于本研究中仅获得 1 只海南的山蝠样本, 且使用的 ND1 序列也不足以分析种下阶元信息, 所以无法具体探测海南和大陆地区山蝠间的种群动态和基因流动情况, 对于这些问题的解决我们则寄希望于今后工作的深入开展。

参考文献:

- Amengual A, López-Roig M, Serra-Coba J. 2007. First record of seasonal over sea migration of *Miniopterus schreibersii* and *Myotis acpaccinii* between Balearic Islands (Spain) [J]. *Acta Chiropt*, **9** (1): 319-322.
- Baker RJ, Brandley RD. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept [J]. *J Mamm*, **87** (4): 643-662.
- Bogdanowicz W, Fenton MB, Daleszczyk K. 1999. The relationships between echolocation calls, morphology and diet insectivorous bats [J]. *J Zool Lond*, **247**: 381-393.
- Cao Y, Janke A, Waddell PJ, Westerman M, Takenaka O, Murata S, Okada N, Pääbo S, Hasegawa M. 1998. Conflict among individual mitochondrial proteins in resolving the phylogeny of eutherian orders [J]. *J Mol Evol*, **47**: 307-322.
- Chen W, Gao W, Fu BQ. 2002. The Mammal Fauna of Beijing [M]. Beijing: Beijing Publishing House, 81-83. [陈卫, 高武, 傅必谦. 2002. 北京兽类志. 北京: 北京出版社, 81-83.]
- Corbet GB. 1978. The Mammals of the Palaearctic Region: A Taxonomic Review [M]. London: British Museum (Natural History), 314.
- Corbet GB, Hill JE. 1991. A World List of Mammalian Species, 3rd ed. [M]. London: Oxford University Press, 243.
- Gerell R. 1987. Do Swedish Bats Migrate? [J]. *Fauna Flora*, **82**:79-83.
- Kawai K, Nikaido M, Harada M, Matsumura S, Lin LK, Wu Y, Hasegawa M, Okada N. 2002. Intra-and interfamily relationships of Vespertilionidae inferred by various molecular markers including SINE insertion data [J]. *J Mol Evol*, **55**: 284-301.
- Luo R, Xie JH, Gu YH. 1993. The Mammal Fauna of Guizhou [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Publishing House, 133-136. [罗蓉, 谢家骅, 辜永河. 1993. 贵州兽类志. 贵阳: 贵州科技出版社, 133-136.]
- Neuweiler G. 1989. Foraging ecology and audition in echolocating bats [J]. *Tree*, **4** (6): 160-166.
- Ruedi M, Mayer F. 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **21** (3): 436-448.
- Serra-Coba J, Sanz V, Martínez-Rica JP. 1998. Migratory movements of *Miniopterus schreibersii* in the north-west of Spain [J]. *Acta Theriol*, **45**: 347-352.
- Simmons NB. 2005. Order Chiroptera [A]. In: Wilson DE, Reeder DM. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference, 3rd ed. [M]. Maryland: The Johns Hopkins University Press.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, **24** (8): 1596-1599.
- Thabah A, Li G, Wang YN, Liang B, Hu KL, Zhang SY, Jones G. 2007. Diet echolocation calls, and phylogenetic affinities of the great evening bat (*Idia*; Vespertilionidae): Another carnivorous bat [J]. *J Mamm*, **88** (3): 728-735.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustalw: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties, and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Res*, **22** (22): 4673-4680.
- Wang QS, Hu XL, Jia HL. 1990. The Mammal Fauna of Anhui [M]. Hefei: Anhui Publishing House of Science and Technology, 66. [王岐山, 胡小龙, 贾华龙. 1990. 安徽兽类志. 合肥: 安徽科学技术出版社, 66.]
- Wang YX. 2003. A Complete Checklist of Mammal Species and Subspecies in China [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 52. [王应祥. 2003. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全. 北京: 中国林业出版社, 52.]
- Xu LH, Liu ZH, Liao WP, Li XH, Yu SM, Qiu JC, Zhou YY, Deng JX, Guan GX, Lu JZ, Yan K. 1983. The Birds and Mammalia of Hainan Island [M]. Beijing: Science Press. [徐龙辉, 刘振河, 廖维平, 李惠, 余斯绵, 丘金昌, 周宇垣, 邓巨燮, 关贯勋, 卢济珍, 岩崑. 1983. 海南岛的鸟兽. 北京: 科学出版社.]