

南蝠海南岛分布新纪录、回声定位信号和 ND1 分析

朱光剑 李德伟 叶建平 洪体玉 张礼标 *

(广东省昆虫研究所 广州 510260; 海南师范大学生物学系 海口 571158;
广西师范大学生命科学学院 桂林 541004)

摘要: 2007年11月于海南省保亭黎族苗族自治县毛感乡网捕到5只蝙蝠标本。形态特征及线粒体DNA *ND1* 基因序列的研究证实其为蝙蝠科南蝠属南蝠 (*Ia io*), 该物种为海南岛翼手目新纪录。本文详述了海南岛南蝠的形态与回声定位信号特征, 并与该物种已报道的数据进行了比较。

关键词: 南蝠; 新纪录; *ND1* 基因; 回声定位叫声; 海南省

中图分类号: Q959 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)05-69-07

New Record of *Ia io* in Hainan Island, its Echolocation Pulses and *ND1* Analysis

ZHU Guang-Jian LI De-Wei YE Jian-Ping HONG Ti-Yu ZHANG Li-Biao *

(Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260; Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158;
College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: Five bat individuals were collected by mist net from Maogan Town, Baoting Li and Miao Autonomous County, Hainan Province in November 2007. Morphological measurements and analysis on mitochondrial *ND1* gene suggested that it was *Ia io* (Vespertilionidae; Chiroptera). This was the first record of this species in Hainan Province. In the present study, morphological characters and echolocation call parameters were represented detailedly. Comparisons were also performed between our findings and published data about the species recorded in other areas.

Key words: *Ia io*; New record; *ND1* gene; Echolocation calls; Hainan Province

南蝠 (*Ia io*) 是南蝠属仅有的一个种, 是体型最大的蝙蝠科 (Vespertilionidae) 物种之一, 主要分布在老挝、越南、泰国、印度以及尼泊尔^[1], 国内主要分布于江苏、安徽、江西、湖南、广西、贵州、云南、四川、湖北和陕西^[2]。在食虫蝙蝠中, 回声定位信号的特征在蝙蝠的空间定位和捕食过程中起着重要的作用, 回声定位信号的差异 (如主频) 影响到空间探测的距离和能探测到的猎物大小^[3]。同时, 回声定位信号特征也是反映食虫蝙蝠潜在栖息地及捕食区的重要参数, 其种间差异影响着生态位的分化。同物种的不同个体因为地域、性别和年龄差异

等原因, 其回声定位信号也可能产生分化^[4,5]。在海南, 未见南蝠分布及其回声定位信号的相关报道。本文对分布于海南的南蝠的外部形态、头骨以及回声定位信号特征、*ND1* 序列进行了详细报道。

基金项目 中华人民共和国科学技术基础性工作专项 (No. 2006FY110500);

* 通讯作者, E-mail: zhanglibiao334@126.com;

第一作者介绍 朱光剑, 男, 硕士; 研究方向: 动物生态学; E-mail: zhugj609@hotmail.com。

收稿日期: 2008-04-09, 修回日期: 2008-06-22

1 研究方法

1.1 研究地点 海南省保亭黎族自治县毛感乡千龙洞(N18°34', E109°26')位于海拔 761 m 的半山腰,洞口高约 7 m,宽约 5 m,洞况复杂,洞内最高处达 15 m,内部有暗河,支洞繁多。千龙洞周围植被茂密,乔木和灌木丰富,乔木主要有青皮(*Vatica mangachapoi*)、细叶榕(*Ficus microcarpa*)等,周围还有多丛粉单竹(*Bambusa chungii*)林。

1.2 数据测量及声音录制 2007 年 11 月,在海南岛兽类资源考察过程中,在洞口利用雾网捕到 5 只蝙蝠,形态鉴定为蝙蝠科南蝠属的南蝠。用电子数显卡尺(清工牌,贵阳)活体测量其外部形态数据,精确到 0.1 mm;用 HF-07 型便携电子秤(深圳)称重,精确到 0.1 g。留一只受伤雌性个体制作标本,头骨测量方法参照杨奇森等^[6,7]的方法,用电子数显卡尺测量数据(精确到 0.1 mm)。标本保存于广东省昆虫研究所,编号 GD0065,其余 4 个个体在测量形态数据后当场放飞。

在栖息地内蝙蝠自然悬挂的状态下,将 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 500 kHz,16 位格式,使用 Avisoft RECORDER USG(德国)软件实时录制超声波信号。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),分析时 FFT 点数设置为 512,频率分辨率为 488 Hz,时间分辨率为 1 024 ms,重叠率为 50%。从能量谱图(power spectrum)分析主频率(dominant frequency)。每个个体的回声定位信号,分析若干稳定的脉冲,取其平均值用于统计分析。

1.3 线粒体 DNA *ND1* 基因的扩增与分析 使用 3 mm 直径的打孔器(biopsy punch)分别

采集了 QL91~QL94 号 4 只蝙蝠个体的翼膜,4°C 保存于 95%酒精中,翼膜样品编号与蝙蝠个体编号保持一致。随后的基因组 DNA 提取使用 QIAGEN 公司的基因组提取试剂盒,经 1%的琼脂糖电泳检测估计所提取 DNA 的浓度为 20 ng/μl。

扩增线粒体 DNA *ND1* 基因的引物为 L16s (5'-CCTTCGATGTTGGATCAGG-3')和 HtMet (5'-GTATGGCCCCGATAGCTF-3')^[8]。扩增反应体系为 50 μl,包括大连宝生物工程有限公司的 Premix Taq^R (Ex TaqTM Version, code: DRR003A) 25 μl, 10 μmol/L 的引物各 1 μl, 20 ng/μl 的 DNA 模板 1 μl,最后用水(dH₂O)补齐。扩增条件为:94 预变性 5 min;94 变性 30 s,55 退火 30 s,72 延伸 1 min,循环 30 次;72 终延伸 10 min。扩增反应在东胜·龙 PCR 仪(EDC-810 型)上进行。扩增产物经 1%琼脂糖电泳检测后直接送上海英骏生物公司进行纯化和双向测序,使用 ABI 3730 型自动分析仪测序。测序结果用 BioEdit 7.0.5.3 软件包拼接双向序列。

使用 MEGA 4.0^[9]内嵌的 ClustalW^[10]将获得的原始序列(一般在 1 300 bp 左右)在 GenBank 进行 nBLAST(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。之后利用 Kimura 双参数模型计算遗传距离,并将单倍型不同的序列在 GenBank 注册。

2 结果

2.1 形态描述 采集到的蝙蝠体型较大,5 个个体平均头体长(吻端至肛门)90.2 mm,平均体重达到 52.9 g (44.8~67.2 g),前臂长 74.0~78.3 mm。翼狭长,背部具深褐色体毛,毛浓密;腹部毛色较浅,为浅褐色;面颊部毛发稀疏,近裸。后足发达,其长接近胫骨一半。耳大,对折后几至吻前端;耳屏粗壮,呈肾形(图 1)。无距缘膜,尾较长。第五掌骨长小于第四掌骨长小于第三掌骨长,第三掌骨第一指骨长小于第三掌骨第二指骨长,第五掌骨第一指骨长大于第五掌骨第二指骨长(表 1)。



图 1 南蝠头部照片

Fig. 1 Photo of *Ia io*

2.2 头骨特征 头骨坚硬且狭长,眶间宽较窄,颅较高,颧部明显狭小。齿式:2 · 1 · 2 · 3/3 · 1 2 3 = 34,上颌第二门齿弱小,犬齿粗壮,第一

前臼齿退化,犬齿与大前臼齿 (P^4) 紧接,小前臼齿 (P^3) 位于犬齿与大前臼齿之内角。矢状脊前部延伸至眶间区 (图 2,表 1)。

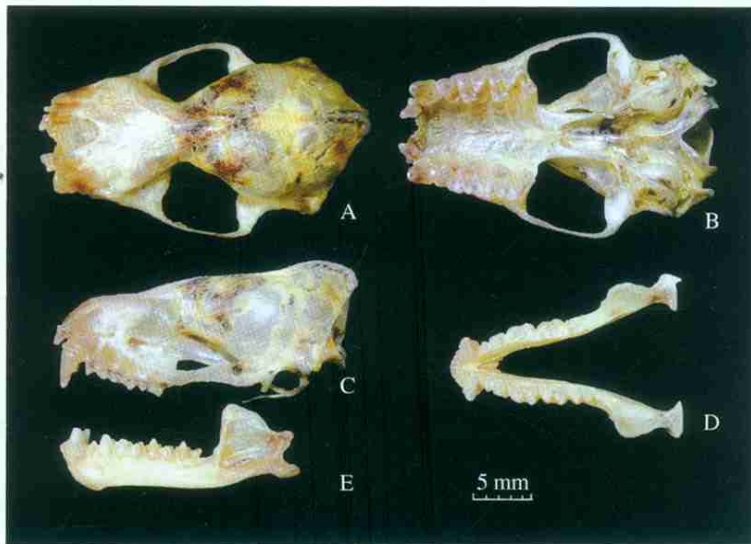


图 2 南蝠头骨照片

Fig. 2 Skull of *Ia io*

A: 上颌背面观; B: 上颌腹面观; C: 上颌侧面观 (左); D: 下颌; E: 下颌侧面观。

A: Cranium, dorsal view; B: Cranium, ventral view; C: Cranium, left side view; D: Mandible; E: Mandible, left side view.

表 1 南蝠形态测量及头骨测量 (长度 :mm, 体重 :g)
Table 1 External and skull measurements of *Ia io* (length in mm, weight in g)

项目 Items	形态测量 External measurements			项目 Items	头骨测量 Skull measurements		
	海南	贵州 ^[11]	印度 ^[12]		海南	贵州 ^[11]	印度北部 ^[13]
	Hainan (n = 5)	Guizhou (n = 20)	India (n = 15)		Hainan (n = 1)	Guizhou (n = 17)	India (n = 7)
体重 Body mass	52.9 ±8.47	47.6 ±5.03 n = 19	58.0 ±5.1	颅全长 TL	28.4	28.9 ±0.39	
前臂 Forearm	76.3 ±1.98	76.8 ±2.07	76.7 ±1.3	枕颞-犬齿 距离 CCL	26.9		25.7
头体长 Body length	90.2 ±6.91	95.1 ±4.59		颧宽 ZB	15.2	17.2 ±0.32	
耳长 Ear length	21.1 ±2.83	26.7 ±2.39		乳突外宽 MW	10.7		
耳屏长 Tragus length	8.0 ±1.35			脑颅宽 BB	6.6		
胫骨长 Tibia length	33.6 ±1.67	33.5 ±1.77 n = 17		腭桥长 PBL	13.4		
后足长 Hind-foot length	11.7 ±2.20			上齿列长 C-M ³	11.4	10.6 ±0.48	10.7
尾长 Tail length	61.9 ±11.15	70.0 ±5.53		上犬齿间宽 C ¹ -C ¹	9.36		
第三掌骨长 MC	74.4			上颌第三臼齿 间宽 M ³ -M ³	6.6		
第三掌骨第 一指骨长 ¹	26.9			下齿列长 C-M ₃	12.1		12.9
第三掌骨第 二指骨长 ²	33.2			颞长 ML	12.94		11.3
第四掌骨长	73.1			眶间距 LIW	5.6	5.8 ±0.17	5.7
第五掌骨长	66.8			颅高 HB	10.0	9.9 ±0.21	
第五掌骨第 一指骨长 ¹	13.5						
第五掌骨第 二指骨长 ²	9.7						

对于从多个个体得到的数据用平均值 ±标准差的形式给出, 对于一个个体上得到的数据给出测量值。

Value from single sample given directly, got from more than one sample were presented by Mean ±SD. TL = Total length, CCL = Condylar canine length, ZB = Zygomatic breadth, BB = Breadth of braincase, PBL = Palatal bridge length, C-M³ = Length of upper tooth row, C-C = Width between cingula of canines, M³-M³ = Distance between M³, C-M₃ = Length of lower tooth row, ML = Median palatal length, LIW = Least interorbital width, HB = Height of the braincase.

2.3 回声定位信号 南蝠的回声定位信号属于下扫的调频信号 (frequency modulated), 在自然悬挂的状态下, 大部分脉冲由 3 个谐波组成, 能量最大处的频率出现在 (28.4 ±0.8) kHz, 且能量多集中在第一谐波上。脉冲持续时间 (5.6 ±0.8) ms, 脉冲间隔 (53.7 ±17.9) ms (表 2, 图 3)。

2.4 序列分析 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳, 观察到每一泳道 1 300 bp 左右的位置上有明亮的单一条带 (图 4)。测序后的原始序列通过 BLAST 分析, 去除两端的非 *ND1* 基因片段后, 获得完整的 *ND1* 序列 (957 bp); 对照序列峰值图, QL93 的正向测序部分出现重峰现象而实行单向测序, 其余 3 条序列均对应很明显的单峰。

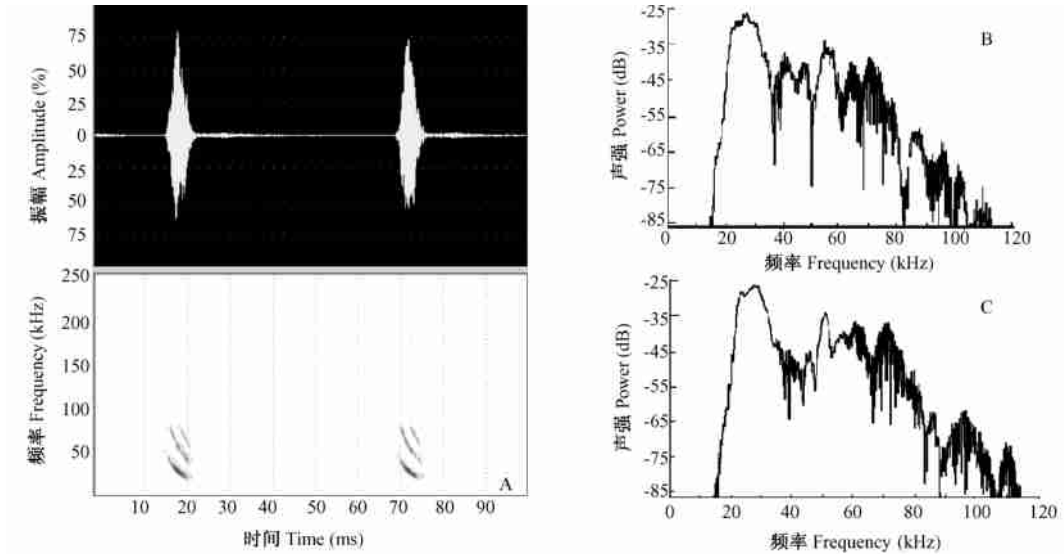


图 3 海南岛南蝠回声定位信号

Fig. 3 Echolocation call of *Ia io* in Hainan Island

A: 语谱图; B: 第一脉冲能量谱图; C: 第二脉冲能量谱图。

A: Spectrogram; B: Power spectrum of first pulse; C: Power spectrum of second pulse.

表 2 海南、贵州和印度北部南蝠回声定位信号参数 (Mean ±SD)

Table 2 Echolocation call parameters of *Ia io* in Hainan, Guizhou, and North India

项目 Items	海南 Hainan (n=5)	贵州 ^[14] Guizhou (n=4)	印度北部 ^[12] North India (n=4)
主频 (kHz) Frequency of most energy	28.4 ±0.8	29.7 ±2.3	27.6 ±1.5
脉冲持续时间 (ms) Duration	5.6 ±0.8	3.7 ±2.2	2.4 ±0.5
脉冲间隔 (ms) Pulse interval	53.7 ±17.9	65 ±20.5	42.2 ±34.8
起始频率 (kHz) Start frequency	47.0 ±4.3	34.9 ±5.9	49.0 ±5.4
结束频率 (kHz) End frequency	15.4 ±2.1	18.3 ±2.1	21.9 ±1.8

海南岛南蝠录音为自然悬挂状态, 贵州和印度南蝠为飞行状态; n 代表样本数。

Echolocation calls by *Ia io* was given in a roosting position in Hainan Province, whereas echolocation call was given in flying position in Guizhou and India; n: sample size.

经过序列多重比对后, 发现 QL92 的 *ND1* 基因序列与印度南蝠的^[12] 完全相同, 属于一个单倍型, 而其余 3 条序列 (QL91, QL93, QL94) 则同属于另一个单倍型。两种单倍型间的遗传



图 4 4 只南蝠 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 1% agarose gel electrophoresis map of four *Ia io* from Hainan

A: QL91; B: QL92; C: DL2000 DNA 分子量标准;
D: QL93; E: QL94
A: QL91; B: QL92; C: DL2000 DNA marker;
D: QL93; E: QL94.

距离仅为 0.42%, 有 4 个碱基位点发生了转换; 但这些转换均发生在密码子的第三位点, 没有引起氨基酸的变化。

3 讨论

南蝠是蝙蝠科体型最大的物种之一, 平均体重超过 50 g, 中国为该物种的主要分布区^[11]。对于南蝠属的分类地位存在过争议, Miller 认为南蝠属与拟伏翼属 (*Scotozous*) 亲缘

关系接近^[15], Ellerman 认为南蝠属是伏翼属 (*Pipistrellus*) 的一个亚属^[16], Menu 认为南蝠属与棕蝠属 (*Eptesicus*) 为同属异名^[17], 最近的研究证实南蝠属的亲缘关系更接近棕蝠属而非伏翼属, 与斑蝠属 (*Scotomanes*) 为同一进化枝^[12]。

将海南岛初次发现的南蝠形态、头骨数据与贵州以及印度的数据对比发现, 海南南蝠的体型在三地中最小。前臂长稍小于其他两地, 海南平均为 76.3 mm, 贵州和印度分别为 76.8 mm 和 76.7 mm; 头骨测量数据也表明, 海南南蝠的头骨更狭小, 颅全长 28.4 mm (海南) < 28.9 mm (贵州), 颧宽 15.2 mm (海南) < 17.2 mm (贵州), 眶间宽 5.6 mm (海南) < 5.8 mm (贵州) (表 1)。除此之外, 目前该物种国外分布于尼泊尔、老挝、印度东北部、泰国以及越南北部地区^[13], 海南南部地区为该物种分布的最南缘。

对比海南南蝠与其他两地南蝠的回声定位信号后发现, 海南南蝠的回声定位信号主频率介于印度与贵州两地之间, 脉冲持续时间最长, 明显大于其他两地的测量数据, 频宽也较其他两地南蝠为宽 (表 2)。小蝙蝠类群的回声定位信号结构与很多条件相关, 比如体型大小影响回声定位信号的主频^[3], 不同的捕食区内发射的回声定位信号也不尽相同, 在不同的状态下, 蝙蝠回声定位信号特征存在较大差异^[18]。南蝠翼载 (wing-loading) 较高, 翼纵横比 (aspect ratio) 较低, 适合快速飞行但灵活性较差, 适宜在开阔地捕食^[12]。南蝠的声波频率较低, 且能量集中在基波, 也正好适应在开阔地捕食, 这类蝙蝠需要较长波长的声波以探测较远范围内的潜在猎物^[3]。分布在中国贵州以及印度的南蝠都被报道取食小型鸟类^[12, 19], 所以在飞行捕食过程中需要不断调整飞行方向和确定猎物方位, 因此多谐波的特征有助于尽可能快且多地收集环境中的信息, 保证准确感知环境中的细微变化^[14]。我们此次发现南蝠栖息的山洞内部较开阔, 洞口高达 7 m, 对于体型较大且具备快速飞行能力的南蝠来说, 其飞行灵敏度较低,

所以选择宽敞的栖息场所对其有效活动非常有利。

通过分析线粒体 DNA *NDI* 基因序列, 从分子方面证实了从海南采到的这 5 只蝙蝠个体均为南蝠, 并与已知的印度的南蝠^[12] 具有很高的遗传相似度, 特别是两地具有相同单倍型个体, 从侧面支持了南蝠具有很强的迁徙或扩散能力。Baker 等^[20] 通过计算蝙蝠的 *Cyt b* 基因遗传距离, 认为蝙蝠中遗传距离小于 5.9% 的可能属于同一个物种, 而 0.2% ~ 3.8% 则可能属于同一种群。本研究使用的 *NDI* 基因与 *Cyt b* 基因具有大致相等的进化速率^[21], 因此, 根据海南与印度两地南蝠之间的遗传距离为 0.42%, 可以认为两地的南蝠应属于同一种群, 甚至印度次大陆至中国内陆以及东南亚等地的南蝠也很可能属于同一种群; 当然, 我们也无法排除它们分属不同种群的可能性, 只是由于本研究中使用的 *NDI* 基因不足以细分种下阶元, 加之发现的个体稀少, 无法进一步检验以上推测, 需要今后进一步研究。

致谢 衷心感谢中国科学院动物研究所张劲硕和韩乃坚先生对文章草稿提出的宝贵修改意见, 感谢海南师范大学朱斌良硕士研究生在野外工作过程中给予的热情帮助。

参 考 文 献

- [1] Wilson D E, Reeder D M. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Third edition. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005, 317.
- [2] 王应祥. 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, 2003, 49.
- [3] Bogdanowicz W, Fenton M B, Daleszczyk K. The relationships between echolocation calls, morphology and diet in insectivorous bats. *Journal of Zoology (London)*, 1999, **247**: 381 ~ 393.
- [4] Norberg U M, Rayner J M V. Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 1998, **316**: 335 ~ 427.
- [5] Schnitzler H U, Moss C F, Denzinger A. From spatial

- orientation to food acquisition in echolocating bats. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, **18**: 386 ~ 394.
- [6] 杨奇森, 夏霖, 马勇等. 兽类头骨测量标准 : 基本量度. *动物学杂志*, 2005, **40**(3) : 50 ~ 56.
- [7] 杨奇森, 夏霖, 冯祚建等. 兽类头骨测量标准 : 食虫目、翼手目. *动物学杂志*, 2007, **42**(2) : 56 ~ 62.
- [8] Cao Y, Janke A, Waddell P J, *et al.* Conflict among individual mitochondrial proteins in resolving the phylogeny of eutherian orders. *Journal of Molecular Evolution*, 1998, **47**: 307 ~ 322.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8) : 1 596 ~ 1 599.
- [10] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. Clustalw: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, **22**(22) : 4 673 ~ 4 680.
- [11] 罗蓉, 谢家骅, 辜永河等. 贵州兽类志. 贵阳: 贵州科技出版社, 1993, 133 ~ 136.
- [12] Thabah A, Li G, Wang Y N, *et al.* Diet, Echolocation calls, and phylogenetic affinities of the great evening bat (*Ia io*: Vespertilionidae): another carnivorous bat. *Journal of Mammalogy*, 2007, **88**(3) : 728 ~ 735.
- [13] Bates P J J, Harrison D L. Bats of the Indian Subcontinent. England: Harrison Zoological Museum Publication, 1997, 160 ~ 162.
- [14] 冯江, 李振新, 周江等. 南蝠回声定位叫声的分析. *动物学研究*, 2001, **22**(3) : 250 ~ 252.
- [15] Miller G S J R. The families and genera of bats. *Bulletin of the United States National Museum*, 1907, **57**: 1 ~ 282.
- [16] Ellerman J R, Morrison-Scott T C S. Checklist of Palaearctic and Indian Mammals 1758 to 1946. London, United Kingdom: British Museum (Natural History), 1951, 173.
- [17] Menu H. Morphotypes dentaires actuels et fossils des Chiroptères Vespertilionine's: implications systématiques et phylogéniques. *Palaeoventebrata*, 1987, **17**: 77 ~ 150.
- [18] Britton A R, Jones G. Echolocation behaviour and prey-capture success in foraging bats: laboratory and field experiments on *Myotis daubentoni*. *The Journal of Experimental Biology*, 1999, **202**: 1 793 ~ 1 801.
- [19] 韩宝银, 谷晓明, 梁冰等. 南蝠对鸟的捕食及其对昆虫的选择. *动物学研究*, 2007, **28**(3) : 243 ~ 248.
- [20] Baker R J, Brandley R D. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy*, 2006, **87**(4) : 643 ~ 662.
- [21] Ruedi M, Mayer F. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 2001, **21**(3) : 436 ~ 448.