

海南省海口市发现白边侧足海天牛

李歆毓 崔闯 安启源 万迎朗*

海南大学热带作物学院 海口 570228

摘要: 本文介绍了一种海天牛 (*Elysia leucolegnote*) 在海南岛的新分布情况。*E. leucolegnote* 属于软体动物门囊舌目 (Sacoglossa) 海天牛超科 (Elysioidea) 海天牛属。其以某种丝状绿藻 (*Boodleopsis* sp.) 为食, 从中摄取叶绿体, 并具有在动物细胞中保持叶绿体光合活性的独特能力。这种海天牛类群在进化生物学、光合生物学和生理学研究中受到广泛关注。2020年5月, 在海南省海口市的东寨港国家级红树林自然保护区的旗调村发现这种海天牛, 通过形态对比和分子标记分析确认为 *E. leucolegnote*, 因其在国内尚无报道, 建议根据学名和外观特征命名为白边侧足海天牛。通过线粒体 *COI* 基因的序列比对, 构建了我国已知海天牛属物种的进化树。并且在2020年5月到11月间, 在白边侧足海天牛生长地跟踪观察并描述其形态特征变化和行为特征。

关键词: 光合软体动物; 海天牛属; 分布新记录种; 红树林; 白边侧足海天牛

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 04-631-05

New Record of *Elysia leucolegnote* in Haikou Hainan, China

LI Xin-Yu CUI Chuang AN Qi-Yuan WAN Ying-Lang*

College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: Here we introduce a new distribution location of *Elysia leucolegnote* in Hainan province, China. We have identified this species by its external characters and molecular approaches, recorded its behavior in its habitat location. We used the targeted PCR method to amplify the cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene. Based on the sequence of *COI*, a phylogenetic tree of the *Elysia* genus species reported in China has been constructed. This sea slug has a body length from 5 - 13 mm, the body size increases from May to November. Small herds of *E. leucolegnote* with 1 to 100 individuals can be easily found in the puddles of the mangrove swamp at low tide or in the crab holes for shading when these were exposed to air (Fig. 1); The external characters of *E. leucolegnote* are identical to the original reports, the adult sea slug is green in color with white-edged parapodia and white spots (Fig. 2); The sequence of *COI* gene of the sea slugs collected in Hainan conformed this species is *E. leucolegnote*. We uploaded the sequence of cytochrome oxidase subunit I (*COI*) of mitochondrial DNA (GenBank accession number MT933184). And in phylogenetic tree

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 2019RCI55) ;

* 通讯作者, E-mail: ylwan@hainanu.edu.cn;

第一作者介绍 李歆毓, 女, 博士; 研究方向: 植物遗传育种; E-mail: xinyul@163.com。

收稿日期: 2020-11-16, 修回日期: 2021-03-14 DOI: 10.13859/j.cjz.202104016

(neighbor-joining, NJ) 100% degree of confidence of branch shows our sea slugs were *E. leucolegnote* (Fig. 3). We suggest that *E. leucolegnote* may be potentially used as a new model system for studying chloroplast endocytosis and endosymbiosis. Therefore, this is also a unique system that may be employed in gene expression and regulation in chloroplasts. Furthermore, this model system may also be utilized in research studies on animal cell immunity.

Key words: Photosynthetic sea slug; *Elysia* genus; New record; Mangrove; *Elysia leucolegnote*

光合作用被认为是地球上最为重要的生物化学反应, 为整个生物圈提供了几乎所有的生物能和有机质。光合作用能在光合细菌、藻类和植物中进行。1971 年, 美国科学家 Lynn Margulis 正式提出内共生理论 (Endosymbiotic Theory), 认为植物中的叶绿体源于独立生存的蓝细菌 (cyanobacteria), 被真核细胞吞噬以后经过漫长的演化历程, 成为植物细胞中的半自主细胞器——叶绿体。因此, 了解叶绿体如何与其他真核细胞共生, 对于了解植物的起源、光合作用的调控方式等基础生物学理论都具有非常重要的意义。

海天牛属软体动物为研究这一理论提供了独特材料, 因它们是目前发现仅有的能在复杂多细胞动物细胞中保持叶绿体活性的模式生物。其中, 最早发现且研究最为深入的是绿叶海天牛 (*Elysia chlorotica*), 该种生物主要分布在从美国佛罗里达州到加拿大的北美洲东海岸 (Pierce et al. 2012)。欧洲的科研工作者则常利用主要分布在地中海沿岸, 直到英格兰地区的 *E. timida* 和 *E. viridis* 等作为模式生物进行相关基础研究 (Cruz et al. 2020)。在亚洲和太平洋地区, 同样分布有光合能力的 *E. leucolegnote* (Sreeraj et al. 2012)。*E. leucolegnote* 首次由 Jensen (1990) 在我国香港红树林发现并定种, 在菲律宾红树林与印度尼西亚都有广泛分布 (Sanchez-Escalona 2019, Assuyuti et al. 2020)。然而这种海天牛在我国海南尚未见报道, 在中国软体动物图谱及相关动物志中 (齐钟彦 1986, 林光宇 1997, 王瑁 2013, 李琪 2019) 均没有记载。

1 材料与方法

1.1 材料采集和行为观察

2020 年 5 月 6 日, 在海南省海口市旗调村 (110°38'26" E, 19°56'31" N) 的红树林潮间带中采集到海天牛群体, 并每隔 2 个月在同一地点持续对其行为进行观察。查阅网站 <http://www.seaslugforum.net/find/elysleuc> 通过外形与习性鉴定该物种。

1.2 分子系统学分析

使用软体动物基因组 DNA 提取试剂盒 (Mollusc DNA Kit, OMEGA) 提取所采集海天牛总 DNA, 并利用了 Folmer (1994) 报道的线粒体 *CO I* 基因引物扩增其序列, 扩增产物经过华大基因 (深圳) 有限公司测序, 所得产物经核查上传到美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) GenBank。

为了解 *E. leucolegnote* 在我国所分布的海天牛中的地位, 根据这些序列构建了进化树, 明确了 *E. leucolegnote* 的亲缘关系。海天牛属在我国分布有 8 种 (尤仲杰等 2007), 其中 5 种海天牛的 *CO I* 基因序列已在 NCBI 数据库中有记录, 从中下载中国已报道过的海天牛属 5 种和 *E. leucolegnote* 的 *COI* 序列, 用 PhyML v. 3.0 (Guindon et al. 2010) 及 MrBayes v. 3.2 (Ronquist et al. 2012) 基于邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 执行 10 000 次自举重抽样, 所获自展值等于或大于 0.95 的作为强支持率。用 MEGA7 (Kumar et al. 2016) 中未修正距离模型计算物种间的遗传距离。

2 结果

2.1 形态特征描述

旗调村采集的海天牛经观察与 *E. leucolegnote* 形态和习性一致, 根据其外部形态特征和学名意义, 我们建议中文名称为“白边侧足海天牛”。白边侧足海天牛主要以少于 100 只的小群分布在退潮后形成的小水洼中 (图 1)。在其发现地进行持续观察发现, 5 月时, 白边侧足海天牛个体长度为 5~8 mm, 个体间身体颜色差别较大, 呈黄绿色到绿色。7 月以后, 白边侧足海天牛个体均呈现深绿色, 未再发现有黄绿色个体。10 月以后, 个体均呈现墨绿色, 且长度约 8~12 mm, 是一种较大型的海天牛 (图 1)。

经比对, 该物种具有与 *Elysia leucolegnote* 完全相同的外部特征 (图 2), 即整个体表呈现黄绿色到深绿色, 体表平滑。头部略呈倒三角形, 中部两侧突出, 有一倒置等腰三角形的白色斑块。两条嗅角细长, 位于头前侧, 底端略呈绿色, 前段透明。嗅角基部有一对深色眼点。侧足叶发达, 张开后虫体呈椭圆形, 侧足缘有明显白边环绕, 身体中部和后端 1/5 处两侧对

称分布有 1 对白色斑块。从上方观察其背部, 可见头部下方有突起的卵圆形围心囊。围心囊右前处有泄殖孔, 显微镜下可见, 围心囊后端延伸出两条对称分布的背血管, 每条背血管产生数条分支。从腹部方向观察, 可见头部中部有横贯左右的口器。身体与侧足均为绿色, 绿色的消化管之间有橙色色斑分布 (图 2)。

2.2 分子系统关系与遗传距离

所采集海天牛扩增获得 *COI* 基因, 经测序所获得的序列上传 NCBI 数据库 (序列号 MT933184), 并在 NCBI 进行 BLAST 比对, 序列与 Krug 等 (2015) 上传的 *E. leucolegnote* 的 *COI* 基因序列 (序列号 KM086381) 一致, 进一步确定其物种。中国分布的海天牛属 8 种中, 仅有 5 种有 *COI* 基因序列信息, 根据这些序列构建了进化树, 分析白边侧足海天牛的系统地位 (图 3)。本研究所采集的白边侧足海天牛 MT933184 与 KM086381 序列处在同一支, 且支持率为 100。系统进化结果支持本研究采集物种为 *E. leucolegnote*。

2.3 行为观察

本次发现的白边侧足海天牛栖息地位于海南省东寨港红树林自然保护区内。白边侧足海

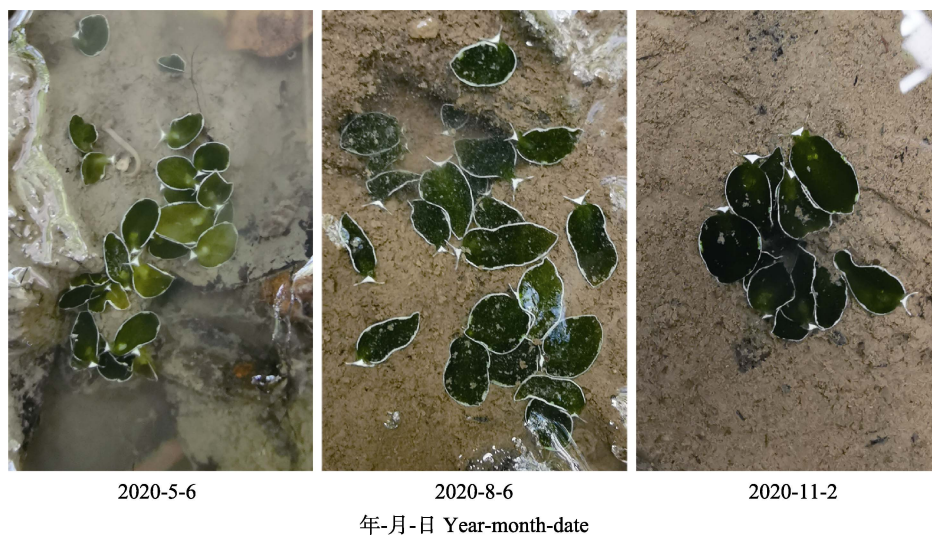


图 1 5 至 11 月白边侧足海天牛形态对比

Fig. 1 Comparison of morphology of *Elysia leucolegnote* from May to November

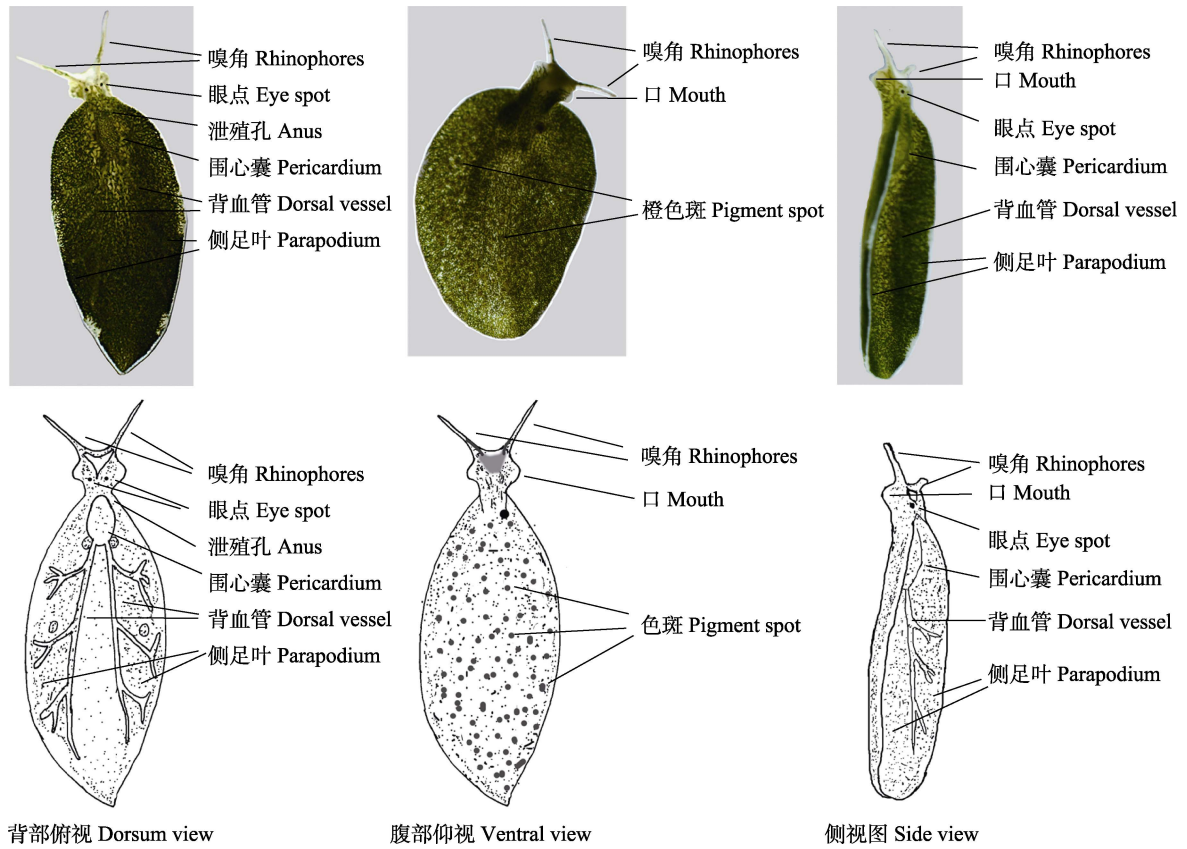


图 2 白边侧足海天牛外部特征

Fig. 2 External features of *Elysia leucolegnote*

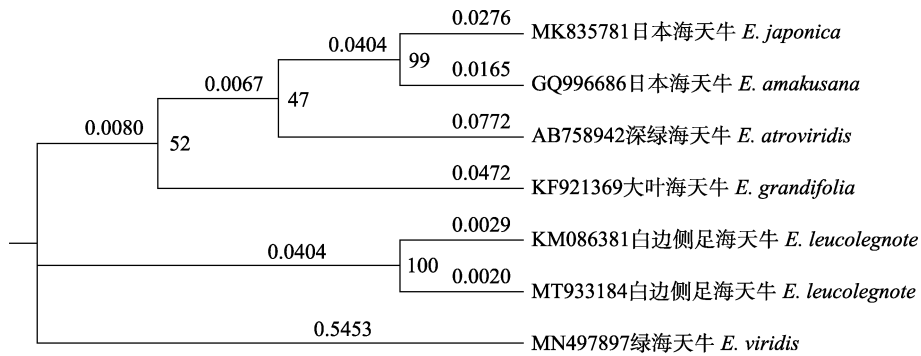


图 3 基于 CO I 序列构建的中国分布海天牛属部分物种的系统发育关系

Fig. 3 Phylogenetic relationships that were reconstructed using COI sequences from *Elysia* genus

物种名前的序号为相应个体 CO I 基因序列在 NCBI 数据库内的序列号；MT933184 为本研究所采集的海天牛个体。节点处的数值分别为邻接法构建的系统发育关系的支持率。支上数据是进化分支长度，代表进化支出的遗传距离。

The number before the species name is the number of the COI gene sequence in NCBI database. MT933184 indicate *E. leucolegnote* collected in Hainan. The value at nodes is respectively the support rates of phylogenetic relationships constructed by the neighbor-joining method. The value upon branch is branch length, which represents the genetic distance of the clade.

海天牛为一种潮间带底栖软体动物, 在退潮后的水洼中容易发现。此处年均水温为 24.8 °C, 因采集地有河流注入, 在不同水洼中测量盐度为 10‰~38‰。海天牛在红树林潮间带的行为随着涨潮落潮有所不同。在高潮期, 因红树林中水体混浊, 无法观察到海天牛的行为。在潮水较高, 但泥泞表面尚未露出时, 海天牛可通过侧足叶波动产生浮力进行较远距离运动和迁徙。在潮水降低时, 它们会在泥泞表面缓慢爬动并以小群的形式聚集在树荫下水洼中。在水洼接近干涸时, 海天牛可能躲入螃蟹洞或缓慢钻入泥沙以避免直接暴露在烈日下。

致谢 感谢海南省海口市海洋监察支队王裕旭先生提供线索并为采集标本提供帮助。

参 考 文 献

- Assuyuti Y M, Wardiatno Y. 2020. New distribution record of *Elysia leucolegnote* (Jensen, 1990) (Sacoglossa Plakobranchidae) in mangrove ecosystem of Biak Numfor, Papua-Indonesia. Biodiversity Journal, 11(1): 259–262.
- Cruz S, LeKieffre C, Cartaxana P, et al. 2020. Functional kleptoplasts intermediate incorporation of carbon and nitrogen in cells of the Sacoglossa sea slug *Elysia viridis*. Scientific Reports, 10(1): 10548.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5): 294–299.
- Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology, 59(3): 307–321.
- Jensen K R. 1990. Three new species of Ascoglossa (Mollusca, Opisthobranchia) from Hong Kong, and a description of the internal anatomy of *Costasiella pallida* Jensen, 1985 // Morton B. The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China II. Proceedings of the Second International Marine Biological Workshop: The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China, Hong Kong, 2–24 April 1986. Hong Kong: Hong Kong University Press, 419–432.
- Krug P J, Vendetti J E, Ellingson R A, et al. 2015. Species selection favors dispersive life histories in sea slugs, but higher per-offspring investment drives shifts to short-lived larvae. Systematic Biology, 64(6): 10–46.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870–1874.
- Margulis L. 1971. Origin of eukaryotic cells. Evolution, 25(4): 737.
- Pierce S K, Curtis N E. 2012. Cell biology of the chloroplast symbiosis in sacoglossan sea slugs. International Review of Cell and Molecular Biology, 293: 123–148.
- Ronquist F, Teslenko M, Mark P V D, et al. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology, 61(3): 539–542.
- Sanchez-Escalona K. 2019. *Elysia leucolegnote* (Opisthobranchia: Sacoglossa) Jensen 1990, a new record for the Verde Island Passage, Philippines. The Palawan Scientist, 11: 42–48.
- Sreeraj C R, Sivaperuman C, Raghunathan C. 2012. Report on ten newly recorded Opisthobranchs (Opisthobranchia, Gastropoda) from Andaman and Nicobar Islands, India. International Journal of Oceanography and Marine Ecological System, 1(2): 50–59.
- 李琪. 2019. 中国近海软体动物图志. 北京: 科学出版社, 236–237.
- 林光宇. 1997. 中国动物志: 软体动物门 腹足纲 后鳃亚纲 头楯目. 北京: 科学出版社, 35–42.
- 齐钟彦. 1986. 中国动物图谱: 软体动物 第3册. 北京: 科学出版社, 55–57.
- 王瑁. 2013. 海南东寨港红树林软体动物. 厦门: 厦门大学出版社, 10–20.
- 尤仲杰, 林光宇. 2007. 中国近海海天牛科(后鳃类)的研究. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 26(4): 363–370.