

海南省首次发现光合软体动物绒毛海天牛

章可兰 李歆毓 余冬 万迎朗*

海南大学热带作物学院 海口 570228

摘要: 本文首次报道了光合软体动物 *Elysia tomentosa* K. R. Jensen, 1997 在我国海南省的分布情况。2021 年 9 月, 本课题组在海南省文昌市云龙湾采集到该物种, 通过线粒体基因组核糖体 16S rRNA 以及组蛋白 H3 基因 (*H3*) 位点部分 DNA 序列比对, 确定该物种为 *Elysia tomentosa*。参考该物种学名并根据其外部形态特征, 建议该物种中文学名为“绒毛海天牛”。通过聚合酶链式反应 (PCR) 鉴定其生活环境中的藻类, 确定了该物种共生叶绿体的来源为总状蕨藻 (*Caulerpa racemose*); 利用叶绿素荧光诱导曲线, 检测了绒毛海天牛的光合荧光特征。这是本课题组在海南省沿海地区发现分布的又一种光合软体动物, 进一步丰富了对海南岛沿岸海天牛分布的认知, 也为研究光合作用的进化与内共生机理提供新的研究材料。

关键词: 海天牛属; 系统发育树; 分布新记录种; 绒毛海天牛

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 05-775-07

New Record of a Photosynthetic Sea Slug *Elysia tomentosa* in Wenchang, Hainan Province, China

ZHANG Ke-Lan LI Xin-Yu YU Dong WAN Ying-Lang*

College of Tropical Crops Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: This paper introduces the distribution of *Elysia tomentosa* K. R. Jensen, 1997 in Hainan Island for the first time. *E. tomentosa* belongs to Family Plakobranchidae, Superorder Sacoglossa, Class Gastropoda in the Phylum Mollusca. In September 2021, the sea slug was collected in Yunlong Bay, Wenchang city, Hainan Province. We designed the primers of 16S ribosomal RNA gene sequence, histone H3 gene (*H3*) sequence and *tufA* gene to identify what species it is and the algae in its living environment by polymerase chain reaction (PCR). We detected the photosynthetic fluorescence characteristics of *E. tomentosa* by chlorophyll fluorescence induction curve. A series of fluorescence parameters F_v/F_m , Y(II), Y(NO) and NPQ measured by the chlorophyll fluorescence measuring instrument Dual PAM-100 (Walz, Germany) were calculated by t-test with three samples and three repeat. Through sequence alignment of 16S rRNA and the relationship between photosynthetic characteristics and evolution, a phylogenetic tree was constructed by maximum likelihood (ML) method. The comparison of 16S rRNA sequence and *H3* gene sequence identified this species as *E. tomentosa*

* 通讯作者, E-mail: ylwan@hainanu.edu.cn;

第一作者简介 章可兰, 女, 学士; 研究方向: 农学; E-mail: SX_502371@163.com。

收稿日期: 2022-01-13, 修回日期: 2022-05-31 DOI: 10.13859/j.cjz.202205014

by molecular method. The source of the symbiotic chloroplasts of this species was *Caulerpa racemose* (Fig. 3). The photosynthetic activity of *E. tomentosa* could maintain for about one month and the photosynthetic capacity of *E. tomentosa* continue to decrease (Fig. 2). The evolutionary tree showed that the evolutionary status of *E. tomentosa* in the some species (Fig. 4). This is another species of photosynthetic mollusk discovered by our research group in Hainan Province, which further enrich our understanding of its distribution in China and also provides new materials for studying the evolution of photosynthesis and endosymbiosis mechanism.

Key words: Photosynthetic sea slug; Phylogenetic tree; New record; *Elysia tomentosa*

海天牛属(*Elysia*)是囊舌类海洋软体动物, 该属部分物种可以吸食绿色藻类的叶绿体并在细胞中保持叶绿体进行光合作用(Hinde 1980, Händeler et al. 2009, Rumpho et al. 2011)。此类可以进行光合作用的软体动物被称为光合软体动物, 被吞噬后依旧能发挥功能的叶绿体被称为盗质体(kleptoplasty)(Clark et al. 1990)。光合软体动物为研究叶绿体内共生机制提供了不可多得的材料, 也为了解细胞免疫、自噬等机制提供了特别的研究角度(Melo et al. 2020)。

对光合软体动物光合机制的研究, 长期以来都是国际基础生物学研究热点之一(Pierce et al 2012)。而我国学者囿于本土光合软体动物资源不清, 长期缺席于该类动物的研究。目前我国记载有海天牛科软体动物2属10种, 其中, 海天牛属9种, 多叶鳃属(*Placobranchus*)1种(尤仲杰等 2007, 李歆毓等 2020)。本课题组于2020年在海南省东寨港红树林国家级自然保护区发现的白边侧足海天牛(*E. leucolegnota*), 是继香港地区后在海南发现的分布新记录。在这之后, 本课题组于2021年7月在海南省文昌县龙楼镇沿岸珊瑚礁区域调研时发现了又一光合软体动物物种在海南的分布。

在本研究中, 将报道该种光合软体动物的分布情况和行为特征, 并通过形态对比和分子鉴定确定该种海天牛的种类。同时通过测定其叶绿素荧光参数确定其光合作用活性, 并通过基因序列分析明确其在我国已知分布的海天牛科物种中的系统演化地位。

1 材料与方法

1.1 材料采集和行为观察

2021年9月9日, 在海南省文昌市云龙湾附近海岸(110°56'52" E, 19°35'54" N)的珊瑚礁区域采集到海天牛群体及其周边藻类。将海天牛培养在30 g/L海盐溶液(Tropic Marin, 德国)的水族箱中, 对海天牛的摄食行为进行观察。养殖环境温度为恒温27 °C, 光源为白色LED光源, 光合有效辐射20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照昼夜循环为12 h/12 h。观察绒毛海天牛形态特点, 查阅海蛞蝓论坛网站(<http://www.seaslugforum.net/find/elystome>), 分析该物种分类归属。

1.2 叶绿素荧光测量

将海天牛放置于无食物的水族缸中饲养, 做饥饿处理, 对它们的叶绿素荧光诱导曲线进行测量。使用叶绿素荧光仪Dual PAM-100(Walz, 德国)通过脉冲振幅调制技术(pulse-amplitude-modulation, PAM)测量海天牛个体叶绿素荧光诱导曲线。叶绿素荧光的测量参数为最大光子产量(optimal/maximal quantum yield of PSII, F_v/F_m)、实际光合效率(quantum yield of photochemical energy conversion in PSII, Y(II))、非调节能量淬灭(quantum yield of non-regulated non-photochemical energy loss in PSII, Y(NO))和非光化学淬灭(non-photochemical quenching parameter describing regulated dissipation of excess energy, NPQ)。用于海天牛光合特性测量的参数设定如下, 测

量荧光饱和光强度设置为 $100 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 测量脉冲 (actinic light source, AL, 驱动光合作用的内置光源) 设置为 $20 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 持续时间 25 min, 频率为 0.008 3 Hz。每次测量前均将海天牛置于黑暗处适应 20 min, 选取 3 只个体大小适宜的海天牛, 其余条件保持一致, 测定饥饿处理后 1 d、18 d、26 d 的叶绿素荧光参数, 分析海天牛光合状况。在时间维度上对相邻两次测出的两组叶绿素荧光参数进行 *t* 检验, 比较显著性差异。用 Origin 2019b 绘制不同时间饥饿处理下海天牛叶绿素荧光参数曲线。

1.3 分子系统学分析

使用 CTAB 法提取所采集海天牛及其食物藻总 DNA, 考虑到基因序列的保守性, 利用已报道的 16S rRNA 基因序列 (序列号 EU1408853.1) 和 *H3* 基因序列 (序列号 KC597185.1), 以及海天牛共生叶绿体基因组 *tufA* 基因序列 (序列号 GU592622.1) 设计引物 (表 1)。PCR 产物经纯化后经过铂尚生物技术 (上海) 有限公司测序, 所得序列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。海天牛属在我国分布物种中 5 种的 16S rRNA 序列已在 NCBI 数据库中有记录, 从中下载中国已报道过的 5 种海天牛属物种和在我国未报道过的 9 种 (包括 *E. tomentosa*) 的 16S rRNA 序列。根据这 14 种海天牛的 16S rRNA 序列以及测序结果用 MEGA-X 基于最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建系统发育树, 执行 1 000 次自举重抽

样, 计算物种间的遗传距离, 明确 *E. tomentosa* 的亲缘关系。查阅相关资料确定上述海天牛与所食藻类的对应关系, 同时结合叶绿体在体内保留的时间, 以及构建的系统发育树, 分析海天牛物种、海天牛保留叶绿素能力与所食藻类三者之间的关系。

2 结果

2.1 形态特征与习性

在海南省文昌市云龙湾附近海岸采集的海天牛, 经观察与 *E. tomentosa* 形态和习性一致, 生活在近岸海底珊瑚礁中。海天牛整体呈橄榄绿, 身体上覆盖着长短不一的白色绒毛, 并在绒毛间分布有橙色和黑色小点, 形成融入环境的保护色 (图 1a)。该种海天牛的侧足边缘和嗅角为橙色, 且随着个体发育, 侧足边缘和嗅角颜色加深, 斑点变多。海天牛身体表面呈波浪状, 侧足边缘呈“S”形。围心囊后一条肾脊延伸直至末端, 背血管均匀分布在肾脊两侧, 体长约 40 mm。该物种具有与前人报道的 *E. tomentosa* 完全相同的外部特征 (图 1b)。

2.2 叶绿素荧光测量

将 *E. tomentosa* 进行饥饿处理, 在饥饿处理的 0~7 d 绿色保持, 18 d 后颜色变为浅绿, 26 d 只有肾脊及附近保持绿色, 其余部位呈黄白色, 30 d 死亡。通过对叶绿素荧光测量发现, 海天牛的最大光子产量 F_v/F_m 在 1~18 d 显著下降 ($P < 0.05$) 并维持下降趋势至 26 d (图 2a)。海天牛的实际光合效率 $Y(II)$ 在 1~18 d 显著下降 ($P < 0.05$) 并维持下降趋势至 26 d (图 2b)。海天牛的非调节能量淬灭 $Y(NO)$ 在 1~26 d 上升 (图 2c); 海天牛的非光化学淬灭 NPQ 在 1~26 d 先升后降 (图 2d)。

2.3 分子系统分析

对海天牛的 16S rRNA 和组蛋白 *H3* 基因进行 BLAST 比对的结果如下, *H3* 基因序列 (序列号 OK398015) 与 *E. tomentosa* 的 *H3* 基因序列 (序列号 KC597185.1) 相似度为 100% (图 3a); 16S rRNA 序列 (序列号 OK398130) 与

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers for PCR

基因名称 Gene name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
<i>H3</i>	F: TCGCAAGTCCACCGGTGGC R: ACGCTTGGCATGGATGGCAC	328
16S rRNA	F: AGCCTTAAGTTTTATTTAAGGTAAT R: ATGTAGGAAATTAAGTTCGAACAG	445
<i>tufA</i>	F: ATGGTGCTATTTAGTGTGTTTCG R: TATATCCAGGCAAAAACGAAGT	714

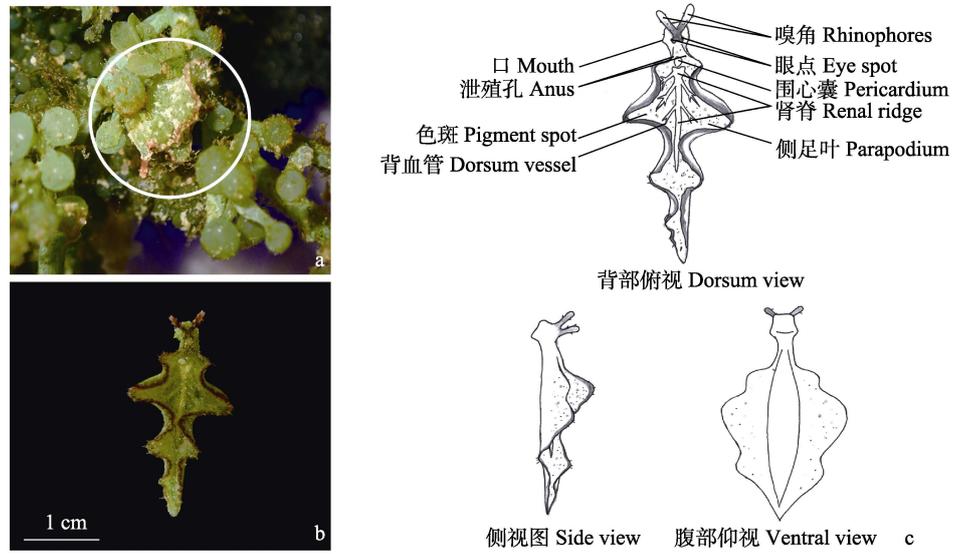


图 1 绒毛海天牛

Fig. 1 External features of *Elysia tomentosa*

a. 绒毛海天牛生存环境与所食总状蕨藻; b. 绒毛海天牛实拍; c. 绒毛海天牛结构图。
 a. *Elysia tomentosa*'s living environment and its food algae *Caulerpa racemose*; b. *E. tomentosa*; c. Structure diagram of *E. tomentosa*.

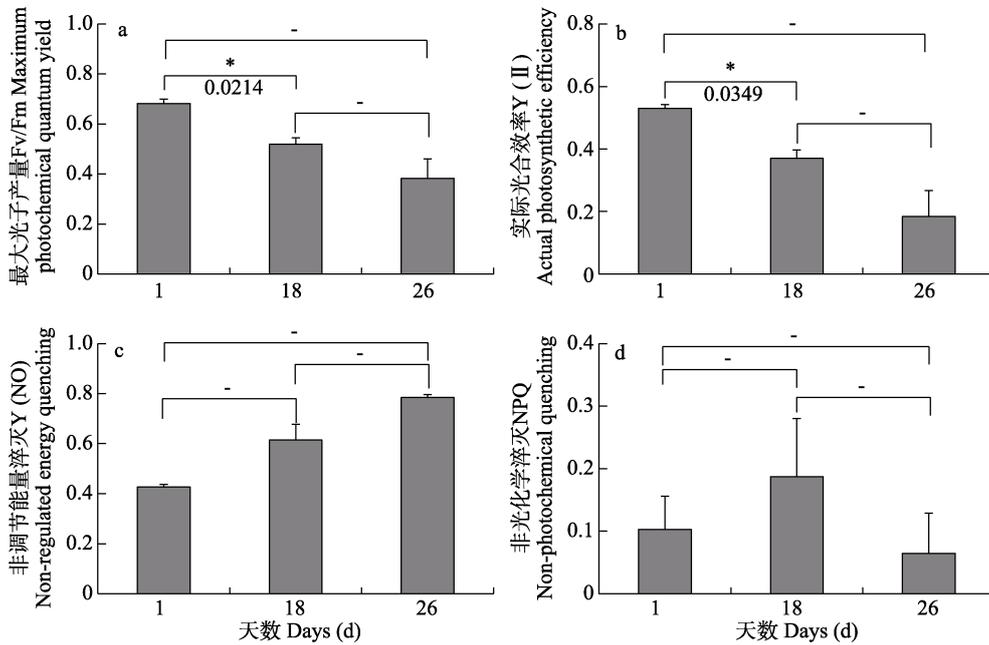


图 2 绒毛海天牛叶绿素荧光参数

Fig. 2 Chlorophyll fluorescence measurements of *Elysia tomentosa*

a. 最大光化量子产量; b. 实际光合效率; c. 非调节能量淬灭; d. 非光化学淬灭。
 Maximum photochemical quantum yield; b. Actual photosynthetic efficiency; c. Non-regulated energy quenching; d. Non-photochemical quenching.

“-”表示差异不显著 ($P > 0.05$); “*”表示差异显著 ($P < 0.05$); 数据柱连线上的数据为 P 值。

“-” indicates no significant difference ($P > 0.05$); “*” indicates significant difference ($P < 0.05$); the data on the data column line are P -values.



图 3 基因比对结果

Fig. 3 Gene comparison results

a. 绒毛海天牛 H3 基因参考序列 (上) 和测序结果 (下) 序列比较; b. 绒毛海天牛 16S rRNA 基因参考序列 (上) 和测序结果 (下) 序列比较; c. 总状蕨藻 *tufA* 基因参考序列 (上) 和测序结果 (下) 序列比较。

a. *Elysia tomentosa* H3 gene reference sequence (above) and sequencing results (below) comparison; b. *E. tomentosa* 16S rRNA reference sequence (above) and sequencing results (below) comparison; c. *Caulerpa racemose tufA* gene reference sequence (above) and sequencing result (below) comparison.

E. tomentosa 的基因序列(序列号 KM204206.1) 相似度为 99.22% (图 3b)。在 16S rRNA 测序结果的基础上, 进一步构建了海天牛属动物系统发育树(图 4)。

通过观察海天牛的摄食行为, 确认总状蕨藻 (*Caulerpa racemose*) 为 *E. tomentosa* 食物。在海天牛和食物藻中均可扩增出叶绿体 *tufA* 基因。经测序将获得的藻类叶绿体 *tufA* 基因序列上传 NCBI 数据库(序列号 OK398016), 并在 NCBI 进行 BLAST 比对, 藻类序列与总状蕨藻 *tufA* 基因序列(序列号 JN817664) 相似

度为 96.55% (图 3c)。

3 讨论

E. tomentosa 属于软体动物门囊舌目 (Sacoglossa) 海天牛超科 (Plakobranichidae) 海天牛属, 是一种分布在印度洋-大西洋一带以不同藻类为食的腹足软体动物, 被 Jensen (1997) 在澳大利亚海岸发现并首次命名, 此后 Oladi 等 (2018) 在泰国和伊朗 (波斯湾) 等地均有发现, 可见其分布之广。这种海天牛在我国尚未见报道, 在中国软体动物图谱及相



图 4 基于 16S rRNA 基因部分序列构建的海天牛属部分物种的系统发育关系

Fig. 4 Phylogenetic relationships reconstructed using 16S rRNA sequences from genus *Elysia*

红色字体代表在中国有分布的海天牛物种；圆点代表海天牛吃的不同藻类。StR 表示叶绿体功能在 1 周左右保留，LtR 表示叶绿体功能保留 1 个月以上，其余物种叶绿体保留时间不明。

The red characters represent *Elysia* which distribute in China; The dots represent the different algae that the *Elysia* eat. Short-term retention (StR) indicates that chloroplast function can retain within one month; long-term retention (LtR) indicates that chloroplast function can retain for more than one month; and the duration of chloroplast retention of other species is unknown.

关动物志中（齐钟彦 1986，林光宇 1997，王璠 2013，李琪 2019）均没有记载。同时，我们还对物种鉴定中的关键基因，即 16S rRNA 以及组蛋白 H3 基因进行了测序，并在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析，确认本次新记录物种为 *E. tomentosa*。以 16S rRNA 序列构建的系统发育树表明，该种海天牛为前人报道的 *E. tomentosa*。该系统发育树有较多支持率低于 50% 的分支，可能是选取的基因序列为种间保守序列导致同源性较高造成的。因为本物种在我国并无分布记载，我们建议根据学名词义和外观特征命名中文学名为“绒毛海天牛”。

通过测序与形态分析确定总状蕨藻为绒毛海天牛的食物。其食物的确认有利于展开内共生机制的深入研究。通过分析海天牛属动物的取食特性和与藻类中的叶绿体共生机制，海天牛可以被分为三类（Händeler et al. 2009）：第一类以藻类为食，其细胞不提供叶绿体内共生的生存环境，不能再进行光合作用；第二类能

为来自于食物中的叶绿体提供短期的内共生环境，叶绿体能在一周左右保留光合能力，被称为短期光合能力（short-term retention, StR）海天牛；第三类为长期光合能力（long-term retention, LtR）海天牛，其摄入的叶绿体能在细胞内保持至少一个月的光合能力。第一类的代表性物种有 *E. tuca*、*E. zuleicae*、*E. amakusana*、*E. subornata* 等，第二类有 *E. trisinuata*、*E. asbecki*、*E. nigrocapitata*、*E. viridis*、*E. pusilla* 等，第三类有 *E. leucolegnote*、*E. chlorotica*、*E. crispata*、*E. timida* 等（Christa et al. 2015）。绒毛海天牛仅能在 30 d 以内保持光合作用能力。 F_v/F_m 、Y(II)、Y(NO)和 NPQ 分别表示最大 PS II 的光能转换效率、光化学反应消耗能量的比值、以荧光或热量的形式消散的能量和植物热耗散过剩光能为热的能力。在饥饿处理后 18 d 和 26 d 测量，其最大光子产量 F_v/F_m 与实际光合效率 Y(II) 逐渐下降，而非调节能量淬灭 Y(NO) 上升，说明叶绿素功能逐渐丧失。尽管非光化学

淬灭 NPQ 的测定存在较大误差, 显著性不明显, 但其变化趋势具有意义。NPQ 先上升后下降, 说明叶绿体转化光能的效率下降, 大部分能量以热量的形式散失。在 18 d 之后, 海天牛颜色变淡, 且 NPQ 下降, 表明此时叶绿体开始被降解, 并丧失功能。此次发现的绒毛海天牛为短期光合能力 (StR) 海天牛。

此次发现的绒毛海天牛和前期发现的白边侧足海天牛 (李歆毓等 2021) 分别源于两种不同的滨海生态系统, 绒毛海天牛生长在近岸的珊瑚礁区域, 而白边侧足海天牛分布在红树林潮间带上缘。珊瑚礁、红树林和海草床被并称为三大海洋生态系统 (宋晖等 2014), 是多种海洋生物生存的必须环境, 为了解海洋物种多样性和物种演化关系提供了不可多得的素材。新发现的这两种海天牛属生物, 为了解我国海洋物种资源与生态系统的建立提供了新的线索。

绒毛海天牛和白边侧足海天牛都是光合软体动物, 且分别是能短期 (StR) 和长期 (LtR) 保持叶绿体光合能力的物种。光合海天牛的发现为我国进行光合生物学和进化生物学研究的学者提供了本土的新型研究材料。而此次发现的绒毛海天牛, 还为我们提供了藻类叶绿体在动物细胞中内共生机制以及叶绿体维持光合能力研究的对比材料。我们相信对这两种生物的深入研究, 将对揭示叶绿体内共生机制, 动物和植物的起源和分化等, 提供更有力的证据。

参 考 文 献

- Clark B, Jensen R, Stirts M. 1990. Survey for functional kleptoplasty among West Atlantic *Ascoglossa* (= *Sacoglossa*) (Mollusca, Opisthobranchia). *The Veliger*, 33(4): 339–345.
- Christa G, Händeler K, Kück P, et al. 2015. Phylogenetic evidence for multiple independent origins of functional kleptoplasty in *Sacoglossa* (Heterobranchia, Gastropoda). *Organisms Diversity & Evolution*, 15(1): 23–36.
- Händeler K, Grzybowski P, Krug J, et al. 2009. Functional chloroplasts in metazoan cells - a unique evolutionary strategy in animal life. *Frontiers in Zoology*, 6(1): 1–18.
- Hinde R. 1980. Chloroplasts “symbiosis” in sacoglossan mollusks // Schwemmler W, Schenk A. *Proceedings of the International Colloquium on Endosymbiosis and Cell Research*. Tubingen: Walter de Gruyter, 729–736.
- Jensen R. 1997. *Sacoglossa* (Mollusca, Opisthobranchia) from the Houtman Abrolhos Islands and central Western Australia // Wells E. *The Marine Flora and Fauna of the Houtman Abrolhos Islands, Western Australia*. Perth: Western Australian Museum, 307–333.
- Melo J, Frankenbach S, Fidalgo C, et al. 2020. Identification of scavenger receptors and thrombospondin-type-1 repeat proteins potentially relevant for plastid recognition in *Sacoglossa*. *Ecology and Evolution*, 10(21): 12348–12363.
- Oladi M, Nasrolahi A, Ahmadzadeh F, et al. 2018. Molecular confirmation of the occurrence of *Elysia* cf. *tomentosa* (Mollusca: Heterobranchia) in the Persian Gulf. *Zoology in the Middle East*, 64(2): 124–130.
- Pierce K, Curtis E. 2012. The cell biology of the chloroplast symbiosis in sacoglossan sea slugs. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 293: 123–148.
- Rumpho M, Pelletreau K, Moustafa A, et al. 2011. The making of a photosynthetic animal. *Journal of Experimental Biology*, 214(2): 303–311.
- 李琪. 2019. 中国近海软体动物图志. 北京: 科学出版社, 236–237.
- 李歆毓, 崔闯, 安启源, 等. 2021. 海南省海口市发现白边侧足海天牛. *动物学杂志*, 56(4): 631–635.
- 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.
- 宋晖, 汤坤贤, 林河山, 等. 2014. 红树林、海草床和珊瑚礁三大典型海洋生态系统功能关联性研究及展望. *海洋开发与管理*, 31(10): 88–92.
- 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.