

中国海盘海牛科(腹足纲, 裸鳃目)一新记录 属和一新记录种*

张树乾^{1,2} 张素萍^{1,2}

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生物分类与系统演化实验室 青岛市海洋生物多样性与保护重点实验室 山东青岛 266071;
2. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东青岛 266071)

摘要 2021 年 3 月在大连进行潮间带生物调查时采集到 2 个裸鳃类标本, 经鉴定发现为欧氏针盘海牛 *Diaulula odonoghuei* (Steinberg, 1963), 为中国新记录属和新记录种。在研究中对其进行了活体拍照, 利用光学显微镜和扫描电子显微镜对其外部形态和内部解剖特征进行了观察。此外, 测定了这两个标本的 COI、16S rRNA 和 H3 基因序列, 将测得的基因片段与 GenBank 数据库中的针盘海牛属 *Diaulula* 的同源序列进行对比分析, 构建了针盘海牛属的系统发育树。欧氏针盘海牛在我国沿海的发现, 进一步丰富了中国海软体动物的物种多样性研究。

关键词 针盘海牛属; 欧氏针盘海牛; 新记录种; DNA 条形码

中图分类号 Q959.212+.5 **doi:** 10.11693/hyhz20221200327

针盘海牛属 *Diaulula* Bergh, 1878 隶属于腹足纲 Gastropoda、裸鳃目 Nudibranchia、盘海牛科 Discodorididae。该属种类分布广, 在太平洋、大西洋和南非海域均有分布, 多数种类生活在潮间带或浅海岩礁上, 以海绵为食(Marcus *et al.*, 1967; Valdés *et al.*, 2010), 目前仅有 2 种在深海有分布(Valdés, 2001)。自针盘海牛属建立以来, 有学者认为该属种类在生活方式和形状、身体大小、齿舌以及生殖系统结构特征等方面均与盘海牛属 *Discodoris* Bergh, 1877 种类极为相似, 因此将针盘海牛属看作后者的同物异名(Thompson, 1975; McDonald, 1983)。然而, 这一观点并未被一些学者所接受(如 Behrens, 1991)。Valdés(2001)基于形态学比较, 认为针盘海牛属种类的背部具有骨针的瘤状突起, 前列腺分为两部分, 这些特征可明显区别于盘海牛属。

欧氏针盘海牛 *Diaulula odonoghuei* (Steinberg, 1963)在北太平洋海域从韩国(Koh, 2006)、日本(Baba, 1957)、俄罗斯(Martynov *et al.*, 2015), 到北美洲西海岸的加拿大和美国(Kelly, 2013; Lindsay *et al.*, 2016)

均有分布, 栖息于潮间带或浅水区的岩礁上。迄今, 我国已记录了盘海牛科中其他 4 属 9 种(张素萍, 2008; 张素萍等, 2016), 但尚未对针盘海牛属种类进行过研究和报道。近年来, 作者对黄渤海的裸鳃类进行调查时, 采集到欧氏针盘海牛 2 个标本, 系我国新记录属及新记录种。本文中, 作者基于形态学和分子生物学对其进行了研究报道。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验所用的盘海牛标本于 2021 年 3 月 10 日采自大连市黑石礁潮间带, 共 2 个标本, 活体体长约为 40 mm。标本(酒精浸制)保存于中国科学院海洋生物标本馆, 标本号为: MBM287595 和 MBM287596。

1.2 实验方法

1.2.1 形态学研究 活体采集后, 带回实验室进行暂养。在体式显微镜下对外部形态的细微特征进行了观察, 利用数码相机对其进行了拍照, 并用卡尺对其体长进行了测量。

* 山东省自然科学基金项目, ZR2021MD072 号; 国家自然科学基金重大项目, 42090044 号。张树乾, 副研究员, E-mail: zsqtaxon@qdio.ac.cn

收稿日期: 2022-12-15, 收修改稿日期: 2023-01-18

齿舌的解剖: 沿动物的背部中线将外套膜剪开, 用探针挑出口球部, 用解剖针及镊子初步清除口球肌肉及齿舌上附着的组织后, 放入 10% NaOH 溶液, 室温浸泡 3~4 h 或 60 °C 浸泡 1~2 h, 期间振荡数次以彻底去除附带组织。

扫描电镜拍摄: 将前期准备的齿舌放在载玻片上, 展平后进行空气干燥, 将干燥后的齿舌用导电胶粘在样品台上, 放入镀膜机内喷金, 后放入扫描电镜内, 5 kV 加速电压下进行观察拍照。

1.2.2 分子生物学研究 切取 2 个标本的足部肌肉各约 30 mg, 使用 TIANGEN 海洋生物基因组 DNA 抽提试剂盒(北京, 天根生化科技)提取基因组 DNA, 并在将所提取 DNA 溶解后置于 4 °C 冰箱保存备用。

用于扩增样品线粒体 COI 基因的引物序列为 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HCO2198 (5'-TTAACTTCAGGGTGACC AAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994); 用于扩增线粒体 16S rRNA 的引物序列为 16S arL (5'-CGCCTGT TTAACAAAACAT-3', Palumbi *et al.*, 2002)和 16S R (5'-CCGRTYTGAAGCTC AGCTCACG-3', Puslednik *et al.*, 2008); 用于扩增核基因 H3 的引物序列为 HexAF (F) (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACGGC-3') 和 (5'-ATATCCTTGCCATGATGGTGAC-3') (Colgan *et*

al., 1998)。引物稀释浓度为 10 μmol/L, -20 °C 保存备用。

PCR 反应总体积为 25 μL, 其中包括 2 μL 模板 DNA, 12.5 μL Taq Mix, 引物各 0.5 μL, 双蒸水加至总体积。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30s, 45 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 10 min。在进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 ($U=5$ V/cm) 进行确认之后, 将所得 PCR 产物送至青岛擎科生物技术有限公司进行测序。

将测得的基因片段与从 GenBank 中下载的针盘海牛属 *Diaulula* 的同源序列进行分析(见表 1), 利用 MEGA X 将 COI 和 H3 基因片段翻译成氨基酸序列进行比对和人工校对, 利用 MAFFT 软件对 16S rRNA 进行聚类, 并用 Gblocks 软件去除非信息位点。随后, 将这三个基因串联成用于建立系统发育树的多基因序列, 长度为 1 423 bp, 其中包括 COI 657 bp、16S rRNA 439 bp 以及 H3 327 bp。根据 ModelFinder 计算最佳分区模型, 得到的 COI 和 16S rRNA 的最佳模型均为 HKY+F+I, H3 的最佳模型为 HKY+F, 基于贝叶斯(BI)以及最大似然法(ML)分别构建系统发育树。使用 MEGA X 计算针盘海牛属种类种内和种间的遗传距离。

表 1 本研究所用的基因序列
Tab.1 Gene sequences used in the present study

种名	采集地	标本号	基因序列号		
			COI	16S rRNA	H3
<i>Diaulula sandiegensis</i>	USA: Laguna Beach, CA	TL011	KU950056.1	KU949986.1	KU950102.1
	USA: Humbolt Bay, CA	TL023	KU950054.1	KU949984.1	KU950098.1
	USA: Cayucos, CA	TL049	KU950053.1	KU949983.1	KU950097.1
	USA: Long Beach, CA	TL268	KU950058.1	KU949989.1	KU950105.1
	USA: Cayucos, CA	TL047	KU950051.1	KU949981.1	KU950095.1
<i>Diaulula odonoghuei</i>	USA: Gig Harbor, WA	TL208	KU950021.1	KU949952.1	KU950065.1
	Japan: Oshoro, Hokkaido	TL136	KU950025.1	KU949956.1	KU950069.1
	Russia: Rudnaya Bay	TL231	KU950031.1	KU949962.1	KU950075.1
	China: Dalian	Op-21031001	OP942420	OP942422	OP961957
	China: Dalian	Op-21031002	OP942421	OP942423	OP961958
<i>Diaulula greeleyi</i>	USA	TL286	KU950017.1	KU949947.1	KU950060.1
<i>Diaulula nayarita</i>	Panama	TL176	KU950018.1	KU949948.1	KU950061.1
<i>Jorunna artsdatbankia</i>	Norway: North Sea	ZMBN125946	MW784173.1	MW784485.1	MW810590.1
<i>Jorunna tomentosa</i>	Portugal: Azores, Faial Island	CAS-IZ-175752	MW784185.1	MW784508.1	MW810604.1

注: 粗体表示本研究所获取数据

2 结果

2.1 形态学描述

欧氏针盘海牛 *Diaulula odonoghuei* (Steinberg, 1963) (图 1, 图 2)

Doris odonoghuei Steinberg, 1963: 63.

Doris echinata O'Donoghue, 1922: 149.

Doridigitata maculata O'Donoghue, 1926: 206.

Diaulula odonoghuei: Lindsay *et al.*, 2016: 4, figs. A-B, E-G.

Diaulula boreopacifica Martynov: Sanamyan & Korshunova, 2015: 68, fig. 2b.

模式标本产地 加拿大温哥华岛 (Vancouver Island)。

标本采集地 辽宁(大连黑石礁)。

观察标本 2 个标本, 黄海, 潮间带岩礁, 2021.III.10, 张树乾采。

形态描述 动物中等大小, 体长 40 mm, 呈椭圆形, 低平。外套背面密布有瘤状突起, 每个突起的周缘具 5 个直立的骨针。口触手呈指状。嗅角粗壮, 上部约有 18 个褶叶, 末端呈乳头状; 嗅角鞘低, 边缘具瘤状突起, 嗅角可完全缩入嗅角鞘内。鳃羽状, 6 叶, 3 歧分枝, 围绕肛门突起排列成圆形, 可完全缩入鳃腔内。足部宽大, 呈椭圆形, 后端可在动物伸展时突出外套后方。体色为淡黄色, 外套背部两侧具有排列不

规则、大小不等的、呈圆形的黑色斑点。

齿舌齿式为 20·0·20。中央齿缺, 侧齿呈钩状, 前 10 对侧齿逐渐变大, 随后侧齿逐渐向外缘变小。

生态习性 生活于潮间带至浅水区的岩礁间, 以海绵为食。

地理分布 欧氏针盘海牛在北太平洋分布广泛, 见于韩国、日本、俄罗斯, 加拿大和美国西海岸。本种在我国沿海为首次报道。

2.2 COI 基因分析和系统进化分析

测序获得本研究 2 个欧氏针盘海牛标本的 COI 基因序列, 结合 GenBank 下载的针盘海牛属种类的 COI 基因序列进行对比分析, 两端对齐, 获得一致序列 639bp。基于 Kimura-2-parameter 模型计算各针盘海牛种内及种间遗传距离。4 种针盘海牛属种类的种内遗传距离为 0%~1.9%, 种间遗传距离为 7.5%~23.7%。比较欧氏针盘海牛与其余 3 种针盘海牛遗传距离可知, 欧氏针盘海牛与 *Diaulula sandiegensis* 的遗传距离最近(7.5%~8.7%), 与 *Diaulula greeleyi* 的遗传距离最远(23.1%~23.7%)。在分析的 5 个欧氏针盘海牛个体中, 中国海的个体与日本海的个体具有最近的遗传距离(0.2%), 而与俄罗斯和美国的个体的遗传距离分别为 1.8%。

以同科中的两个围鳃海牛属 *Jorunna* 种类作为外群, 基于最大似然法以及贝叶斯法构建系统发育树。

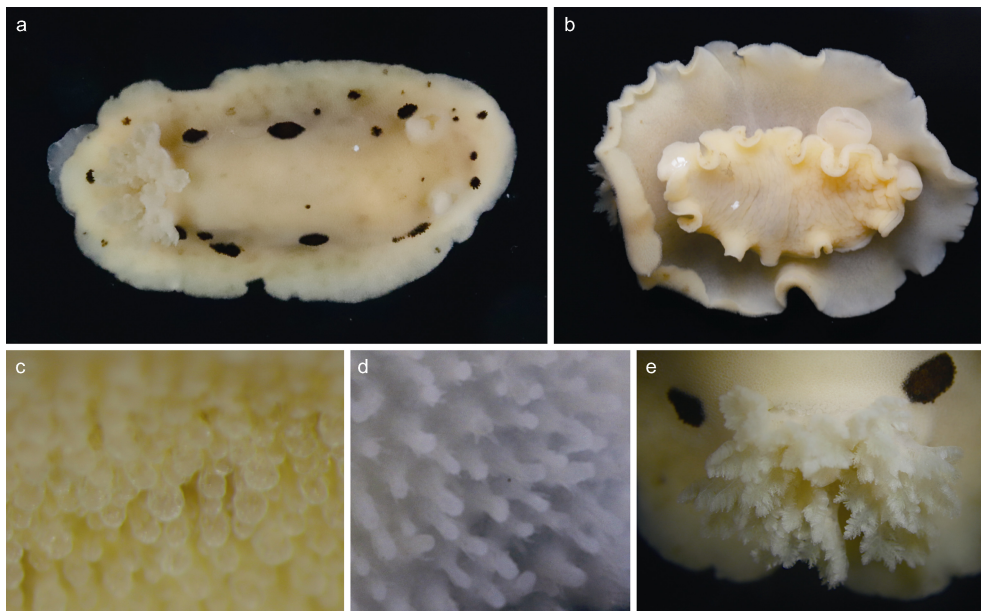


图 1 欧氏针盘海牛 *D. odonoghuei* (Steinberg, 1963) 的外部形态

Fig.1 Externally morphology of *D. odonoghuei* (Steinberg, 1963)

注: a. 动物背面; b. 动物腹面; c-d. 外套背部的乳突及骨针; e. 鳃

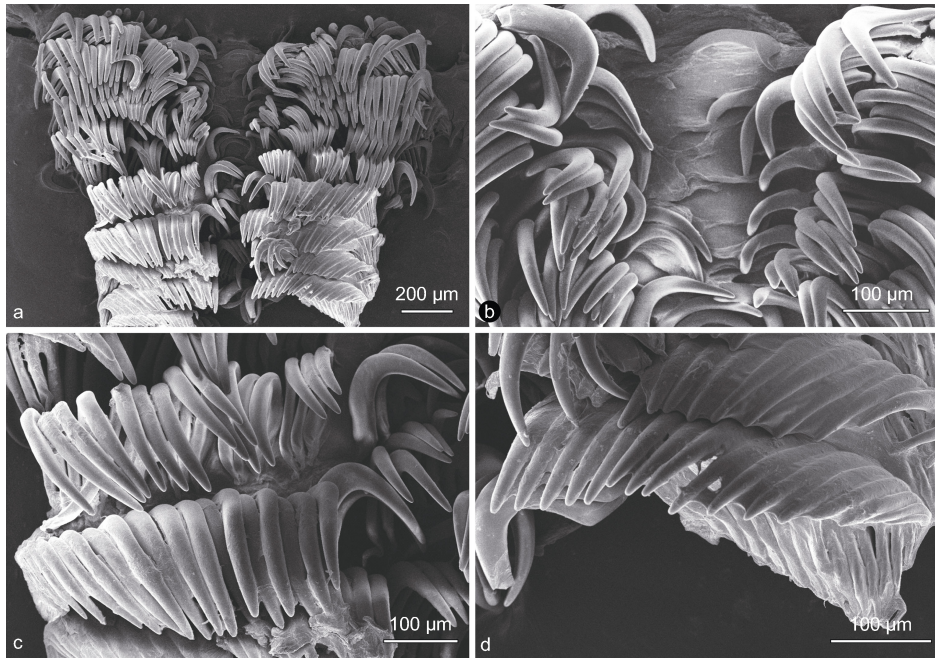


图 2 欧氏针盘海牛 *D. odonoghuei* (Steinberg, 1963)的齿舌

Fig.2 Radula of *D. odonoghuei* (Steinberg, 1963)

注: a. 齿舌整体背外观; b. 齿舌中央区; c-d. 侧齿

两种算法获得的系统发育树具有基本相同的拓扑结构(图 3)。针盘海牛属的 4 个种类聚为一个单系分支,不同的种聚在不同的分支上,节点均拥有较高的支

持率。在欧氏针盘海牛的分支上,本研究所用的个体与日本的个体先聚在一起,随后该分支再与俄罗斯和美国的个体相聚。

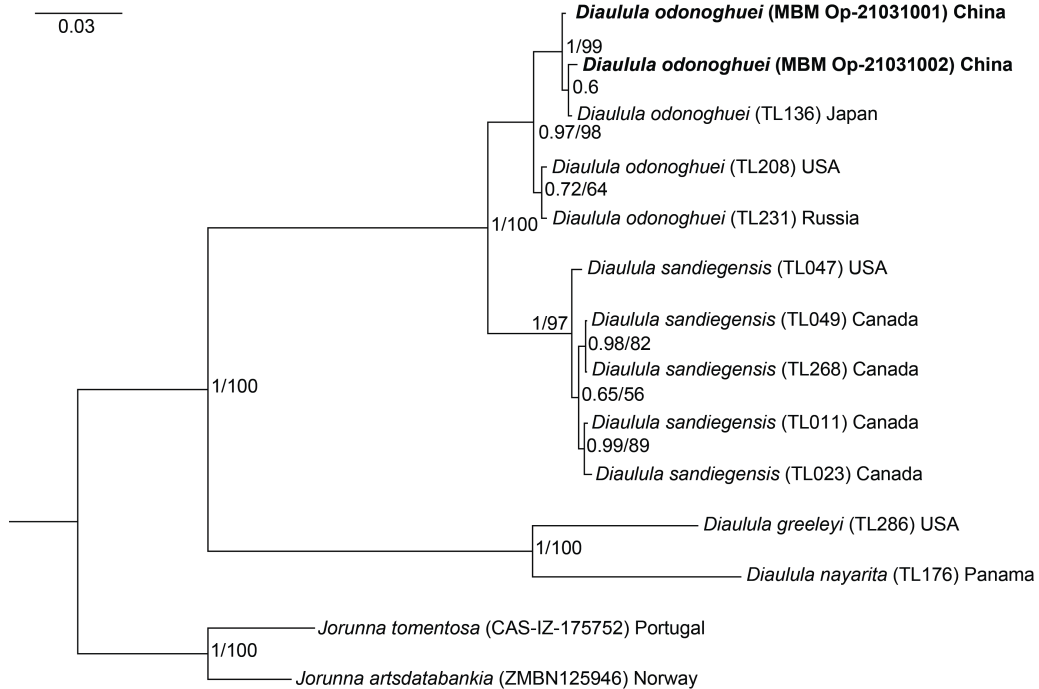


图 3 基于多基因序列(COI, 16S rRNA, H3)构建的针盘海牛属系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree inferred by Bayesian analysis (BI) and maximum likelihood (ML) based on concatenated dataset of COI, 16S, and H3 genes

注: 分支结节处的数字分别代表后验概率(PP>0.5)和自展值(BS>50), 粗体表示本研究所用样品

3 讨论

本研究所用标本的形态特征与欧氏针盘海牛 *Diaulula odonoghuei* (Steinberg, 1963) 的原始描述特征及其他文献的描述相吻合。由于欧氏针盘海牛在外部形态、齿舌特征以及生殖系统构造方面与 *Diaulula sandiegensis* (J. G. Cooper, 1863) 均十分相似, 因此常被认为是后者的同物异名(Behrens *et al*, 2001)。然而, 近年来的分子生物学研究证实了它们为不同的种(Lindsay *et al*, 2016)。基于分子结果, Lindsay 等(2016)对这两个种的外部形态进行了进一步的比较, 发现它们之间存在稳定的形态差异, 即: 欧氏针盘海牛背部的黑色斑点全部为实心状, 而 *Diaulula sandiegensis* 背部的黑色斑点为环形。*Diaulula odonoghuei* 分布于日本海至加利福尼亚北部, *Diaulula sandiegensis* 仅分布于加利福尼亚, 两者的分布范围在加利福尼亚北部有一定的重合。

Martynov 等(2015)认为 *Diaulula odonoghuei* 的原始描述过于简单, 并不能证明该种属于针盘海牛属 *Diaulula*, 而很可能属于盘海牛科中的其他属, 因此, 对其种名的有效性提出异议。事实上, 在 *Diaulula odonoghuei* 的原始描述中, O'Donoghue (1922) 明确指出其背部具有骨针的瘤状突起, 另外还对齿舌和一些解剖结构进行了描述, 这些特征均与针盘海牛属 *Diaulula* 的特征相吻合。此外, Lindsay 等(2016)在模式种产地附近又重新采到了 *Diaulula odonoghuei* 标本, 通过形态学和分子生物学研究进一步确认了该种为针盘海牛属种类, 从而证实了它的有效性。

4 结论

本文基于形态学和分子生物学研究, 报道了中国海盘海牛科 1 记录属和 1 新记录种: 欧氏针盘海牛 *Diaulula odonoghuei* (Steinberg, 1963)。该种在北太平洋海域的分布范围极广, 从韩国、日本、俄罗斯, 到北美洲西海岸的加拿大和美国均有分布。欧氏针盘海牛在中国海的发现, 不仅丰富了中国海软体动物多样性研究内容, 也为更好地理解该种在北太平洋的扩散和演化提供了新的数据和资料。

参 考 文 献

张素萍, 2008. 软体动物门、腹足纲、盘海牛科[M] // 刘瑞玉. 中国海洋生物名录. 北京: 科学出版社: 540.
张素萍, 张均龙, 陈志云, 等, 2016. 黄渤海软体动物图志[M]. 北京: 科学出版社: 199-200.

BABA K, 1957. A revised list of the species of Opisthobranchia from the northern part of Japan, with some additional descriptions [J]. Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Series 6, Zoology, 13(1/2/3/4): 8-14.
BEHRENS D W, 1991. Pacific Coast Nudibranchs. A Guide to the Opisthobranchs Alaska to Baja California, 2 [M]. Monterey, California: Sea Challengers: 112.
BEHRENS D W, VALDÉS Á, 2001. The identity of *Doris* (s.l.) species MacFarland, 1966 (Mollusca, Nudibranchia, Discodorididae): a persistent mystery from California solved [J]. Proceedings of the California Academy of Sciences, 52(15): 183-193.
COLGAN D J, MCLAUCHLAN A, WILSON G D F, *et al*, 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution [J]. Australian Journal of Zoology, 46(5): 419-437.
FOLMER O, BLACK M, HOEH W, *et al*, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5): 294-299.
KELLY J A, 2013. Distribution, genetic differentiation, and assortative mating of distinct morphotypes of *Diaulula sandiegensis*, a nudibranch with high dispersal potential [D]. Humboldt: Humboldt State University.
KOH D B, 2006. Sea Slugs of Korea [M]. Korea: Pungdeung Publishing: 250.
LINDSAY T, KELLY J, CHICHVARKHIN A, *et al*, 2016. Changing spots: pseudocryptic speciation in the North Pacific dorid nudibranch *Diaulula sandiegensis* (Cooper, 1863) (Gastropoda: Heterobranchia) [J]. Journal of Molluscan Studies, 82(4): 564-574.
MARCUS E V, MARCUS E R, 1967. American opisthobranch mollusks Part I, Tropical American opisthobranchs, Part II, Opisthobranchs from the Gulf of California [J]. Studies in Tropical Oceanography, 6: 1-256.
MARTYNOV A V, SANAMYAN N P, KORSHUNOVA T A, 2015. Review of the opisthobranch mollusc fauna of Russian Far Eastern seas: pleurobranchomorpha, doridida and nudibranchia [J]. Bulletin of Kamchatka State Technical University, 34: 62-87.
MCDONALD G R, 1983. A review of the nudibranchs of the California coast [J]. Malacologia, 24(1/2): 114-276.
O'DONOGHUE C H, 1922. Notes on the nudibranchiate mollusca from the Vancouver Island region. III. Records of species and distribution [J]. Transactions of the Canadian Institute, 14: 145-167.
O'DONOGHUE C H, 1926. A list of the nudibranchiate Mollusca recorded from the Pacific coast of North America, with notes on their distribution [J]. Transactions of the Royal Canadian Institute, 15(2): 199-247.
PALUMBI S R, MARTIN A, ROMANO S, *et al*, 2002. The Simple Fool's Guide to PCR [M]. Honolulu: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory: 45.
PUSLEDNIK L, SERB J M, 2008. Molecular phylogenetics of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) and effect of increased

- taxon sampling and outgroup selection on tree topology [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3): 1178-1188.
- STEINBERG J E, 1963. Notes on the opisthobranchs of the West Coast of North America, 3. Further nomenclatorial changes in the order Nudibranchia [J]. *Veliger*, 6: 63-67.
- THOMPSON T E, 1975. Dorid nudibranchs from eastern Australia (Gastropoda, Opisthobranchia) [J]. *Journal of Zoology*, 176(4): 477-514.
- VALDÉS Á, 2001. Deep-sea cryptobranch dorid nudibranchs (Mollusca, Opisthobranchia) from the tropical West Pacific, with descriptions of two new genera and eighteen new species [J]. *Malacologia*, 43(1/2): 237-311.
- VALDÉS Á, BERTSCH H, 2010. Two new species of dorid nudibranchs from the Gulf of California (Mar de Cortés), Baja California, Mexico (Mollusca, Opisthobranchia) [J]. *Spixiana*, 33(1): 1-11.

A NEW RECORD GENUS AND SPECIES OF DISCODORIDIDAE FROM CHINA (GASTROPODA, NUDIBRANCHIA)

ZHANG Shu-Qian^{1,2}, ZHANG Su-Ping^{1,2}

(1. Laboratory of Marine Organism Taxonomy and Phylogeny, Qingdao Key Laboratory of Marine Biodiversity and Conservation, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract During an investigation of the intertidal zone of Dalian, China, two nudibranch sea slugs were sampled. Morphological observations of the specimens suggest that they belong to *Diaulula odonoghuei* (Steinberg, 1963). The genus and species are both new to Chinese waters. In this study, the specimens were photographed alive, and its externally morphology and internal anatomy were studied using light and scanning electron microscopies. Phylogenetic trees based on two mitochondrial (COI, 16S rRNA) and nuclear (H3) genes using the Bayesian inference and maximum likelihood were reconstructed and analyzed. The discovery of *Diaulula odonoghuei* (Steinberg, 1963) further expand the knowledge on the species diversity of molluscs in China seas.

Key words *Diaulula*; *Diaulula odonoghuei*; new record; DNA barcoding