

中国玻璃海鞘属一新纪录种——萨氏海鞘 *Ciona savignyi*

马洪明^{1,2} 张俊丽² 姚子昂³ 刘利平⁴ 金松君¹ 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071; 2. 中国海洋大学, 青岛 266003;
3. 大连大学, 大连 116622; 4. 上海海洋大学, 上海 200090)

THE NEW RECORD OF ASCIDIAN *CIONA SAVIGNYI* IN CHINA

MA Hong-Ming^{1,2}, ZHANG Jun-Li², YAO Zi-Ang³, LIU Li-Ping⁴, JIN Song-Jun¹ and XIANG Jian-Hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 2. Ocean University of China, Qingdao 266003;
3. Dalian University, Dalian 116622; 4. Shanghai Ocean University, Shanghai 200090)

关键词: 海鞘; 萨氏海鞘; 玻璃海鞘; 细胞色素 b; 分类

Key words: Sea squirt; *Ciona savignyi*; *Ciona intestinalis*; Cytochrome b; Taxonomy

中图分类号: Q959.284 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)05-1056-04

海鞘(尾索动物亚门 Urochordata, 海鞘纲 Ascidiacea)是与脊椎动物亲缘关系最近的分支^[1], 是研究动物进化和发育的重要材料。其中玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)在世界范围内分布广泛, 材料容易获得, 目前已经可以在实验室人工养殖条件下完成全部生活史^[2, 3]。其蝌蚪幼体只有大约 2600 个细胞, 不同细胞的发育命运清楚。而且其卵子大, 组织半透明, 利于操作和观察^[4]。同时, *C. intestinalis* 基因组很小, 只有大约 160 Mb, 其基因组测序和注释也已经完成^[5]。玻璃海鞘正吸引着越来越多的研究兴趣, 逐渐成为发育和进化生物学研究的模式生物。

玻璃海鞘属(*Ciona*), 属于海鞘纲, 内性海鞘目(Enterogona), 扁鳃亚目(Phlebobranchiata), 玻璃海鞘科(Cionidae), 其模式种为玻璃海鞘 *Ciona intestinalis* Linnaeus。除 *C. intestinalis* 之外, 玻璃海鞘属中尚有一些其他种的记录, 但一直以来仍公认玻璃海鞘 *C. intestinalis* 是该属中唯一的种。这是因为, 区分上述不同种的形态特征十分次要而且不稳定^[6, 7]。日本学者 Hoshino 和 Tokioka 在研究日本沿海玻璃海鞘种类时发现两个可以稳定区分的种: 其一, 背囊稍硬; 内柱末端具有钩状的附属物, 称内柱附属物(endostylar appendage); 咽-心外膜开口靠近内柱附属物, 认为是一新种, 命名为 *C. robusta* Hoshino et Tokioka。其二, 背囊较软; 无内柱附属物; 咽-心

外膜开口靠近食管开口, 认为是 *C. intestinalis* 命名为 *C. intestinalis sensu Hoshino et Tokioka*^[8]。为进一步厘清这两个种, Hoshino 和 Nishikawa 对世界各地 11 个著名博物馆保存的玻璃海鞘标本进行了重新研究, 并从 Linnaeus 所记载的玻璃海鞘的取样地点采集样本进行比较, 发现在欧洲沿海水域实际上只存在一种玻璃海鞘, 即 *C. intestinalis*。而在日本海域采集的 *C. robusta* Hoshino et Tokioka 与欧洲的 *C. intestinalis* 形态上不能区分, 因此 *C. robusta* Hoshino et Tokioka 实际上是 *C. intestinalis* 的次异名。而 *C. intestinalis sensu Hoshino et Tokioka* 则被确定为一新种。该种的记录最早见于 Herdman 于 1882 年在挑战者号探险航行中采自日本神户的样本, 命名为萨氏海鞘 *C. savignyi* Herdman^[7]。

国内玻璃海鞘的记录见于张玺等对青岛产 *C. intestinalis* 的记录^[9]。此后, *C. intestinalis* 多见于中国沿海港口污损生物调查报告^[10-12]。这些记录时间上跨越 20 多年, 所记录的海鞘种类共有 66 种, 在玻璃海鞘属仍只有玻璃海鞘 *C. intestinalis* 一种, 均无萨氏海鞘 *C. savignyi* 的记录^[13]。中国科学院实验海洋生物学重点实验室相建海研究员课题组从 2002 年开始进行玻璃海鞘的人工养殖以及发育生物学研究。我们结合形态和线粒体细胞色素 b(Cyt b)基因序列对采自青岛和大连海滨的玻璃海鞘种类

收稿日期: 2009-07-31; 修订日期: 2010-05-01

基金项目: 国家博士后科学基金(20070410372); 山东省博士后奖励基金资助

作者简介: 马洪明(1970—), 男, 山东博兴人; 博士; 主要从事水产动物营养与免疫研究。E-mail: mahongm@ouc.edu.cn

通讯作者: 相建海 E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

进行了分析研究, 结果发现采自青岛和大连的玻璃海鞘是萨氏海鞘 *C. savignyi*, 而未发现 *C. intestinalis*。这是萨氏海鞘 *C. savignyi* 在我国的首次记录。

1 材料与方法

1.1 样本采集

样本采自青岛的薛家岛(2005 年 5 月)、胶南小口子(2005 年 12 月)、大连金沙湾(2006 年 10 月)等地近海扇贝养殖筏架及养殖吊笼。将海鞘连同其附着基一起取下, 置 100 L 玻璃钢桶, 静水充气运回实验室(大连样品用 95% 乙醇现场固定)。在实验室养殖系统流水充气暂养 1d 后, 解剖进行形态观察。

1.2 DNA 提取和 Cyt b 基因片段扩增

取海鞘咽部肌肉约 100 mg, 采用 Chartier, *et al.* 的方法抽提 DNA^[14]。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 质量。根据已发表的 *C. intestinalis* 以及 *C. savignyi* 线粒体 Cyt b 基因序列^[15,16], 选取保守区域设计引物: Cytb-F: 5'-ATGTTACGGAA(G/C)AATCCTTT-3' 和 Cytb-R: 5'-AA TACA(C/T)CGTAAAAT(A/G)GCAT-3'。引物含有少量简并碱基, 可以很好地扩增样本 Cyt b 基因片段。采用 *ExTaq* DNA 聚合酶(Takara, 大连)进行 PCR 扩增, 25 μ L 反应体系中含 DNA 模板 10 ng, dNTP Mix 0.2 mmol/L, Cyt b-F 0.2 μ mol/L, Cyt b-R 0.2 μ mol/L, *ExTaq* DNA 聚合酶 1.25U。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 1.5min, 1 循环; 94 $^{\circ}$ C 0.5min, 55 $^{\circ}$ C 0.5min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 5min。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 1 $\times$ TAE 缓冲液, 电压 5 V/cm。溴酚蓝前沿达到凝胶长度 2/3 时停止电泳, 302 nm 波长紫外灯下识别并切下目的条带。用 DNA 凝胶回收试剂盒(华舜生物技术公司, 上海)回收, 操作按照说明书进行。回收产物溶解于 20 μ L 无菌去离子水, 浓度约为 30 ng/ μ L。回收的 PCR 扩增片段由上海联合基因公司进行双向测序, 测序引物与 PCR 扩增引物相同。

1.3 序列比对和分析

采用 DNASTar 软件包对所得序列进行编辑和排序比对。用 MEGA4.0 软件^[17]分别采用 N-J(邻接)法和 UPGMA(非加权组平均值)法重建各物种的系统发生关系, 系统树各节点置信度由自引导值(Bootstrap value = 1000)估计, 分别采用 Kimura 双参数和碱基差异百分数(p-distance)等距离参数计算遗传距离。

2 结果

2.1 形态观察

根据 Hoshino 和 Nishikawa^[7]以及 Nishikawa(个人通信), *C. intestinalis* 和 *C. savignyi* 的主要形态学差别有 3 条: (1)*C. intestinalis* 的输精管末端通常(但不绝对)具有橙红色色素沉积; (2)*C. intestinalis* 内柱末端具有一个从鳃囊突出的小钩状的内柱附属物; (3)*C. intestinalis* 咽-心外膜开

口靠近内柱后端, 而 *C. savignyi* 靠近食道开口。其中最可靠的区分特征是内柱附属物的有无。根据上述差别, 随机解剖 50 只海鞘样品均未发现内柱附属物, 也未发现输精管末端色素沉积。这些结果提示所采样本为 *C. savignyi*。

2.2 Cyt b 基因序列分析

随机选取青岛薛家岛海鞘 20 只, 胶南小口子海鞘 10 只, 大连金沙湾海鞘 20 只, PCR 扩增其线粒体 Cyt b 基因部分序列, 利用所设计的 Cyt b-F 和 Cyt b-R 引物获得 840 bp 扩增片段, 双向测序, 拼接修剪后取 738 bp 进行序列比对。结果发现, 所测序的 50 只海鞘的 Cyt b 基因序列高度一致。50 个个体共享 4 种单倍型。4 种单倍型在 3 个取样地点均有分布, 没有明显的地理结构。

根据序列比对结果, 以真海鞘(*Halocynthia roretzi*)为外群(Acc No. NC_002177), 以本研究所采集海鞘的 4 种不同单倍型, 并 GenBank 已登录的两种 *C. intestinalis* (Acc No. AM292218; AJ517314) 和 *C. savignyi* (Acc No. NC004570) 的 Cyt b 基因共 8 条序列, 构建了 N-J 树和 UPGMA 树。两种方法获得的系统发生树拓扑结构一致, 以 N-J 树为例(图 1)。结果显示, 青岛和大连海鞘 4 种单倍型全部与 *C. savignyi* 聚为一群, 自引导值 100%。4 种单倍型 Hap1、Hap2、Hap3 和 Hap4 与 *C. savignyi* 的 Kimura 双参数遗传距离分别为 0.004、0.005、0.003 和 0.010(表 1), 碱基差异百分数距离略小于 Kimura 双参数遗传距离, 分别为 0.004、0.005、0.003 和 0.009。遗传距离均处于种内水平, 说明所分析样本为 *C. savignyi*(表 1)。

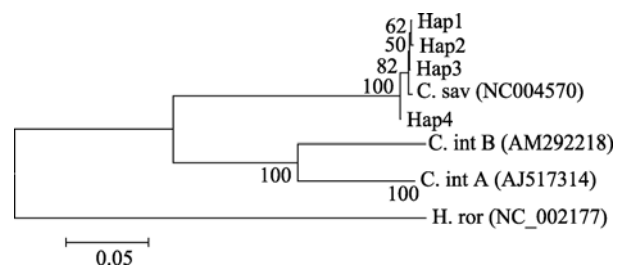


图 1 青岛和大连海鞘细胞色素 b 基因部分序列的系统发生 N-J 树
Fig. 1 Phylogenetic N-J tree based on partial nucleic acid sequence of cytochrome b gene

Hap. 单倍型; C. sav: *C. savignyi*; C. int: *C. intestinalis*; 真海鞘 *Halocynthia roretzi* (H. ror) 用做外群; 括号中为序列登录号; 节点上的数字为自引导值置信度 bootstrap=1000

Hap, haplotype; C. sav: *C. savignyi*, C. int: *C. intestinalis*. The ascidian *Halocynthia roretzi* (H. ror) was included as outgroup. The numbers in parentheses are accession number. The figures in nodes are support value with bootstrap=1000

3 讨论

本研究根据采自青岛和大连的玻璃海鞘属标本的形态和 Cyt b 基因分型, 在国内首次记录了萨氏海鞘 *C. savignyi*。国内对玻璃海鞘的记录主要见于海港污损生物调查。1963 年出版的《中国经济动物志》对青岛产

表 1 海鞘种类之间的 Kimura 双参数遗传距离
Tab. 1 Genetic distance between sea squirt species based on Kimura 2-parameter model

	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	C. sav	C. int A	C. int B	H. ror
Hap1								
Hap2	0.001							
Hap3	0.001	0.003						
Hap4	0.005	0.007	0.007					
C. sav	0.004	0.005	0.003	0.010				
C. int A	0.294	0.297	0.292	0.289	0.288			
C. int B	0.296	0.298	0.294	0.290	0.290	0.148		
H. ror	0.491	0.489	0.489	0.481	0.492	0.519	0.471	

C. intestinalis 的形态特征进行了详细的描述^[9]。在其描述中并未涉及 *C. intestinalis* 与 *C. savignyi* 相区分的 3 个主要特征。此后, 海港污损生物调查中对玻璃海鞘的记录均无形态描述。葛国昌和臧衍蓝对胶州湾的海鞘进行了调查和描述, 但只发表了菊海鞘科(Botryllidae)和柄海鞘科(Styelidae)的结果^[18, 19]。黄修明对中国近海海鞘类的研究, 只有对海鞘属(*Ascidia*)的研究结果^[20]。因此, 实际上对玻璃海鞘的明确的描述只有张玺等的记录^[9]。

玻璃海鞘在我国 4 个海区都有分布, 而以黄渤海海域为主^[13]。本研究样品采集地青岛和大连均属于黄渤海海域。在从 3 个地点采集的样品中均没有发现 *C. intestinalis*。这说明 *C. savignyi* 在该海区有可能是优势种。因此, 在以往历次调查中记录的 *C. intestinalis* 可能包含了 *C. savignyi*。要澄清这个问题, 需要对过去调查采集的样本进行重新分析。

两种海鞘在形态上十分相似, 这使得形态学区分比较困难。加之玻璃海鞘属分布十分广泛, 形成了一些适应不同环境的形态特征, 而这些特征往往并不稳定。分子生物学手段对于玻璃海鞘属不同种的厘定具有不可替代的作用。通过线粒体基因组结构, 线粒体以及核基因序列分析, 最近发现 *C. intestinalis* 实际上也存在 A、B 两个隐存种(Cryptic species)^[21, 22]。进一步的杂交实验证实两个种间已经存在生殖隔离, 杂种不育^[22]。而它们在形态上非常近似, 都具有 *C. intestinalis* 的关键特征, 如内柱附属物等。只有借助分子生物学手段才能有效地区分它们。

C. intestinalis 目前已逐渐成为重要的进行发育和进化生物学研究的模式生物。随着 *C. intestinalis* 基因组测序和注释工作的完成, 人们又将目光转向 *C. savignyi*。作为研究材料, *C. savignyi* 同样具有 *C. intestinalis* 所具有的全部优点, 国际上随后也启动了对 *C. savignyi* 全基因组的测序和注释工作, 目前已经初步完成^[23], 这使得 *C. savignyi* 和 *C. intestinalis* 成为比较基因组学研究的好材料。越来越多的研究者被吸引到玻璃海鞘的研究中来。因此, 在利用它们进行研究时正确区分所研究的种类尤为重要。

致谢:

感谢孙世春教授和胡晓钟教授在分类学规范和术语使用等方面的帮助。

参考文献:

- [1] Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, et al. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates [J]. *Nature*, 2006, **439**(7079): 965—968
- [2] Liu L P, Xiang J H, Dong B, et al. *Ciona intestinalis* as an emerging model organism: its regeneration under controlled conditions and methodology for egg dechoriation [J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2006, **7**(6): 467—474
- [3] Joly J S, Kano S, Matsuoka T, et al. Culture of *Ciona intestinalis* in closed systems [J]. *Developmental Dynamics*, 2007, **236**(7): 1832—1840
- [4] Corbo J C, Di Gregorio A, Levine M. The ascidian as a model organism in developmental and evolutionary biology [J]. *Cell*, 2001, **106**(5): 535—538
- [5] Dehal P, Satou Y, Campbell R K, et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins [J]. *Science*, 2002, **298**(5601): 2157—2167
- [6] Berrill N J. The tunicata with an account of the British species [M]. London: Bernard Quaritch Ltd. 1950, 129
- [7] Hoshino Z, Nishikawa T. Taxonomic studies of *Ciona intestinalis* (L.) and its allies [J]. *Publ Seto Mar Biol Lab*, 1985, **30**: 61—79
- [8] Hoshino Z, Tokioka T. An unusually *Ciona robust* from the northeastern coast of Honsyu Island [J]. *Japanese Zoology Magazine*, 1967, **92**: 661
- [9] Zhang X, Zhang F Y, Wu B L. Economic animal of China [M]. Beijing: Academic Press. 1963, 117 [张玺, 张凤瀛, 吴宝铃. 中国经济动物志. 北京: 科学出版社. 1963, 117]
- [10] Li J M, Huang X M, Li G Z, et al. Ecological studies on the marine fouling organisms at some important ports of China [J]. *Oceanologia et Limnologia. Sinica*, 1964, **6**(4): 371—

- 408 [李洁民, 黄修明, 黎国珍, 等. 中国几个主要海港附着生物生态的研究. 海洋与湖沼, 1964, 6(4): 371—408]
- [11] Li C Y, Huang Z G, Zhang L X, *et al.* Studies on the ecology of fouling organisms in Lushun harbor, Liaoning province, China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1982, 2(1): 59—65 [李传燕, 黄宗国, 张良兴, 等. 旅顺港附着生物生态的研究. 生态学报, 1982, 2(1): 59—65]
- [12] Zheng C X. Ascidiens of fouling organisms in Yellow Sea and Bohai Sea [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1988, 34(2): 180—187 [郑成兴. 黄、渤海沿岸污损生物中的海鞘类. 动物学报, 1988, 34(2): 180—187]
- [13] Zheng C X. Species diversity of Ascidian in the coastal China seas [J]. *Chinese Biodiversity*, 1995, 3(4): 201—205 [郑成兴. 中国沿海海鞘的物种多样性. 生物多样性, 1995, 3(4): 201—205]
- [14] Chartier F L, Keer J T, Sutcliffe M J, *et al.* Construction of a mouse yeast artificial chromosome library in a recombination-deficient strain of yeast [J]. *Nature Genetics*, 1992, 1(2): 132—136
- [15] Gissi C, Iannelli F, Pesole G. Complete mtDNA of *Ciona intestinalis* reveals extensive gene rearrangement and the presence of an atp8 and an extra trnM gene in ascidians [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2004, 58(4): 376—389
- [16] Yokobori S, Watanabe Y, Oshima T. Mitochondrial genome of *Ciona savignyi* (Urochordata, Ascidiacea, Enterogona): comparison of gene arrangement and tRNA genes with *Halocynthia roretzi* mitochondrial genome [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57(5): 574—587
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596—1599
- [18] Ge G C, Zang Y L. Ascidiens of Jiaozhou Bay I. Botryllidae [J]. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1983, 13(2): 93—100 [葛国昌, 臧衍蓝. 胶州湾海鞘类的调查 I. 菊海鞘科. 山东海洋学院学报, 1983, 13(2): 93—100]
- [19] Ge G C, Zang Y L. Ascidian of Jiaozhou Bay II. Styelidae [J]. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1987, 17(4): 95—102 [葛国昌, 臧衍蓝. 胶州湾海鞘类 II. 柄海鞘科 Styelidae. 山东海洋学院学报, 1987, 17(4): 95—102]
- [20] Huang X M. Studies on Ascidiens of China seas I. the species of Genus *Ascidia* [J]. *Studia Marina Sinica*, 1989, 30: 239—250 [黄修明. 中国近海海鞘类的研究 I. 海鞘属的种类. 海洋科学集刊, 1989, 30: 239—250]
- [21] Iannelli F, Pesole G, Sordino P, *et al.* Mitogenomics reveals two cryptic species in *Ciona intestinalis* [J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23(9): 419—422
- [22] Caputi L, Andreakis N, Mastrototaro F, *et al.* Cryptic speciation in a model invertebrate chordate [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(22): 9364—9369
- [23] Satoh N, Kawashima T, Shoguchi E, *et al.* Urochordate genomes [J]. *Genome Dynamics*, 2006, 2: 198—212