

李海涛, 何静, 姜重臣, 等. 印度洋、西北太平洋龟螺属和小龟螺属种类的分类及 DNA 条形码鉴定[J]. 海洋学报, 2020, 42(4): 79–86, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2020.04.009

Li Haitao, He Jing, Jiang Chongchen, et al. Taxonomy and DNA barcoding in genera *Cavolinia* and *Diacavolinia* from the Indian Ocean and Northwest Pacific Ocean[J]. Haiyang Xuebao, 2020, 42(4): 79–86, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2020.04.009

# 印度洋、西北太平洋龟螺属和小龟螺属种类的分类及 DNA 条形码鉴定

李海涛<sup>1</sup>, 何静<sup>1</sup>, 姜重臣<sup>1</sup>, 陈志云<sup>2</sup>, 周鹏<sup>1</sup>

(1. 自然资源部南海环境监测中心, 广东 广州 510300; 2. 中国科学院南海海洋研究所 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301)

**摘要:** 近来的研究表明, 一些所谓的环球或环极地分布的广布种实际上包含着一些局限性分布的隐存种, 物种多样性可能被低估。本文采用形态学和 DNA 条形码技术相结合的方式, 对印度洋和西北太平洋海域的龟螺属 (*Cavolinia*) 和小龟螺属 (*Diacavolinia*) 的种类进行了分类学研究和物种鉴定。结果表明, 线粒体 16S rRNA 基因数据不支持小龟螺属形态种的划分, 分布于西北太平洋的 *D. grayi*、*D. vanutrechtii*、*D. pacifica*、*D. elegans*、*D. angulosa* 等多个形态种可能属同一个种, 即长吻小龟螺 (*D. longirostris*)。COI 基因数据也不支持钩龟螺 (*C. uncinata*) 亚种和变形的划分。许多形态特征不能作为种或种下分类单元的区分依据。钩龟螺、球龟螺 (*C. globulosa*) 和长吻小龟螺在 COI 系统树中均形成 2 个地理支系, 其内部可能存在隐存种。西北太平洋海域长吻小龟螺的核基因组中存在线粒体假基因, 对 DNA 条形码分析产生严重干扰。

**关键词:** 龟螺属; 小龟螺属; 分类学; COI; 16S rRNA

中图分类号: P714+.5; Q959

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2020)04-0079-08

## 1 引言

工业革命以来二氧化碳大量排放导致的全球变暖和海洋酸化, 已经对全球海洋生态系统产生了深刻影响<sup>[1-3]</sup>。无论是钙化生物还是非钙化生物, 全球变暖和海洋酸化均会对其造成一系列影响, 如影响基因表达、繁殖力、幼体成活率等<sup>[4-6]</sup>。此外, 全球变暖和海洋酸化还会影响物种的分布、生物群落的多样性和结构<sup>[7]</sup>。

有壳翼足类 (Thecosome Pteropods) 是海洋浮游动物的重要类群, 在海洋食物链中扮演着十分关键的角色, 它们不仅是重要的初级消费者, 也是其他海洋生物和海鸟的饵料<sup>[8-9]</sup>。有壳翼足类的外壳主要由文石

构成<sup>[10]</sup>, 相比方解石, 文石更易溶解于海水中<sup>[11]</sup>。因此, 有壳翼足类被广泛用作海洋酸化监测的指示物种<sup>[6, 12]</sup>。

准确的物种鉴定是开展海洋酸化等环境变化对翼足类影响研究的前提, 因为不同的物种会对环境变化产生不一样的响应<sup>[13]</sup>。然而, 我国对翼足类的分类学研究仍远远不足。张福绥<sup>[14]</sup>在半个多世纪前较为系统地开展了中国海浮游软体动物 (包括翼足类、异足类和海蜗牛) 的分类学研究, 此后国内外的分类结论<sup>[15]</sup>基本沿用了其观点, 鲜有其他关于浮游软体动物的分类报道。国外学者<sup>[16-17]</sup>提出一些新的翼足类分类系统尚未被国内采用, 许多分类错误也没得到订正, 如张福绥<sup>[14]</sup>对强卷螺属 (*Agadina*)、厚唇螺 (*Diacria*

收稿日期: 2019-05-15; 修订日期: 2019-06-11。

基金项目: 国家自然科学基金 (41606191); 自然资源部南海局局长基金项目 (1705)。

作者简介: 李海涛 (1981—), 男, 湖北省沙洋县人, 高级工程师, 从事贝类和浮游动物分类学研究。E-mail: haitaoli1981@126.com

*trispinosa*)和蛆状螺(*Cuvierina columnella*)等种类的鉴定有误<sup>[18-20]</sup>。DNA 条形码技术<sup>[21]</sup>的出现为物种鉴定提供了新的手段,该技术能有效回避鉴定者对生物个体形态差异的主观认识和判断。近年来,DNA 条形码技术已被广泛应用于翼足类的分类学、种类鉴定和地理群体的遗传分化等方面的研究<sup>[13,22-23]</sup>。

龟螺属(*Cavolinia*)和小龟螺属(*Diacavolinia*)是翼足类龟螺科(Cavoliniidae)龟螺亚科(Cavoliniinae)下的2个属。目前,我国只采用了前1个属,将后1个属的种类均归入到前者之中。有壳翼足类的分类主要是根据贝壳的形态特征,但由于其贝壳形态较为简单,因而难以进行准确的物种鉴定<sup>[22]</sup>。龟螺属和小龟螺属的分类极为混乱,被人为建立了大量的亚种和变形<sup>[24-25]</sup>。比如,长期以来小龟螺属被认为仅有长吻小龟螺(*D. longirostris*)1个种<sup>[26-27]</sup>,后来 van der Spoel 等<sup>[25]</sup>根据细微的形态差异将这1个种分出22个种及4个变形。但通过对比COI序列,分布于东北大西洋的小龟螺属4个形态种被证明为同一物种<sup>[28]</sup>。因此,龟螺属和小龟螺属的种及种以下分类单元的有效性尚需通过分子手段来加以证实。本研究分析了西北太平洋和印度洋的龟螺属和小龟螺属种类的形态特征,同时结合线粒体COI和16S基因序列对其进行物种鉴定,以期解决两属部分种类的分类混乱和争议,并揭示其地理遗传分化。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品采集

样品于2016年至2018年采自西北太平洋(含南

海)及印度洋海域的12个站位(图1)。使用大型浮游生物网采用垂直拖网和水平拖网相结合的方式采集浮游动物样品,绝大部分样品为夜间用水平拖网的方式采集。海上采集的浮游动物样品经筛绢过滤后用无水酒精固定(酒精使用量约为浮游动物体积的3~4倍),冰冻保存带回实验室。体视镜下对目标种类进行分选和初步的分类鉴定,并编号拍照。共计43个标本用于DNA序列的分析(表1)。

### 2.2 DNA提取、PCR扩增和测序

取部分或整只动物,采用碱裂解法<sup>[29]</sup>提取DNA。使用引物LCO-1490(5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3')和HCO-2198(5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3')<sup>[30]</sup>扩增COI基因片段;使用16sar-L(5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3')和16sbr-H(5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3')<sup>[31]</sup>扩增16S rRNA基因片段。

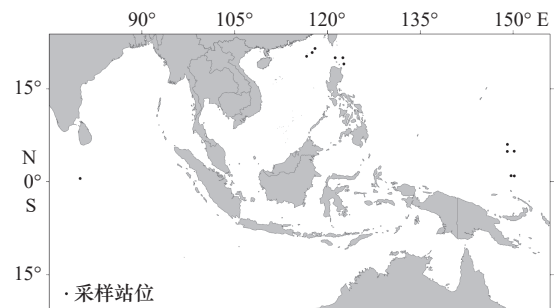


图1 采样站点分布

Fig. 1 Distribution of sampling sites

表1 样品采集信息和基因库(GenBank)登录号

Table 1 Collection information and GenBank accession numbers for specimens analyzed in this study

形态种	测序标本数	采集海域	GenBank登录号	
			COI	16S rRNA
<i>Cavolinia uncinata</i>	5	西北太平洋	MK913370~374	
<i>C. gibbosa</i>	4	西北太平洋	MK913375~378	
<i>C. globulosa</i>	5	西北太平洋、印度洋	MK913379~383	
<i>C. labiata</i>	8	西北太平洋	MK913384~391	
<i>Diacavolinia vanutrechtii</i>	2	西北太平洋	MK913392	MK913407
<i>Diacavolinia</i> sp.	3	西北太平洋	MK913393~395	
<i>D. grayi</i>	2	西北太平洋	MK913396/MK913399	
<i>D. angulosa</i>	10	西北太平洋	MK913397~398/400~404/410~412	
<i>D. elegans</i>	2	西北太平洋	MK913405~406	
<i>D. pacifica</i>	2	西北太平洋	MK913408~409	

PCR反应体系总体积为50  $\mu\text{L}$ , 包括: 2 $\times$ 扩增缓冲溶液25  $\mu\text{L}$ , 脱氧核糖核苷三磷酸(Deoxy-ribonucleoside Triphosphate, dNTP)400  $\mu\text{mol/L}$ , 引物各0.3  $\mu\text{mol/L}$ , 高保真PCR酶(TOYOBO, KOD FX)1.0 U, 模板DNA 1  $\mu\text{L}$ , 加去离子水补足至50  $\mu\text{L}$ 。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$  变性15 s, 53 $^{\circ}\text{C}$  退火30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$  延伸60 s, 共30个循环; 最后68 $^{\circ}\text{C}$  延伸10 min。PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司广州分公司进行回收纯化和测序, COI基因片段进行双向测序, 16S rRNA基因片段进行反向引物测序(个别样品为双向测序), 测序引物与扩增引物相同。

### 2.3 系统学分析

拼接、校对后的测序结果, 首先利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的BLAST程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性检索, 并将COI基因序列在综合性序列分析工具软件DAMBE 5<sup>[32]</sup>中翻译成氨基酸序列, 以确保测序获得的序列不是线粒体假基因(Nuclear Mitochondrial Pseudogenes)。本文测序获得的序列连同基因库(GenBank)中下载的其他序列, 使用DAMBE 5内置的Clustal W程序进行多重序列比对。使用分子进化遗传分析软件MEGA 7.0<sup>[33]</sup>计算碱基的组成, 基于

Kimura双参数(Kimura 2-Parameter, K2P)模型计算遗传距离, 采用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 可靠性经过1 000次自展(Bootstrap)检验。采用进化树分析软件MrBayes 3.2<sup>[34]</sup>构建贝叶斯树(Bayesian Inference, BI), 分子进化模型使用核苷酸替换DNA进化最优模型分析软件jModelTest 2.1<sup>[35]</sup>根据贝叶斯信息准则(Bayesian Information Criteria)标准计算得出。COI和16S rRNA基因的最佳进化模型分别为HKY+I+G和HKY+G。在马尔可夫链蒙特卡罗(Markov Chain Monte Carlo)参数下运行300万代, 每100代抽样一次, 前2 500代作为老化样本舍去。BI树各分支置信度以后验概率表示。使用进化树作图软件FigTree 1.4.3显示BI树的拓扑结构图。

## 3 结果

### 3.1 形态特征

在西北太平洋和印度洋海域共采集到4个龟螺属种类, 分别为钩龟螺(*C. uncinata*)(图2a至图2c)、驼龟螺(*C. gibbosa*)(图2d)、球龟螺(*C. globulosa*)(图2e)和宽弯龟螺(*C. labiata*)(图2f)。其中, 钩龟螺的贝壳形态呈连续的变化, 小个体的侧棘(侧突起)显得更为发达, 尾棘向背方弯曲的程度也更大(图2a), 腹壳接

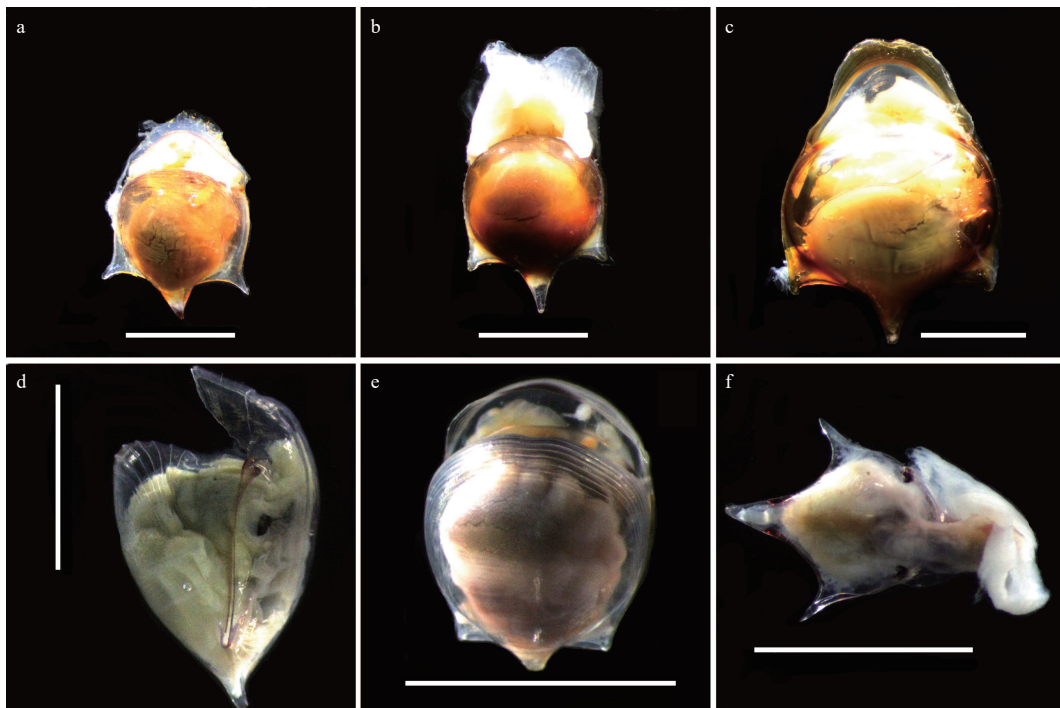


图2 龟螺属种类的贝壳形态(比例尺为5 mm)

Fig. 2 Shell morphology of *Cavolinia* species (scale bars: 5 mm)

a-c. 钩龟螺; d. 驼龟螺; e. 球龟螺; f. 宽弯龟螺

a-c. *C. uncinata*; d. *C. gibbosa*; e. *C. globulosa*; f. *C. labiata*

近圆形(图 2a 至图 2b); 大个体的侧棘不明显, 尾棘弯曲程度较小(图 2c)。

小龟螺属具有极其丰富的形态多样性(图 3a, 图 3c, 图 3e, 图 3g, 图 3i 至图 3l), 其侧突起尖锐(图 3a, 图 3c)或极发达(图 3i)或不明显(图 3j 至图 3l), 背壳前缘部分凹陷(图 3e, 图 3i 至图 3k)或不凹陷(图 3g, 图 3l)。参照文献 [25] 进行形态鉴定, 部分个体可明确鉴定为 *D. grayi*(图 3a, 图 3b)、*D. vanutrechtii*(图 3c, 图 3d)、*D. pacifica*(图 3e, 图 3f)、*D. elegans*(图 3g, 图 3h)和 *D. angulosa*(图 3j, 图 3k, 图 4)等形态种。部分个体难以进行形态种的划分, 如图 3i 所示的标本与 *D. flexipes*(图 4)的侧突起一样发达, 但前者背壳前缘部分远不及后者宽大。图 3l 所示的标本, 虽然其侧突起不及图 3c 的发达, 但其形态特征与 *D. vanutrechtii* 的正模标本(图 4)十分相似, 故将其也定为 *D. vanutrechtii*。

### 3.2 序列分析

测序共获得 23 条 COI 序列(GenBank 登录号 MK913370~MK913392)和 20 条 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号 MK913393~MK913412)。本文共计扩增了近 30 个小龟螺属标本的 COI 基因, 扩增并

测序成功的 12 条序列, 经 BLAST 比对和序列分析后发现, 仅有 1 个标本(图 3l)的序列与 GenBank 中的同种(形态种)具有较高的同源性。其余 11 条序列与龟螺属和小龟螺属种类的同源性很低, 且存在一段 3 bp 的插入/缺失片段, 我们推测这些序列为线粒体假基因(序列未提交 GenBank)。这些线粒体假基因均能正确翻译为氨基酸序列, 没有产生终止密码子, 且核苷酸变异位点大多数(75.5%)为密码子第三位碱基。

真正的线粒体 COI 序列长 658 bp, A、T、G、C 平均含量分别为 24.3%、40.7%、18.0% 和 17.0%。线粒体假基因序列长 655 bp, A、T、G、C 平均含量分别为 23.3%、38.3%、20.1% 和 18.3%。16S rRNA 基因序列长 369~372 bp, 存在 5 个插入/缺失位点, A、T、G、C 平均含量分别为 30.7%、30.9%、21.5% 和 17.0%。所有序列的 A+T 的含量均明显高于 G+C 的含量。

### 3.3 系统发育和遗传距离

线粒体 COI 和 16S rRNA 基因的 BI 树和 NJ 树有大体一致的拓扑结构, 本文只显示 BI 树或 NJ 树(图 4, 图 5)。在 16S rRNA 基因系统树中, 分布于西北太平洋的小龟螺属 *D. grayi*、*D. vanutrechtii*、*D. pacifica*、*D. elegans*、*D. angulosa* 等形态种聚为一个分支, 并获得

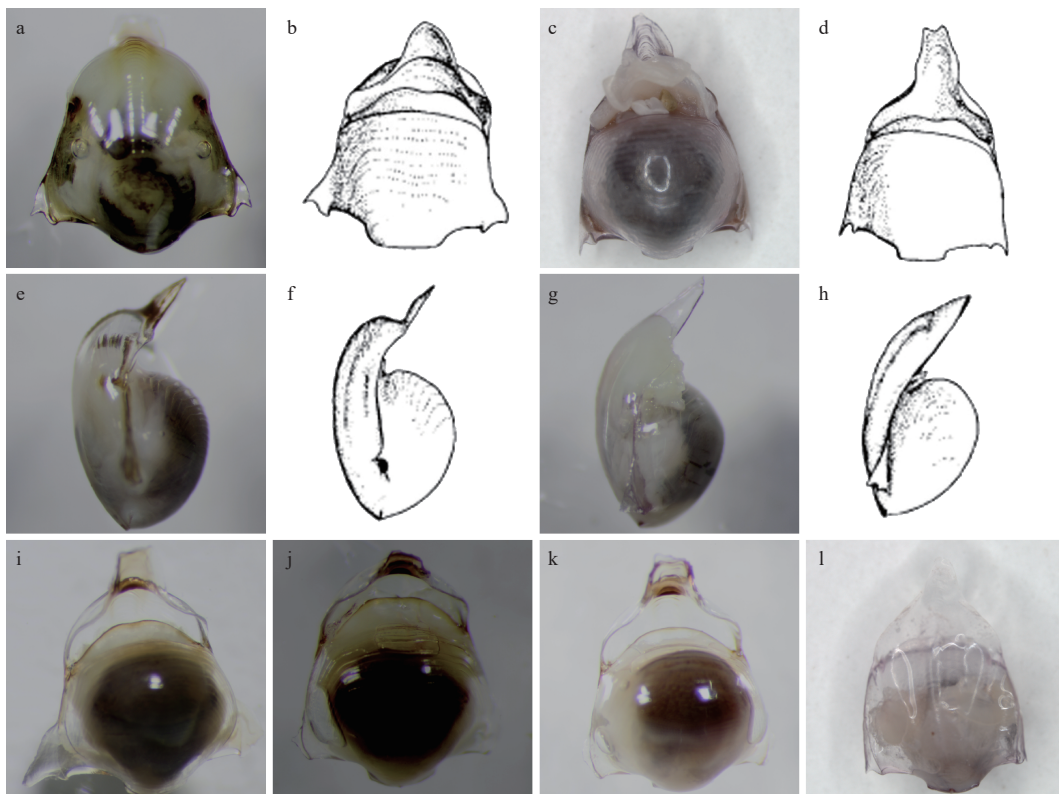


图 3 不同形态类型的小龟螺

Fig. 3 Different morphotypes of *Diacavolinia*

手绘图引自文献 [25]: b. *D. grayi*; d. *D. vanutrechtii*; f. *D. pacifica*; h. *D. elegans*

Drawings are reproduced from reference [25]: b. *D. grayi*; d. *D. vanutrechtii*; f. *D. pacifica*; h. *D. elegans*

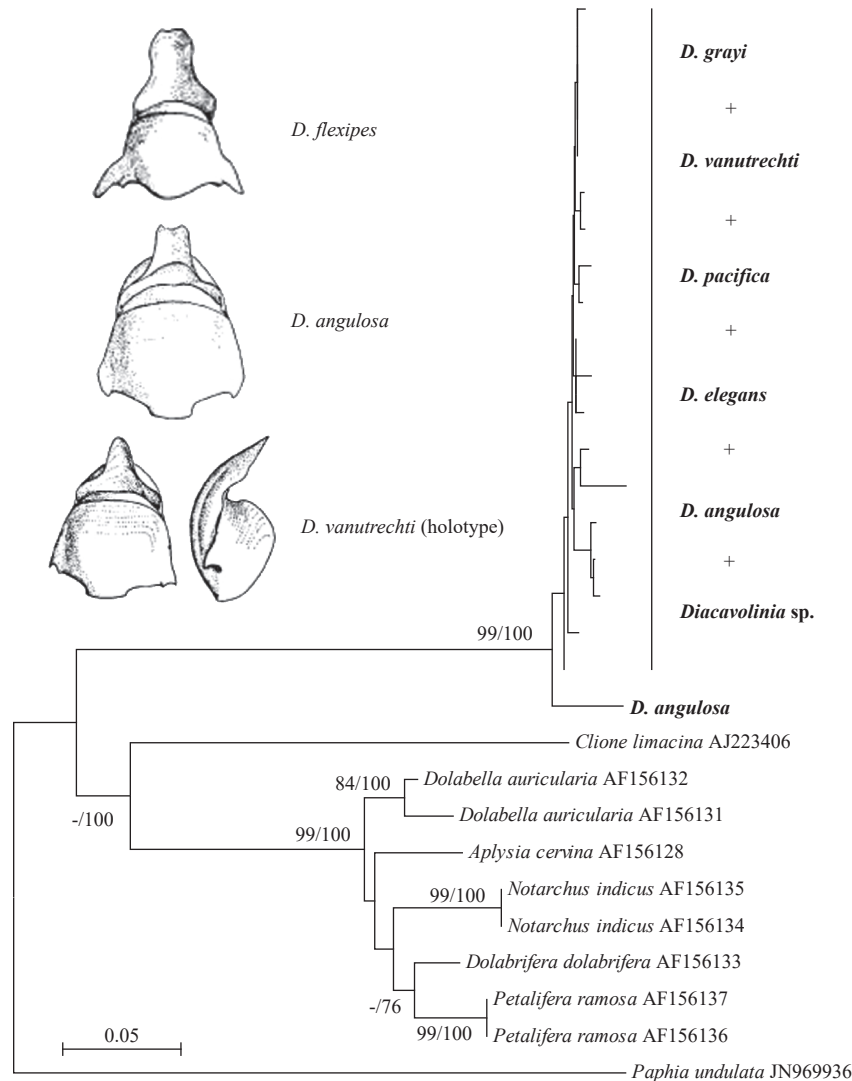


图 4 基于 16S rRNA 基因构建的小龟螺和其他腹足类邻接系统发育树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of genus *Diacavolinia* and other gastropods based on mitochondrial 16S rRNA gene sequences

节点处数值分别为自展支持率和后验概率, 仅给出大于 70% 的数值; 手绘图引自文献 [25]

Bootstrap values/posterior probabilities over 70% are shown for each node. Drawings are reproduced from reference [25]

很高的支持率(图 4)。因此, 这些不同的形态种可能属于同一物种, 即长吻小龟螺(*D. longirostris*)。

COI 基因系统分析结果表明, 钩龟螺、球龟螺和长吻小龟螺在系统树中均形成 2 个地理支系并获得 100% 的支持率, 且 3 个种类都分别形成大西洋和印度洋-西北太平洋地理支系(图 5)。其余种类则在 COI 系统树中形成单系群。

COI 基因的 K2P 遗传距离分析表明, 种内/支系内的遗传距离在 0~0.025 之间, 平均值为 0.009; 种间/支系间的遗传距离则在 0.082~0.393 之间, 平均值为 0.232; 钩龟螺、球龟螺和长吻小龟螺 3 个形态种不同支系间的遗传距离则在 0.102~0.246 之间, 平均值为 0.137。16S rRNA 基因的 K2P 遗传距离分析表明, 除 1 条 *D. angulosa*(GenBank 登录号 MK913410) 与其余

序列遗传距离较大外(0.039~0.053, 平均值 0.044), 其余 19 条序列(包括 *D. grayi*、*D. vanutrechtii*、*D. pacifica*、*D. elegans*、*D. angulosa* 等形态种)的遗传距离在 0~0.033 之间, 平均值为 0.012。小龟螺属与数据库中唯一的 1 条翼足类 16S rRNA 基因序列(*Clione limacina*, AJ223406)的遗传距离在 0.400 以上。

## 4 讨论

本文对西北太平洋小龟螺属标本 16S rRNA 基因序列的分析结果表明, *D. grayi*、*D. vanutrechtii*、*D. pacifica*、*D. elegans*、*D. angulosa* 等形态种可能为同一个种。Maas 等 [28] 的研究结果也表明, 东北大西洋小龟螺属的 4 个形态种实为 1 种。因此, van der Spoel 等 [25] 基于形态差异对小龟螺属物种的划分无法得到 DNA

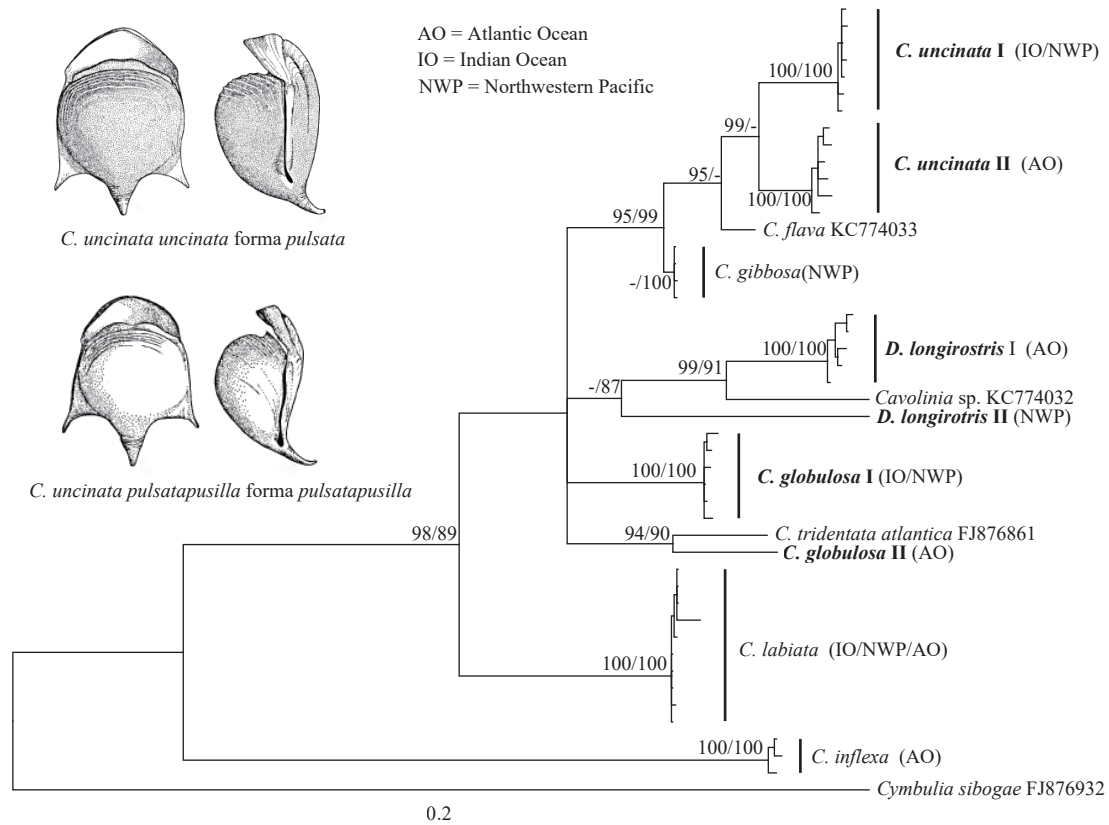


图 5 基于 COI 基因构建的龟螺属和小龟螺属贝叶斯系统发育树

Fig. 5 Bayesian inference phylogenetic tree of genera *Cavolinia* and *Diacavolinia* based on mitochondrial COI gene sequences

节点处数值分别为后验概率和自展支持率, 仅给出大于 70% 的数值; 手绘图引自文献 [24]

Posterior probabilities/bootstraps values over 70% are shown for each node. Drawings are reproduced from reference [24]

数据的支持, 可能过高估计了该属的物种多样性。侧突起的发达程度, 背壳前缘的凹陷程度这些连续变异的数量性状显然无法作为种类区分的依据。小龟螺属的种类多样性和分类学问题, 尚需通过更大范围的采样并结合多方面的证据来解决。当前, 将小龟螺属作为单型属处理更妥, 即仅包含长吻小龟螺一个种。

宽弯龟螺在我国被作为 *C. inflexa* 的变种来处理<sup>[14]</sup>, 前者与后者存在明显的形态差异<sup>[36]</sup>, 且系统学分析也支持前者为独立种。钩龟螺被分为 2 个亚种(图 5 手绘图), 亚种之下又被分为 5 个变形<sup>[24]</sup>。这种精细的划分为种类鉴定和其他研究带来极大的混乱。物种具有形态可塑性, 栖息环境可能影响其形态特征, 不同发育阶段的个体往往也具有一定的差异。我们获得的不同大小的钩龟螺存在一定的形态差异(图 2a 至图 2c), 如小个体侧棘的发达程度和尾棘的弯曲程度更大。尤其是我们获得的最大标本(图 2c), 壳宽可达 10 mm, 明显大于张福绥<sup>[14]</sup>和 van der Spoel<sup>[24]</sup>所记录的标本(小于 6.5 mm)。

开放的海洋环境没有限制物种分布的地理障碍, 终生浮游生物或是其他海洋生物的阶段浮游幼体

也有较强的扩散能力, 因而许多物种被认为分布广泛。然而, 一些所谓的环球或环极地分布的物种(形态种)实际上是一些局限性分布的隐存种, 形态种生物多样性无法反映真实的物种多样性<sup>[37-39]</sup>。钩龟螺、球龟螺和长吻小龟螺在 COI 系统树中均形成明显的地理支系, 产生了明显的地理遗传分化, 不同支系间的 K2P 遗传距离都大于 3% 的阈值<sup>[21]</sup>, 其内部可能存在隐存种。

线粒体基因在物种鉴定和系统进化等领域得到了广泛应用。然而, 线粒体假基因的存在为上述研究造成了一定程度的干扰。线粒体假基因通常极易被通用引物扩增出来, 甚至是优先被扩增出来<sup>[40]</sup>。本文扩增得到真正线粒体 COI 基因序列的比例极低, 这提醒我们在开展 DNA 条形码研究的时候应防范线粒体假基因的干扰, 否则会得出错误的结论。

致谢: 中国科学院南海海洋研究所周林滨博士采集了印度洋样品, 李开枝研究员在实验过程中给予了帮助和支持, 谨致谢忱。

## 参考文献:

- [1] Doney S C, Fabry V J, Feely R A, et al. Ocean acidification: the other CO<sub>2</sub> problem[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2009, 1: 169–192.
- [2] Bednaršek N, Harvey C J, Kaplan I C, et al. Pteropods on the edge: cumulative effects of ocean acidification, warming, and deoxygenation[J]. *Progress in Oceanography*, 2016, 145: 1–24.
- [3] Alvarez-Fernandez S, Bach L T, Taucher J, et al. Plankton responses to ocean acidification: the role of nutrient limitation[J]. *Progress in Oceanography*, 2018, 165: 11–18.
- [4] Dupont S, Pörtner H. Get ready for ocean acidification[J]. *Nature*, 2013, 498(7455): 429.
- [5] Bunse C, Lundin D, Karlsson C M G, et al. Response of marine bacterioplankton pH homeostasis gene expression to elevated CO<sub>2</sub>[J]. *Nature Climate Change*, 2016, 6: 483–487.
- [6] Gardner J, Manno C, Bakker D C E, et al. Southern Ocean pteropods at risk from ocean warming and acidification[J]. *Marine Biology*, 2018, 165: 8.
- [7] Harley C D G, Hughes A R, Hultgren K M, et al. The impacts of climate change in coastal marine systems[J]. *Ecology Letters*, 2006, 9(2): 228–241.
- [8] Foster B A, Cargill J M, Montgomery J C. Planktivory in *Pagothenia borchgrevinki* (Pisces: Nototheniidae) in McMurdo Sound, Antarctica[J]. *Polar Biology*, 1987, 8(1): 49–54.
- [9] Karnovsky N J, Hobson K A, Iverson S, et al. Seasonal changes in diets of seabirds in the North Water Polynya: a multiple-indicator approach[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2008, 357: 291–299.
- [10] Seibel B A, Dymowska A, Rosenthal J. Metabolic temperature compensation and coevolution of locomotory performance in pteropod molluscs[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2007, 47(6): 880–891.
- [11] Mucci A. The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure[J]. *American Journal of Science*, 1983, 283(7): 780–799.
- [12] Roger L M, Richardson A J, McKinnon A D, et al. Comparison of the shell structure of two tropical Thecosomata (*Creseis acicula* and *Diacavolinia longirostris*) from 1963 to 2009: potential implications of declining aragonite saturation[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2012, 69(3): 465–474.
- [13] Hunt B, Strugnell J, Bednaršek N, et al. Poles apart: the “bipolar” pteropod species *Limacina helicina* is genetically distinct between the Arctic and Antarctic oceans[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9835.
- [14] 张福绥. 中国近海的浮游软体动物 I. 翼足类、异足类及海蜗牛类的分类研究[J]. 海洋科学集刊, 1964(5): 125–226.  
Zhang Fusui. The pelagic molluscs off China coast I. A systemic study of Pteropoda (Opisthobranchia), Heteropoda (Prosobranchia) and Janthinidae (Ptenoglossa, Prosobranchia)[J]. *Studia Marina Sinica*, 1964(5): 125–226.
- [15] 刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008.  
Liu Ruiyu. Checklist of Marine Biota of China Seas[M]. Beijing: Science Press, 2008.
- [16] van der Spoel S. Euthecosomata, a Group with Remarkable Developmental Stages (Gastropoda, Pteropoda)[M]. Gorinchem: J. Noorduyin & ZN, 1967.
- [17] Rampal J. Les thécosomes (Mollusques pélagiques): systématique et évolution, écologie et biogéographie Méditerranéennes[D]. Marseille: Université de Provence, 1975.
- [18] Robertson R. Dispersal and wastage of larval *Philippia krebsii* (Gastropoda: Architectonicidae) in the north Atlantic[J]. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1964, 116: 1–27.
- [19] Bontes B, van der Spoel S. Variation in the *Diacria trispinosa* group, new interpretation of colour patterns and description of *D. rubecula* n. sp. (Pteropoda)[J]. Bulletin Zoölogisch Museum Universiteit van Amsterdam, 1998, 16(11): 77–84.
- [20] Burridge A K, Janssen A W, Peijnenburg K T C A. Revision of the genus *Cuvierina* Boas, 1886 based on integrative taxonomic data, including the description of a new species from the Pacific Ocean (Gastropoda, Thecosomata)[J]. *ZooKeys*, 2016(619): 1–12.
- [21] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313–321.
- [22] Jennings R M, Bucklin A, Ossenbrügger H, et al. Species diversity of planktonic gastropods (Pteropoda and Heteropoda) from six ocean regions based on DNA barcode analysis[J]. *Deep Sea Research II: Topical Studies in Oceanography*, 2010, 57(24/26): 2199–2210.
- [23] Gasca R, Janssen A W. Taxonomic review, molecular data and key to the species of Creseidae from the Atlantic Ocean[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2014, 80(1): 35–42.
- [24] van der Spoel S. New forms of *Diacria quadridentata* (de Blainville, 1821), *Cavolinia longirostris* (de Blainville, 1821) and *Cavolinia uncinata* (Rang, 1829) from the Red Sea and the East Pacific Ocean (Mollusca, Pteropoda)[J]. *Beaufortia*, 1971, 19(243): 1–20.
- [25] van der Spoel S, Bleeker J, Kobayasi H. From *Cavolinia longirostris* to twenty-four *Diacavolinia* taxa, with a phylogenetic discussion (Mollusca, Gastropoda)[J]. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 1993, 62(3): 127–166.
- [26] Tesch J J. The thecosomatous pteropods. I. The Atlantic[J]. Dana Report, 1946, 28: 1–82.
- [27] Tesch J J. The thecosomatous pteropods II. The Indo-Pacific[J]. Dana Report, 1948, 30: 1–45.
- [28] Maas A E, Blanco-Bercial L, Lawson G L. Reexamination of the species assignment of *Diacavolinia* pteropods using DNA barcoding[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53889.
- [29] 李海涛, 何薇, 周鹏, 等. 伶鼬榧螺(*Oliva mustelina*)的分子鉴定及其形态变异[J]. 海洋学报, 2015, 37(4): 117–123.

- Li Haitao, He Wei, Zhou Peng, et al. Molecular identification of *Oliva mustelina* and its morphological variation[J]. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(4): 117–123.
- [30] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294–299.
- [31] Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers[J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1994, 87(6): 651–701.
- [32] Xia Xuhua. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(7): 1720–1728.
- [33] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [34] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. *Systematic Biology*, 2012, 61(3): 539–542.
- [35] Darriba D, Taboada G L, Doallo R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 772.
- [36] Rampal J. Biodiversité et biogéographie chez les Cavoliniidae (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia, Euthecosomata). Régions faunistiques marine[J]. *Zoosystema*, 2002, 24(2): 209–258.
- [37] 陈钢. 海洋生物中的隐藏生物多样性与物种形成: 终生浮游生物悖论[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(S2): 68–76.  
Chen Gang. Cryptic biodiversity and speciation in marine populations: the holoplankton paradox[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2006, 45(S2): 68–76.
- [38] Havermans C, Nagy Z T, Sonet G, et al. DNA barcoding reveals new insights into the diversity of Antarctic species of *Orchomene sensu lato* (Crustacea: Amphipoda: Lysianassoidea)[J]. *Deep Sea Research II: Topical Studies in Oceanography*, 2011, 58(1/2): 230–241.
- [39] Wall-Palmer D, Burrige A K, Goetze E, et al. Biogeography and genetic diversity of the atlantid heteropods[J]. *Progress in Oceanography*, 2018, 160: 1–25.
- [40] 刘泽. 鸟类线粒体假基因研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2005.  
Liu Ze. Study of numt sequences among birds[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2005.

## Taxonomy and DNA barcoding in genera *Cavolinia* and *Diacavolinia* from the Indian Ocean and Northwest Pacific Ocean

Li Haitao<sup>1</sup>, He Jing<sup>1</sup>, Jiang Chongchen<sup>1</sup>, Chen Zhiyun<sup>2</sup>, Zhou Peng<sup>1</sup>

(1. South China Sea Environmental Monitoring Center, Ministry of Natural Resources of the People's Republic of China, Guangzhou 510300, China; 2. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** Some so-called circumglobal and/or circumpolar marine species are proved to be complexes of cryptic species with restricted distributions by molecular analyses. These phenomena imply that marine species diversity has been underestimated. In this study we use shell morphological characteristics together with mitochondrial COI and 16S rRNA gene sequences in order to study the taxonomy and to identify species of genera *Cavolinia* and *Diacavolinia* in family Cavoliniidae from the Indian Ocean and Northwest Pacific Ocean. Our results showed that the species delimitation of *Diacavolinia* is not supported by molecular analyses, those morphospecies (*D. grayi*, *D. vanutrechtii*, *D. pacifica*, *D. elegans*, *D. angulosa*, etc.) with distinct morphology from northwestern Pacific are a single species, namely *D. longirostris*. The subdivision of subspecies and/or forms for *C. uncinata* could not be confirmed by DNA evidence. Phylogenetic analysis of COI revealed two independent geographical lineages for *C. uncinata*, *C. globulosa* and *D. longirostris* respectively, suggesting that these morphospecies may harbour cryptic diversity. Nuclear mitochondrial pseudogene sequences of COI were detected from most individuals of *D. longirostris*, which can affect the analysis of DNA barcoding.

**Key words:** *Cavolinia*; *Diacavolinia*; taxonomy; COI; 16S rRNA