

# 基于形态学和 16S rRNA 基因序列的 轮螺科面盘幼虫物种鉴定\*

李海涛 周鹏 何静 黄彬彬 陈凯彪

(国家海洋局南海环境监测中心 广州 510300)

**摘要** 轮螺科(Architectonicidae)是一类成体螺壳右旋而面盘幼虫螺壳左旋的腹足类,其面盘幼虫在国内一直被误定为强卷螺属(*Agadina*)种类,归在蛎螺科(Limacinidae)中。本文基于线粒体 16S rRNA 基因序列和胚壳的形态特征,对轮螺科面盘幼虫进行了物种鉴定。结果表明,根据胚壳壳顶和脐孔的形态特征,面盘幼虫可大致分为 2 种明显不同的形态类型:形态类型 I 的个体壳扁,壳顶凹陷,脐孔形状规则,圆而深;形态类型 II 的个体壳顶突出,脐孔形状不规则,浅或深,肛区龙骨有或无。GMYC(Generalized Mixed Yule Coalescent)和 ABGD(Automatic Barcoding Gap Discovery)分析显示,轮螺科面盘幼虫 16S rRNA 基因的 50 种单倍型形成 19 个分子可操作分类单元(molecular operational taxonomic units, MOTUs),同一 MOTU 的幼虫具有相同的胚壳形态。其中,11 个 MOTUs 中的幼虫属于形态类型 I,8 个 MOTUs 中的幼虫属于形态类型 II。此外,不同 MOTUs 的面盘幼虫,其软体部黑色幼体器官(Black Larval Organ)的位置和大小也不同。根据研究结果推测,轮螺面盘幼虫的形态具有种或属特异性。轮螺科面盘幼虫单倍型形成的 MOTU 数量明显多于国内目前已记录的物种数,其种类多样性可能被低估。基于 16S rRNA 序列能直接鉴定到种的仅 *Psilaxis radiatus* 和配景轮螺(*Architectonica perspectiva*)2 种。本文也从分子水平订正了国内长期以来的分类错误。

**关键词** 轮螺科(Architectonicidae); 面盘幼虫; 形态学; 16S rRNA 基因; 物种鉴定

中图分类号 Q959.212 doi: 10.11693/hyhz20180700166

物种的分类学特征通常基于成体来描述。因此,对具有复杂生活史的海洋生物来说,依据形态特征来鉴定其幼体或幼虫是极为困难的(Pradillon *et al.*, 2007; Puillandre *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2013)。这是因为近缘种的幼体在形态上十分相似不易区分,而且我们对于海洋无脊椎动物的幼体也缺乏了解(Levin, 1990)。基于分子生物学的物种鉴定技术(如 DNA 条形码)克服了对形态学的过度依赖(林森杰等, 2014),能实现对不同发育阶段标本的鉴定(Barber *et al.*, 2006; Puillandre *et al.*, 2009),是传统分类学和物种鉴定的重要补充。

自然界中绝大多数腹足类的螺壳是右旋的(dextral),螺壳左旋(sinistral)的种类较少。蛎螺科

(Limacinidae)的蛎螺属(*Limacina*)种类为中国海常见的螺壳左旋的腹足纲浮游动物。这是一类个体微小,终生营浮游生活的腹足类。Tesch(1946)将一类与蛎螺属具有相似左旋螺壳的浮游软体动物命名为强卷螺属(*Agadina*),归到蛎螺科之下。同时, Tesch(1946)也认识到 *Agadina* 并非为真正的翼足类(Pteropod),推测这类动物可能是小塔螺科(Pyramidellidae)齿口螺属(*Odostomia*)种类的浮游幼虫。张福绥(1964)沿用了 Tesch(1946)的观点,将强卷螺属附于蛎螺科之下。后续的研究表明, Tesch(1946)所描述的强卷螺实为成体营底栖生活的轮螺科(Architectonicidae)的面盘幼虫(Robertson, 1964; Bieler, 1993)。然而,一些国内研究资料(徐兆礼, 2008; 罗文增等, 2016)仍将轮螺科的面

\*国家自然科学基金, 41606191号; 国家海洋局南海分局局长基金, 1705号。李海涛, 高级工程师, E-mail: haitaoli1981@126.com

收稿日期: 2018-07-07, 收修改稿日期: 2018-09-12

盘幼虫记为强卷螺。

轮螺科是一类在浮游面盘幼虫期胚壳左旋而成体螺壳右旋的特殊腹足类(Bieler, 1993)。鉴于轮螺科面盘幼虫左旋的螺壳极易识别, Robertson(1964)甚至认为仅通过面盘幼虫的形态特征即可将一些个体鉴定到属或种的水平。然而, 轮螺科种类较长的浮游幼体期(Robertson, 1964; Robertson *et al.*, 1970)以及繁多的种类(Bieler, 1993), 都增加了面盘幼虫的鉴定难度。另外, 国内对轮螺科的分类学研究也极其不足, 种类的组成信息还不够完善。本研究分析了南海及其周边海域轮螺科面盘幼虫的形态特征, 同时结合线粒体 16S RNA 基因序列对其进行物种鉴定, 更正了国内长期以来的分类错误, 研究结果可为今后轮螺科的分类学研究提供更多的基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验样品于 2014—2017 年采自南海及其周边海域(图 1), 采样区域大致可分为南海北部和吕宋海峡海域(N 区)及南海中南部海域(S 区)。使用大型浮游生物网(网径 0.505mm), 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, 样品经无水酒精固定后冰冻保存带回实验室, 体视镜下完成轮螺面盘幼虫的分选, 对每个个体进行编号并拍照。选取 66 个轮螺面盘幼虫(AL1—AL66)用于形态学和 DNA 序列分析, 同时选取了 3 个采自南海北部的配景轮螺 (*Architectonica perspectiva*) 成体(AD1—AD3)用于基因序列的分析, 标本的具体信息见表 1。

### 1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

采用碱裂解法(李海涛等, 2015)提取DNA, 提取幼虫DNA时对溶液体积稍作改动, NaOH和Tris-Cl的使用体积分别减少为45 $\mu$ L和5 $\mu$ L。首先使用引物 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')(Folmer, 1994)对线粒体COI基因片段进行扩增, 但成功率较低。因此最终使用引物 16sar-L(5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3')和 16sbr-H(5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3')(Simon *et al.*, 1994)扩增16S rRNA基因片段。

PCR反应体系总体积为50 $\mu$ L, 包括: 2 $\times$ buffer 25 $\mu$ L, dNTP 400 $\mu$ mol/L, 引物各0.3 $\mu$ mol/L, KOD FX 高保真PCR酶(TOYOBO公司)1.0 U, 模板DNA1  $\mu$ L, 加去离子水补足至50 $\mu$ L。PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性2min; 98 $^{\circ}$ C 变性15s, 53 $^{\circ}$ C 退火45s, 68 $^{\circ}$ C 延伸90s, 共35个循环; 最后68 $^{\circ}$ C 延伸10min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化, 然后进行双向测序, 测序引物与扩增引物相同。

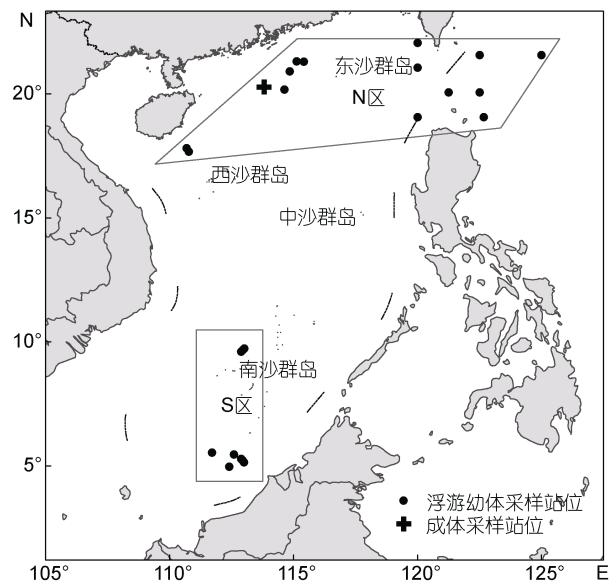


图 1 采样站点分布图  
Fig.1 Map of the sampling sites

### 1.3 数据分析

拼接、校对后的测序结果(单倍型序列), 连同 GenBank 中下载的轮螺科 16S rRNA 基因序列, 在 BioEdit 软件中进行多重序列比对。使用 MEGA 7 计算碱基的组成, 基于 Kimura 2-Parameter (K2P) 参数模型计算遗传距离, 并采用邻接法(neighbor-joining)以 *Micromelo undatus* (DQ093487) 为外群构建系统进化树, 可靠性经过 1000 次自展(bootstrap)检验, 支持率大于 70% 的在系统树中标出。

同时采用 GMYC(Generalized Mixed Yule Coalescent) 模型(Fujisawa *et al.*, 2013)和 ABGD(Automatic Barcoding Gap Discovery)方法(Puillandre *et al.*, 2012)进行分子可操作分类单元(molecular operational taxonomic units, MOTUs)估计。

表 1 标本和序列信息  
Tab.1 Specimen information and their sequence information

单倍型	样品编号	采样区域	GenBank 序列号	序列长度(bp)
H1	AL1	N 区	MH557974	384
H2	AL2、AL43	N 区	MH557975	379
H3	AL3、AL4、AL18、AL50	N 区	MH557976	391
H4	AL5	N 区	MH557977	389
H5	AL6	N 区	MH557978	387
H6	AL7	N 区	MH557979	390
H7	AL8	N 区	MH557980	403
H8	AL9	N 区	MH557981	391
H9	AL10	N 区	MH557982	391
H10	AL11	N 区	MH557983	391
H11	AL12	N 区	MH557984	382
H12	AL13	N 区	MH557985	391
H13	AL14	N 区	MH557986	388
H14	AL15	N 区	MH557987	391
H15	AL16、AL44	N 区、S 区	MH557988	391
H16	AL17	N 区	MH557989	380
H17	AL19	N 区	MH557990	389
H18	AL20	N 区	MH557991	392
H19	AL21、AL23、AL34、AL48	N 区、S 区	MH557992	389
H20	AL22	N 区	MH557993	389
H21	AL24	S 区	MH557994	390
H22	AL25	S 区	MH557995	384
H23	AL26	S 区	MH557996	383
H24	AL27	S 区	MH557997	383
H25	AL28	S 区	MH557998	383
H26	AL29	S 区	MH557999	383
H27	AL30	S 区	MH558000	387
H28	AL31	S 区	MH558001	383
H29	AL32、AL33、AL35、AL39、AL52、AD1—AD3	N 区、S 区	MH558002	387
H30	AL36	S 区	MH558003	386
H31	AL37	S 区	MH558004	387
H32	AL38	S 区	MH558005	387
H33	AL40	S 区	MH558006	386
H34	AL41	S 区	MH558007	386
H35	AL42、AL58、AL60、AL63、AL64	N 区、S 区	MH558008	391
H36	AL45	N 区	MH558009	389
H37	AL46	N 区	MH558010	381
H38	AL47	N 区	MH558011	387
H39	AL49	N 区	MH558012	390
H40	AL51	N 区	MH558013	389
H41	AL53	N 区	MH558014	391
H42	AL54	N 区	MH558015	391
H43	AL55	S 区	MH558016	391
H44	AL56	S 区	MH558017	392

续表

单倍型	样品编号	采样区域	GenBank 序列号	序列长度(bp)
H45	AL57	S 区	MH558018	391
H46	AL59	S 区	MH558019	383
H47	AL61	S 区	MH558020	391
H48	AL62	S 区	MH558021	389
H49	AL65	S 区	MH558022	391
H50	AL66	S 区	MH558023	389

注: AL1—AL66 为面盘幼虫编号; AD1—AD3 为配景轮螺(*A. perspectiva*)成体编号; N 区指南海北部和吕宋海峡海域; S 区指南海中南部海域

**1.3.1 GMYC 模型** 在分析之前, 将外群移除; 利用 BEAST v1.10.1(Drummond *et al*, 2007)构建超度量系统发育树; 采用 uncorrelated log-normal clock 模型,  $1 \times 10^8$  次 MCMC(Markov Chain Monte Carlo)分析, 1000 次 burn in; 利用 BEAST 软件包中的 TreeAnnotator 分析超度量系统发育树, 并生成最大谱系置信树; 随后用 Figtree v1.4.3 将最大谱系置信树转化为 APE(Analyses of Phylogenetics and Evolution) 识别的格式 (Newick); 最后利用 R 环境中的 “SPLITS” 软件包进行单阈值 GMYC 物种界定 (Fujisawa *et al*, 2013), 利用 gmyc 函数获得零模型与 GMYC 模型之间的似然比值、种-种群的转折点, 以及转折点对应的 MOTU 的数量。

**1.3.2 ABGD 方法** 样本在线提交至 ABGD 网站 (<http://www.abi.snv.jussieu.fr/pub/abgd/abgdweb.html>) 进行划分, 所有参数使用网络版本的默认值。

## 2 结果

### 2.1 形态特征

轮螺科面盘幼虫胚壳左旋, 壳面光滑, 无雕刻或生长纹。壳宽 0.8—1.2mm。螺层约 3 层。壳口近圆形, 多数个体的边缘外翻, 形成卷边。壳淡琥珀色, 半透明, 软体部可见, 壳口和脐孔处常呈褐色。具厣, 角质状。根据壳顶和脐孔的形态特征, 轮螺科面盘幼虫可分为两种明显不同的形态类型(Morphotype)。形态类型 (图 2a—图 2c): 壳扁, 壳顶凹陷(图 2c); 脐孔规则, 形成圆而深的空腔(图 2b); 缝合线颜色不明显(图 2a)或呈淡褐色。形态类型 (图 2d—图 2i): 壳顶明显凸起(图 2f); 脐孔不规则, 浅或深(图 2e, 图 2g—图 2i); 部分个体脐孔处有一肛区龙骨(Anal Keel, 图 2e 箭头示), 部分个体退化甚至完全缺失(图 2g); 缝合线大多呈明显的褐色(图 2d)。图 2h 所示这一新的脐孔形态类型较为少见, 仅发现 4 个标本。从腹面

观察(图 2b, 图 2e, 图 2g—图 2i), 可见软体部的黑色幼体器官(Black Larval Organ) (Bieler, 1993), 其位置和大小因个体而异。

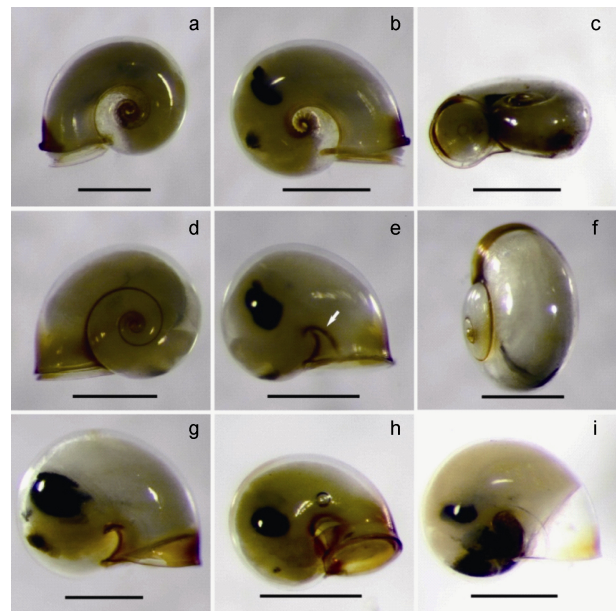


图 2 轮螺科浮游面盘幼虫的贝壳形态(比例尺=500 $\mu$ m)  
Fig.2 Shell morphology of architectonicid veliger larvae (Scale bars=500 $\mu$ m)

注: a—c, 形态类型 1 的贝壳形态; d—i, 形态类型 2 的贝壳形态; a—b, 单倍型 H5 对应的标本; c, 单倍型 H13 对应的标本; d—e, 单倍型 H2 对应的标本(e 中箭头示肛区龙骨); f—g, 单倍型 H11 对应的标本; h, 单倍型 H19 对应的标本; i, 单倍型 H27 对应的标本

### 2.2 序列分析

16sar-L 和 16sbr-H 引物能扩增所有轮螺科面盘幼虫和成体的 16S rRNA 基因。69 条 16S rRNA 基因序列共定义了 50 种单倍型(H1—H50, GenBank 登录号 MH557974—MH558023), 其中 6 种为共享单倍型, 3 个配景轮螺成体与 5 个面盘幼虫属同一单倍型 H29(表 1)。单倍型长度为 379—403bp(不含引物区), A、T、G、C 碱基的含量分别为 33.8%、

33.1%、17.9%和 15.2%，A+T 的含量明显高于 G+C 的含量。

### 2.3 分子可操作分类单元估计

本文获得的 50 种单倍型和 3 条来自 GenBank 的 16S rRNA 基因序列，采用 GMYC 模型和 ABGD 方法可划分为相同的 21 个 MOTUs，本文仅显示 GMYC

模型划分的结果(图 3)。其中，本文的 50 种单倍型和 *Psilaxis radiates*(AY081999)形成 19 个 MOTUs，另外两条 GenBank 中的序列各自形成一个独立的 MOTU。GMYC 模型和 ABGD 方法划分的 MOTUs 与形态鉴定的结果略有不同，MOTU08 和 MOTU09(FJ917251)同属一个形态种配景轮螺。

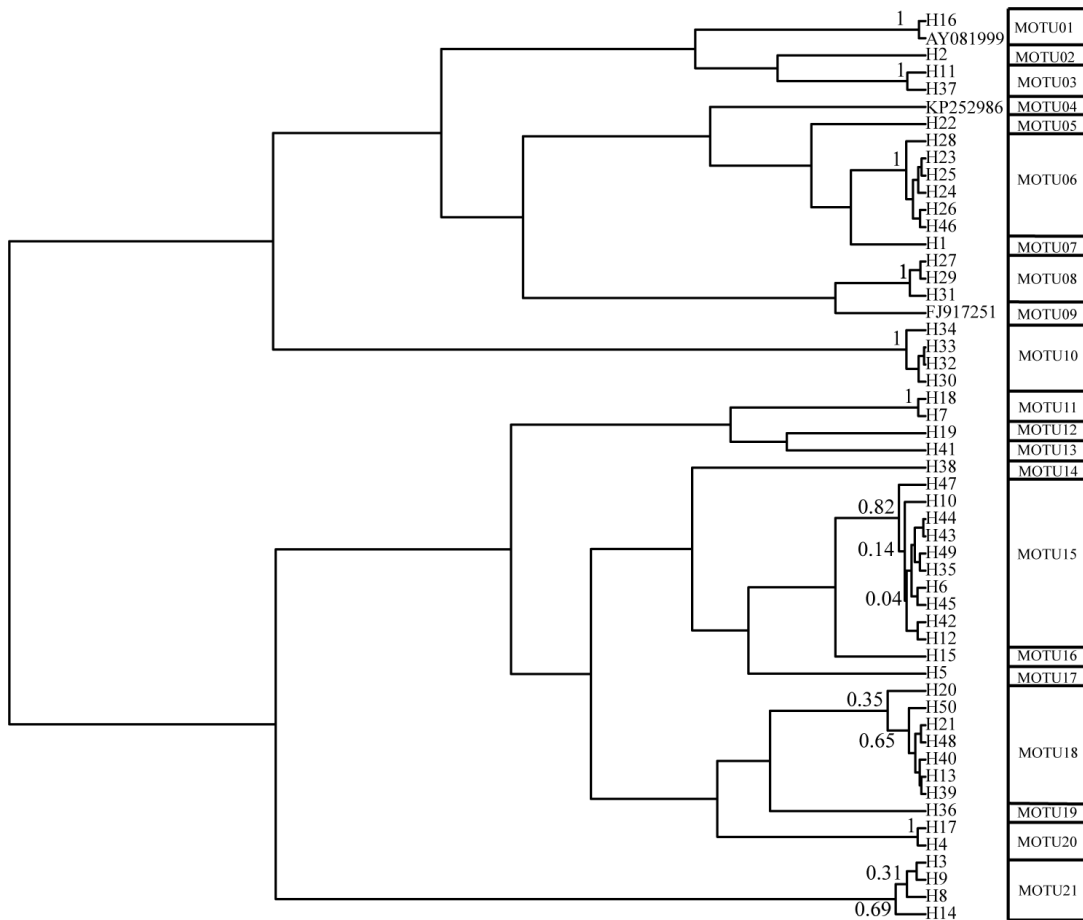


图 3 基于 GMYC 模型划分的 MOTUs 结果

Fig.3 MOTUs revealed in GMYC model

### 2.4 系统学分析、形态划分和物种鉴定

用本文获得 16S rRNA 基因的单倍型序列与 GenBank 中轮螺科的序列一起构建 NJ 系统进化树(图 4)。需要指出的是，由于 16S rRNA 基因片段较短以及单个基因的缘故，系统树可能无法反映各单倍型或物种间真实的系统发育关系，故轮螺科的系统发育关系不是本文的研究内容。

16S rRNA 基因的不同单倍型在系统树(图 4)中形成 2 个分支(A 和 B)，并获得较高的置信值。分支 A 包括 MOTUs 11—21，分支 B 包括 MOTUs 1—10。从面盘幼虫的形态特征来看，11 个 MOTUs 属于形态类

型 I；8 个 MOTUs 属于形态类型 II。形态类型 I 的标本中，仅 MOTUs 1—3 的部分个体存在肛区龙骨，这 3 个 MOTUs 聚为一支且具有很高的支持率(99%)，其余 MOTUs 的个体不具有这个结构。形态类型 II 中具有特殊脐孔形态(图 2h)的 4 个个体，共享单倍型 H19。MOTU08 和 MOTU05—07 的标本分属不同的形态类型，但它们却与同属(*Architectonica*)的 2 个种分别聚为一支。

从腹面观察，软体部的黑色幼体器官的位置和大小在不同的 MOTUs 中存在明显差异。分支 B 中形态类型 I 的个体(除 MOTU07 外)，在脐孔区存在一较

大的黑色幼体器官, 而分支 A 中相同贝壳形态的个体则全部没有(图 4)。MOTU08 的脐孔区也存在较大的黑色幼体器官, 而与之同属一个形态类型的 MOTU01—03 的标本中则未见(图 4)。MOTU05—07 与大轮螺(*A. maxima*)聚为一支(支持率 99%), 且这 3 个 MOTUs 的序列相似性较高, MOTU07 由于在脐孔区不存在黑色幼体器官而与 MOTU05 和 MOTU06 能区分开来。这也从形态上证实了单倍型 H1 被独立划分为一个 MOTU 的合理性。MOTU14(单倍型 H38)

标本采样时可能已经死亡, 其肌肉和内脏组织已降解并在壳内形成空腔, 其黑色幼体器官无法辨认(图 4)。

由于 GenBank 中轮螺科种类的参考序列极少, 仅单倍型 H16 能确定为 *Psilaxis radiates*, 该单倍型与参考序列(登录号 AY081999)仅存 1 个碱基的差异。同时, 根据配景轮螺成体的序列, 可将 MOTU08 确定为配景轮螺, 但 MOTU08 的 3 种单倍型与 GenBank 中已有的来自澳大利亚的配景轮螺序列(FJ917251)存在较大的遗传差异。本文获得的配景轮螺 3 种单倍型

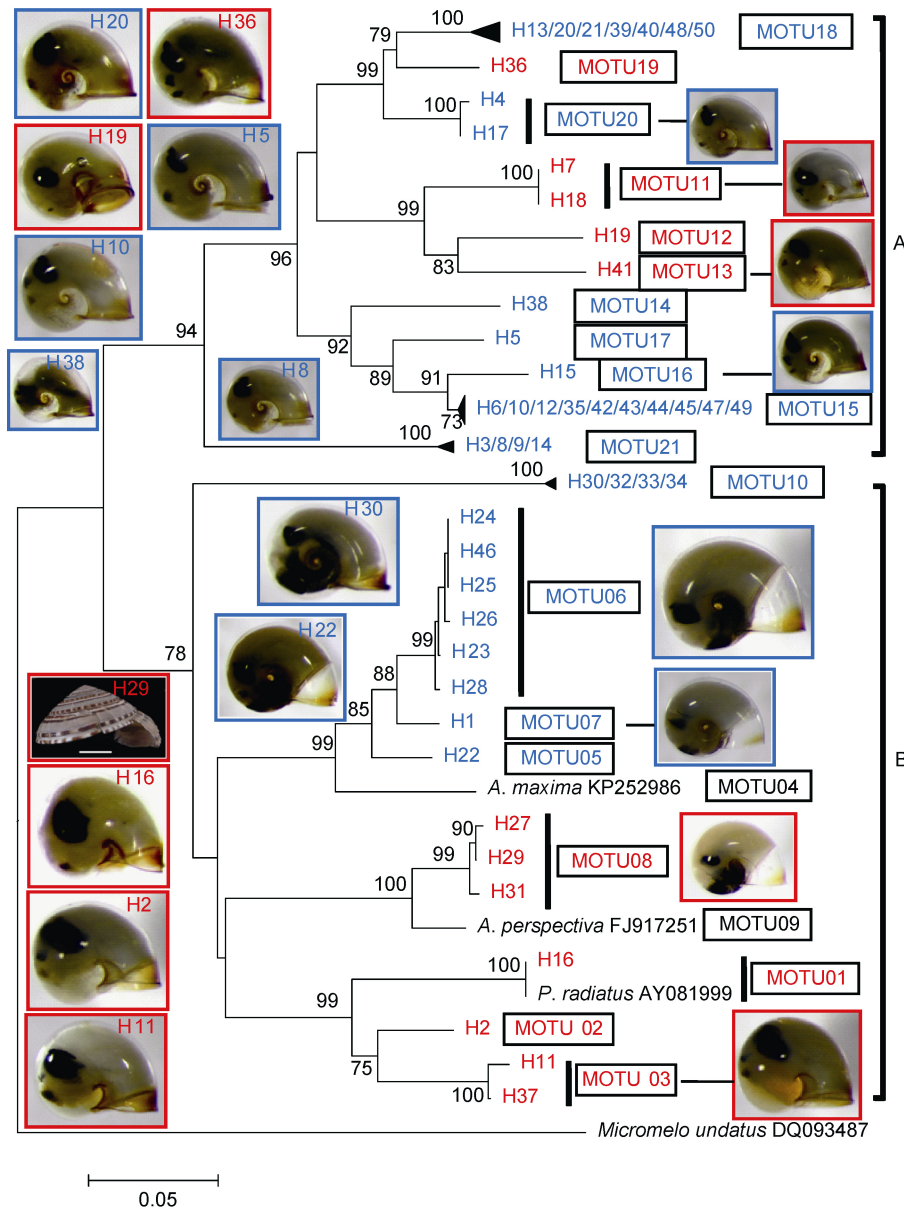


图 4 基于轮螺科面盘幼虫线粒体 16S rRNA 基因构建的系统发育树

Fig.4 The neighbor-joining tree based on mitochondrial 16S rRNA gene sequences of architectonicid veliger larvae  
 注: 蓝色单倍型编号、MOTUs 编号和图片对应于形态类型 I 的面盘幼虫; 红色单倍型编号、MOTUs 编号和图片对应于形态类型 II 的面盘幼虫和成体



遗传距离在 0.003—0.009 之间, 而它们与参考序列的遗传距离在 0.046—0.049 之间。轮螺科面盘幼虫 MOTUs 内的遗传距离在 0—0.024 之间, 平均值为 0.005; 各 MOTUs 间的遗传距离则在 0.033—0.359 之间, 平均值为 0.237。MOTUs 内和 MOTUs 间的遗传距离差异不明显。

### 3 讨论

轮螺成体和面盘幼虫的线粒体 16S rRNA 基因序列分析结果表明, 这类螺壳左旋的标本属于轮螺科浮游幼虫, 而非营终生浮游的其他腹足类。在 16S rRNA 基因系统树中, 同一 MOTU 内的个体呈现相同形态特征, 这表明面盘幼虫的壳顶、脐孔和缝合线颜色这些贝壳特征, 以及黑色幼体器官的位置和大小这些软体部特征, 可作为区分轮螺科不同属或种的分类依据。肛区龙骨具有一定的不稳定性, 同属单倍型 H2 的 2 个个体, 肛区龙骨的发达程度不同(图 2 和图 4); 同属 MOTU03 的单倍型 H11 和 H37, 前者肛区龙骨完全消失, 而后者具有微弱的肛区龙骨(图 2 和图 4)。同种的面盘幼虫具有相同的形态特征, 但不同种的面盘幼虫也可能具有相同的形态特征, 如 MOTU15—18 的个体(形态类型 I)在形态上就难以区分。

Robertson(1964)基于贝壳形态特征、个体大小、地理分布等多方面的因素考虑, 认为 Tesch(1946)所记录的“*Agadina* sp.”就是 *Psilaxis krebsii*(原文 *Philippia (Psilaxis) krebsii*)的幼虫。本文 MOTU03 的标本(图 2 和图 4), 其形态和大小与 Tesch(1946)描述的“*Agadina* sp.”亦十分相似, 且在系统树(图 4)中与 *P. radiatus* 聚为一支。但 Tesch(1946)所记录的“*Agadina* sp.”是否可确定为 *P. krebsii* 的幼虫, 可能还需进一步核实。毕竟不同种类的面盘幼虫形态可能非常相似, 特定海域的种类组成也可能未被完全了解。我们推测 MOTU05—07 也应属于轮螺属, 然而它们与配景轮螺的幼虫具有完全不同的形态特征。Robertson(1964)也观察到轮螺属面盘幼虫的肛区龙骨或不明显或微弱或是完全消失。可见, 轮螺属种类可能具有复杂多样的幼虫发育形式。若结合轮螺科成体的形态特征来研究浮游幼虫的形态发育, 也许更能揭示幼体形态特征的分类价值。如裸鳃目(Nudibranchia)枝鳃海牛属(*Dendrodoris*)不同种类的面盘幼虫具有相异的形态, 幼虫的形态特征能用于种类的区分(Hirose *et al.*, 2015)。

Bieler(1993)对印度-太平洋的轮螺科进行了较为

系统的分类学研究, 共记录了 11 属 88 种。而目前我国被记录的种类仅包括轮螺属和太阳螺属(*Heliacus*)共计 11 种(刘瑞玉, 2008), 种类数明显偏少。*P. radiatus* 的分布区域就包括我国南海北部近岸海域(Bieler, 1993), 但国内未见对该属或该种的记录。这表明国内对轮螺科的取样和分类尚显不足。可以推测, 本文涉及的面盘幼虫中可能还包括其他在我国未被记录的种类。不过, 轮螺浮游幼虫与成体的分布范围是否一致目前尚无法证实。轮螺长达数周至 6 个月的浮游幼体期使其能在海流的作用下漂流数千公里, 海流是影响这类幼虫分布的主要因素(Robertson, 1964; Robertson *et al.*, 1970; Scheltema *et al.*, 1996)。徐兆礼(2008)基于东海的环境数据认为轮螺科面盘幼虫(“强卷螺”)适应较低的温度, 南海的采样结果则不同, 5—7 月南海中南部可采集到大量幼虫(未全部测序), 南海北部反而较少。基于特定海域或小尺度范围的数据分析, 可能无法得出准确的物种环境适应类型的结论。

成体参考序列的获得是对幼体进行 DNA 鉴定的前提。由于 GenBank 数据库中轮螺科的参考序列很少, 大多数种类无法通过 DNA 序列鉴定到种或属。随着 DNA 数据库的不断丰富和完善, DNA 鉴定技术(DNA 条形码技术)将越发显示其巨大的应用价值。DNA 序列是联系生物成体和幼体的桥梁, 能实现已知成体和未知幼体的一一对应和匹配(Baldwin *et al.*, 2009)。即使成体序列未知, 在成体难以获取的情况下, 通过其幼体来评估多样性也是一种有效的手段(Barber *et al.*, 2006)。

### 参 考 文 献

- 刘瑞玉, 中国科学院海洋研究所, 2008. 中国海洋生物名录. 北京: 科学出版社, 493—494
- 李海涛, 何 薇, 周 鹏等, 2015. 伶仃榧螺(*Oliva mustelina*)的分子鉴定及其形态变异. 海洋学报, 37(4): 117—123
- 张福绥, 1964. 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. 海洋科学集刊, 5: 125—226
- 林森杰, 王 路, 郑连明等, 2014. 海洋生物 DNA 条形码研究现状与展望. 海洋学报, 36(12): 1—17
- 罗文增, 劳柏瑄, 2016. 台湾海峡浮游翼足类群聚之季节动态. 生物多样性, 24(7): 757—766
- 徐兆礼, 2008. 东海浮游翼足类(Pteropoda)环境适应类型的划分. 海洋与湖沼, 39(4): 381—387
- Baldwin C C, Mounts J H, Smith D G *et al.*, 2009. Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean *Phaeoptyx* and *Astrapogon* (Teleostei: Apogonidae) with comments on identification of adult *Phaeoptyx*. Zootaxa, 2008: 1—22
- Barber P, Boyce S L, 2006. Estimating diversity of Indo-Pacific

- coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae. *Proceedings of the Royal Society B*, 273(1597): 2053—2061
- Bieler R, 1993. Architectonicidae of the Indo-Pacific (Mollusca, Gastropoda). *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*, 30: 1—376
- Drummond A J, Rambaut A, 2007. BEAST: bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214
- 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
- Fujisawa T, Barraclough T G, 2013. Delimiting species using single-locus data and the generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data Sets. *Systematic Biology*, 62(5): 707—724.
- Hirose M, Hirose E, Kiyomoto M, 2015. Identification of five species of *Dendrodoris* (Mollusca: Nudibranchia) from Japan, using DNA barcode and larval characters. *Marine Biodiversity*, 45(4): 769—780
- Ko H L, Wang Y T, Chiu T S *et al*, 2013. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding. *PLoS One*, 8(1): e53451
- Levin L A, 1990. A review of methods for labeling and tracking marine invertebrate larvae. *Ophelia*, 32(1—2): 115—144
- Pradillon F, Schmidt A, Peplies J *et al*, 2007. Species identification of marine invertebrate early stages by whole-larvae *in situ* hybridisation of 18S ribosomal RNA. *Marine Ecology Progress Series*, 333: 103—116
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S *et al*, 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8): 1864—1877
- Puillandre N, Strong E E, Bouchet P *et al*, 2009. Identifying gastropod spawn from DNA barcodes: possible but not yet practicable. *Molecular Ecology Resources*, 9(5): 1311—1321
- Robertson R, 1964. Dispersal and wastage of larval *Philippia krebssii* (Gastropoda: Architectonicidae) in the north Atlantic. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 116: 1—27
- Robertson R, Scheltema R S, Adams F W, 1970. The feeding, larval dispersal, and metamorphosis of *Philippia* (Gastropoda: Architectonicidae). *Pacific Science*, 24(1): 55—65
- Scheltema R S, Williams I P, Lobel P S, 1996. Retention around and long distance dispersal between oceanic islands by planktonic larvae of benthic gastropod mollusca. *American Malacological Bulletin*, 12: 67—75
- Simon C, Frati F, Beckenbach A *et al*, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651—701
- Tesch J J, 1946. The thecosomatous pteropods I. the Atlantic. *Dana Report*, 28: 1—82

## SPECIES IDENTIFICATION OF ARCHITECTONICID VELIGER LARVAE BASED ON MORPHOLOGICAL AND MITOCHONDRIAL 16S RRNA GENE

LI Hai-Tao, ZHOU Peng, HE Jing, HUANG Bin-Bin, CHEN Kai-Biao

(South China Sea Environmental Monitoring Center, State Oceanic Administration, Guangzhou 510300, China)

**Abstract** Species of the family Architectonicidae are a group of gastropods that shells of adults are dextral but the protoconchs of veliger larvae are sinistral. The architectonicid veliger larvae have been mis-identified as *Agadina* species (Limacinidae) for more than a half century in China due to their sinistral shells. In this study, we analyzed the protoconch morphological characteristics of veliger larvae and sequenced the partial mitochondrial 16S rRNA gene from 66 veliger larvae and three adults of Architectonicidae to clarify the taxonomic debate. The veliger larvae can be divided into two morphotypes in morphology. The protoconchs of morphotype I are characterized by the sunk apex and the round and deep umbilicus. The protoconchs of morphotype II are distinguished from those of morphotype I by their raised apex and retuse umbilicus. The 50 haplotypes derived from the 16S rRNA gene were grouped into 19 distinct molecular operational taxonomic units (MOTUs) using GMYC and ABGD analyses. Larvae of morphotype I could be assigned into 11 MOTUs, while the 8 remaining MOTUs had shell characteristics of morphotype II. The position and size of black larval organs are also distinct among different MOTUs. These results suggest that the morphological characteristics of shells and black larval organs are valuable for species and/or genus recognition. However, only a few haplotypes were identified to the species level because of the insufficient reference sequences in GenBank, and the biodiversity of Architectonicidae could be underestimated in China.

**Key words** Architectonicidae; veliger larvae; morphology; 16S rRNA gene; species identification