

基于 18S rRNA 的中国大陆沿海石磺科贝类分类的初步分析

吴文健, 沈斌, 陈诚, 沈和定*, 魏峦峦, 王玲, 李凯

(上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306)

摘要: 对采自上海崇明、福建宁德、海南海口等沿海地区 9 个群体的石磺科贝类进行外部形态特征差异分析和内部结构比较, 在初步分类基础上利用核糖体小亚基 18S rRNA 基因部分序列对 9 个群体进行系统发育分析, 以菊花螺为外群, 结合 GenBank 上石磺科 4 个 18S rRNA 基因序列构建系统发生树来探讨我国大陆沿海石磺科属种间的亲缘关系。结果显示: 我国石磺科贝类南方沿海种类多于北方沿海; 除报道的瘤背石磺 (*Onchidium struma*) 和石磺 (*O. verruculatum*) 外, 可能还有新记录 5 种: *Onchidium* 属 1 种、*Platevindex* 属 2 种、*Peronia* 属 1 种和 *Paraoncidium* 属 1 种。分子系统发生树显示, 我国大陆沿海石磺科 9 个群体可分为 4 个亚群, 分别为 *Onchidium*、*Platevindex*、*Paraoncidium*、*Peronia*, 其中 *Peronia* 亚群的置信度较高; *Onchidium verruculatum* 应更名为 *Peronia verruculata*。

关键词: 石磺科; 初步分类; 18S rRNA; 系统发育

中图分类号: Q959.212.6; Q349.1; Q951.3 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)04-0381-06

Preliminary Classification and Phylogenetic Relationship Among Onchidiidae in China Inferred from 18S rRNA Partial Sequence

WU Wen-Jian, SHEN Bin, CHEN Cheng, SHEN He-Ding*, WEI Luan-Luan, WANG Ling, LI Kai

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: As a nutritious mollusk living in the intertidal zone, Onchidiidae has a significant value for biological research. Nine populations were collected from the costal areas such as Chongming (Shanghai), Ningde (Fujian), Haikou (Hainan) in this study. Through the study of anatomy and other methods to investigate the major category characteristics, the nine populations were preliminary classified. By sequencing segments of 18S rRNA gene and constructing phylogenetic trees using these nine populations and four other 18S rRNA gene sequences from GenBank, with *Siphonaria* as an outgroup, we analyzed the phylogeny of Onchidiidae in mainland China. The trees were used for discussing the relationship between the populations of the Onchidiidae in this study. The results showed that the southern coast has more populations than the northern coast in China. Besides two known species, *Onchidium struma* (JZH) and *O. verruculatum* (FJZ & HNZ), five new recorded species may exist: *Onchidium*(1), *Platevindex*(2), one *Peronia*(1) and *Paraoncidium*(1). The phylogenetic trees indicated that the nine populations can be divided into four subgroups, *Peronia*, *Onchidium*, *Platevindex* and *Paraoncidium*, and *Peronia* has the highest confidence level in clustering. *Onchidium verruculatum* (FJZ & HNZ) should be *Peronia verruculata*.

Key words: Onchidiidae; Preliminary classification; 18S rRNA; Phylogenetic

石磺科(Onchidiidae)隶属软体动物门(Mollusca)腹足纲(Gastropoda)有肺亚纲(Pulmonata)缩眼目(Systellommatophora)(Bouchet et al, 2005)石磺超科(Onchidioidea), 为栖息于滩涂及红树林区的一群潮间带和潮上带贝类, 广泛分布于极地外的世界各地

(Stringer, 1969)。我国海岸线绵长、南北跨度大, 沿海岛屿众多、气候多样, 贝类物种丰富, 石磺科贝类理应有丰富的类群。由于分类研究资料缺乏, 国内未见石磺科系统分类研究的文献。目前我国大陆已报道的石磺科贝类仅 *Onchidium struma*(Qiu,1991)

收稿日期: 2009-12-16; 接受日期: 2010-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972259); 上海市教委重点学科项目(J50701)

*通讯作者(Corresponding author), 沈和定(1964-), 男, 浙江奉化人, 教授, 博士, Tel: 021-61900446, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

第一作者简介: 吴文健(1983-), 男, 硕士, 主要研究方向: 海洋生物分子遗传学, E-mail: wenjianchina@163.com

和 *Onchidium verruculatum* (Cai, 1995) 两种。

石磺科贝类既是海洋和陆地之间的过渡种, 又是有肺亚纲中少有的具有浮游幼虫的种类, 其与腹足纲其他科、目之间的分类学关系对研究腹足纲的系统演化有着举足轻重的作用。石磺科贝类不仅具有重要的科研价值(Huang & Zhang, 2004; Huang et al, 2004; Shen et al, 2004), 而且具有很高的营养价值和药用价值, 很早就被我国沿海居民作为美食和药用贝类, 故石磺又名“土海参”、“状元鳖”、“土鲍”、“涂龟”(Shen et al, 2006)。近年来海岸滩涂被大肆开发利用, 海岸环境污染日益严重, 近海物种数量急剧减少(Shu et al, 2002; Ji et al, 2000)。石磺科贝类对环境污染十分敏感(Qiu, 1991), 需加大这一重要滩涂贝类资源的增殖保护力度, 有关我国大陆沿海石磺科贝类系统采集和分类研究工作也急需开展。

核糖体基因簇中的 18S 基因是近年来研究海洋贝类分类中利用较多的序列之一(Carapelli et al, 2000)。核糖体基因簇由编码区(18S、5.8S 和 28S)和

间隔区(ITS1、ITS2 和 ETS)组成, 编码区受到的选择压力较大, 序列保守; 18S rRNA 基因长约 1800 bp, 具有两种高保守区和高变异区区域, 高保守区适合研究较高阶元的系统发生(Hwang & Kim, 1999)。本研究对我国大陆沿海地区的石磺进行了零星采集, 利用 18S rRNA 基因序列分析和形态学分析相结合的方法对我国大陆石磺科的分类状况和系统发育进行了初步研究, 以期促进我国石磺科贝类系统分类工作的全面开展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2007年6月至2008年10月分别在上海崇明、福建宁德、海南海口、文昌等地采集石磺, 经75%乙醇固定、冰箱冷藏保存备用。样品群体名称、采集地点、采集时间、生活环境、潮区如表1。

1.2 形态学分析

观察石磺的外部形态, 用游标卡尺测量其体长, 对石磺进行活体解剖, 在解剖镜下细致观

表 1 石磺群体名称及简称、采集地点、时间、潮区和生活环境

Tab. 1 Population and code name, collecting location, collecting date, tidal zone and habitation

群体 Population	简称 Code name	采集地点 Collecting location	采集时间 Collecting date	样本数 Samples size	潮区 Tidal zone	生活环境 Habitation
江浙沪	JZH	上海崇明	2007-06	2112	潮上带、高潮区	泥滩、芦苇丛
福建硬黑	FJH	福建宁德	2008-10	957	潮上带、高潮区	泥滩、石滩
福建软红	FJR	福建宁德	2008-10	562	高、中潮区	泥滩、石滩
福建蓝紫	FJZ	福建宁德	2008-10	52	中、低潮区	沙石滩
海南硬黑	HNH	海南海口	2008-10	277	潮上带、高潮区	泥滩、红树林
海南软红	HNR	海南文昌	2008-10	522	高、中潮区	泥滩、红树林
海南蓝紫	HNZ	海南海口	2008-10	122	中、低潮区	沙石滩
海南腹足桔黄	HNJ	海南海口	2008-10	59	高潮区	红树林
海南桔黄(体硬)	HNY	海南海口	2008-10	102	高潮区	红树林

察其消化系统、生殖系统和呼吸系统的形态结构, 测定肠道长度, 并进行记录和统计分析。

1.3 基因组 DNA 提取

取石磺腹足肌肉 50~100 mg, 剪碎, 加入 600 μ L 裂解液(0.5 mol/L pH8.0 EDTA 120 μ L、1 mol/L pH8.0 Tris-HCl 30 μ L、10% SDS 120 μ L、5 mol/L NaCl 10 μ L、20 mg/mL proK 10 μ L、ddH₂O 310 μ L) 于 57°C 水浴中消化 3~4 h, 至组织块完全裂解, 裂解液澄清呈透明状; 依次用等体积的 Tris 饱和酚、酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)、氯仿: 异戊醇(24:1)抽提, 取上清, 于 2 倍体积无水乙醇沉淀;

沉淀经 70%乙醇冲洗 2 次, 室温干燥, 100 μ L TE、4°C 过夜溶解, 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 所得 DNA -20°C 保存备用。每个群体做 7 个重复。

1.4 18S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序

所用引物根据 GenBank 上相关 18S rRNA 基因完整序列(AY427521、AY427522)经软件 Primer Premier 5.0 设计, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列为:

18S F1(5'-GCTCATTAATCAGTCGAGG-TTC-3')

18S R1(5'-GGGTGAGTTTTCCCGTGTTG-

AGT-3')

18S F2(5'-ACCATAAACGATGCCATCTAGC-3')

18S R2(5'-TACCTTCCCACCCGGCTTCTAG-3')

PCR 扩增使用常规方法, PCR 反应体系为: 反应总体积为 50 μ L(dNTPs 0.25 mmol/L、引物 0.5 μ mol/L、MgCl₂ 2 mmol/L、10 \times 缓冲液 5.0 μ L、Taq 酶 1U)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56.7 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 扩增产物 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物由上海华大生物基因有限公司纯化后直接双向测序。

1.5 数据分析

首先利用 Bioedit 对 18S rRNA 序列进行对位排列, 辅以手工校正。用 MEGA 4.0 软件计算两两群体之间的遗传距离。以菊花螺(*Siphonaria*)18S rRNA 基因序列(GenBank 登录号: AY427523)为外群, 结合 GenBank 上检索到的 4 种石磺科贝类(*Onchidella* 属 3 种, *Onchidium* 属 1 种)的 18S rRNA 基因序列(收录号分别为: DQ093441、AY427521、AY427522、X70211)。用 PAUP4.0 beta10(Swofford, 2002)构建邻接树(Neighbor-joining tree, NJ)、最大简约树(Maximum parsimony tree, MP)。用 MrBayes v 3.1.2(Huelsenbeck, 2001)构建贝叶斯树(Bayesian tree)。NJ 和贝叶斯法根据由 Modeltest 3.7 计算得到的结果设置参数, NJ 树的节点支持率用 1000 次自举检

验。构建贝叶斯树时, 同时建立 4 个马尔可夫链: 3 条热链和 1 条冷链, 以随机树为起始树, 共运行 1000 万代, 每 1000 代抽样 1 次。MP 树的构建, 用启发式搜索(Hillis, 1996)寻找最简约树, 参数设定为 1000 次序列的随机增加; 所有数据被设定为无序未加权状态, 最后系统树分支在统计学上的可靠性由 1000 次自举检验(Felsenstein, 1985)进行检验。

2 结果与分析

2.1 石磺科各群体形态及解剖主要特征比较

对石磺科各群体进行形态观察和内部解剖, 其主要形态分类特征(身体颜色、肠式、树枝状鳃有无、恋矢分叉情况等)如表 2。

2.2 18S rRNA 基因测序结果及序列特征分析

各石磺群体的测序片段经 Bioedit 软件多序列对比, 删去首尾部分模糊序列, 反向序列转换倒置拼接后, 获得长度为 1642 bp 的同源序列。序列已递交 GenBank, 收录号: FJ843069~FJ843075。

利用 MEGA 4.0 软件统计各群体的碱基(T/C/A/G)组成, 9 个群体 18S rRNA 基因的 T、C、A、G 的平均含量分别为 23.8%、24.3%、23.0%、28.9%。G+C 含量(53.2%)略大于 A+T 含量(46.8%), 与其他腹足类动物的碱基组成相似(Kano et al, 2002)。通常认为, 如果转换/颠换小于 2.0, 即表明基因突变已经达到饱和(Knight & Mindell, 1993)。本研究中, 颠换/转换的平均值为 1.6, 表明序列已经达到突变饱和。

表 2 石磺科各群体主要形态分类特征
Tab. 2 Body color and primary dissect features of Onchidiidae populations

群体(简写) Population(Abbrev)	样本数 Samples size	身体颜色 Body colour		肠 Intestines		树枝状鳃 Branchiae	恋矢分叉 Penis diverge	阴茎附属腺 Accessory penial gland	直肠腺 Tubular rectal gland
		背部 Notum	腹足 Foot	肠式 Gut type	与体长比例 Proportion of body				
江浙沪(JZH)	30	灰黄色	灰黄色	II	2.15	无	无	无	无
福建硬黑(FJH)	30	黑褐色	黑灰色	II	2.31	无	有	无	有
福建软红(FJR)	30	暗黄褐色	红棕色	II	3.25	无	有	有	无
福建蓝紫(FJZ)	30	灰绿色	蓝紫色	II	1.71	有	有	有	无
海南硬黑(HNH)	30	黑褐色	黑灰色	II	2.92	无	有	无	有
海南软红(HNR)	30	暗黄褐色	红棕色	II	2.82	无	有	有	无
海南蓝紫(HNZ)	30	灰绿色	蓝紫色	II	1.81	有	有	有	无
海南腹足桔黄(HNJ)	30	黑褐色	桔黄色	III	2.71	无	有	无	有
海南桔黄硬体(HNY)	30	黑褐色	桔黄色	II	2.42	无	有	无	有

2.3 各群体间遗传距离的计算结果及分子系统树的构建

比较各群体 18S rRNA 基因的碱基变化和序列差异, 采用 Kimura 2-parameter 方法计算群体间的遗传距离见表 3, 3 种方法构建的系统发育树如图 1、图 2 和图 3。

2.4 石磺科贝类的系统发生分析

结合至今已公开的石磺科分子数据, 3 种方法

构建的系统发生树分析结果(图 1~3)显示: 石磺科贝类大致可以分成 5 个亚群: 第一亚群包括 HNZ、FJZ 和 *Peronia verruculata*, 该亚群的分群置信度较高; 第二亚群包括 HNR、FJR 和 HNH; 第三亚群包括 JZH、HNY、HNJ; 第四亚群为 FJH (结合形态特征比较结果); 第五亚群为 *Onchidella* 属种。从 NJ 树分析结果可以看出 *Onchidium* 属与 *Platevindex* 属的亲缘关系接近。

表 3 石磺科各群体 18S rRNA 基因序列的转换/颠换(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)
Tab. 3 Transitions/transversions (upper diagonal) and genetic distances (lower diagonal) of Onchidiidae by 18S rRNA gene sequences

群体 Population	JZH	FJH	FJR	FJZ	HNH	HNR	HNZ	HNJ	HNY
JZH	***	1/2	5/3	4/2	4/3	5/3	4/2	1/0	0/0
FJH	0.0018	***	5/3	3/4	3/3	5/3	3/4	0/2	1/2
FJR	0.0049	0.0049	***	3/1	2/0	0/0	3/1	4/3	5/3
FJZ	0.0037	0.0043	0.0024	***	4/1	3/1	0/0	3/2	4/2
HNH	0.0043	0.0037	0.0012	0.0031	***	2/0	4/1	3/3	4/3
HNR	0.0049	0.0049	0.0000	0.0024	0.0012	***	3/1	4/3	5/3
HNZ	0.0037	0.0043	0.0024	0.0000	0.0031	0.0024	***	3/2	4/2
HNJ	0.0006	0.0012	0.0043	0.0031	0.0037	0.0043	0.0031	***	1/0
HNY	0.0000	0.0018	0.0049	0.0037	0.0043	0.0049	0.0037	0.0006	***

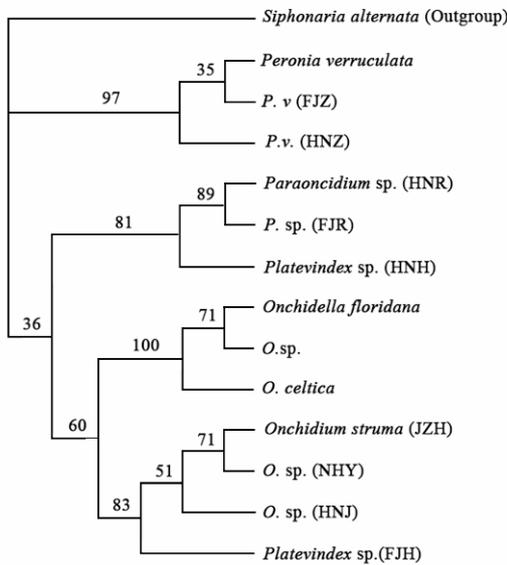


图 1 基于 18S rRNA 基因序列构建的石磺科贝类的 NJ 树(图中数字为 1000 次自展检验置信值)

Fig. 1 The neighbor-joining tree resulting from analysis of the 18S rRNA gene sequences of Onchidiidae (Numbers on nodes corresponding to percentage bootstrap values for 1000 replicates)

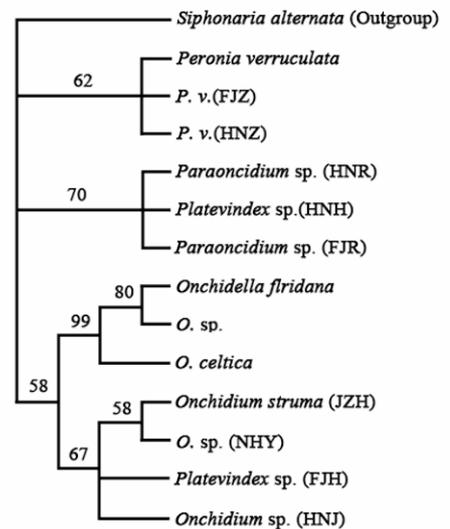


图 2 基于 18S rRNA 基因序列构建的石磺科贝类的 MP 树(图中数字为 1000 次自展检验置信值)

Fig. 2 The maximum parsimony tree resulting from analysis of the 18S rRNA gene sequences of Onchidiidae (Numbers on nodes corresponding to percentage bootstrap values for 1000 replicates)

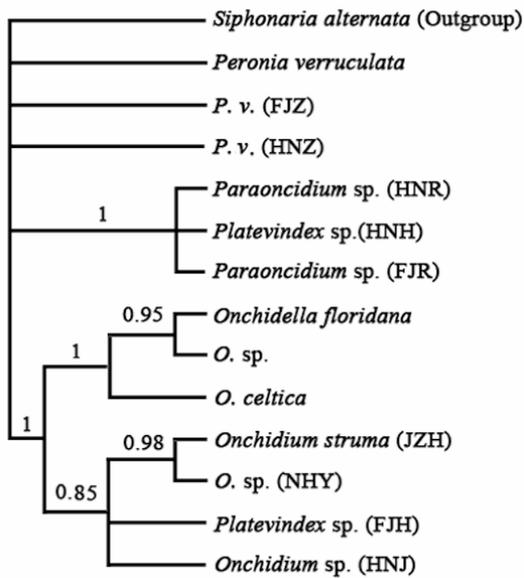


图 3 基于 18S rRNA 基因序列构建的石磺科贝类的贝叶斯树 (图中数字为后验概率)

Fig. 3 The Bayesian tree resulting from analysis of the 18S rRNA gene sequences of Onchidiidae (Numbers on nodes corresponding to posterior probability values)

3 讨论

3.1 石磺科分类历史及我国大陆石磺科分类现状

石磺科贝类的分类比较混乱。自 1800 年由 Buchanan 首次发现第一种石磺——香蒲石磺 (*Onchidium typae*) 以来, 石磺科属种的分类标准、数目和名称历经多次变化, 如蝶状石磺 (*Onchidella patelloides*) 自 1832 年到 1952 年, 属名变换了 15 次 (Tillier & Ponder, 1992)。石磺科先后出现了约 40 个属名, 现在被广泛接受的只有 6 个属: *Onchidella*、*Onchidina*、*Onchidium*、*Paraoncidium*、*Peronia* 和 *Platevindex*。我国大陆已报道的石磺科贝类仅有石磺 (*Onchidium verruculatum*) 和瘤背石磺 (*Onchidium struma*) 两种, 第一种仅是按照地理分布将福建以南的石磺命名为 *Onchidium verruculatum* (现应更名为 *Peronia verruculata*), 其外部形态和解剖特性等模式资料尚未见报道; 瘤背石磺则主要分布于江浙沪沿海; 两种石磺的种间差异及系统发生关系的研究也未见报道。根据 Britton (1984) 对香港石磺科贝类的报道, 香港有 4 种石磺: *Peronia verruculatum*、*Paraoncidium reevesii*、*Platevindex mortoni* 和 *Onchidium hongkongensis*。

3.2 我国大陆石磺科贝类的分类进展及分布特征

Shen (2009) 从石磺分布区域、生态习性、外部形态、内部结构、染色体核型分析及 mtDNA 分子标记分析等结果对我国大陆沿海非系统性采集的石磺科贝类进行过分类研究, 结合 Britton (1984) 的研究结果初步判定我国大陆沿海石磺科贝类存在 4 个属。

本文基于石磺科 18S rRNA 基因的部分序列, 以菊花螺为外群对我国大陆 9 个群体石磺的系统发生进行了分析, 结合各群体外部形态和解剖特征及 Shen (2009) 的研究可得出我国大陆沿海石磺科贝类分类的初步结果: (1) HNZ 和 FJZ 同为 *Peronia verruculata* (此种曾命名为 *Onchidium verruculatum*); (2) FJR 和 HNR 为 *Paraoncidium* 属一新纪录种的不同地理群体 (*Paraoncidium* sp.); (3) HNJ、HNY 与 JZH 同为 *Onchidium* 属, 前两者为新纪录种 (*Onchidium* sp. Hainan Orange, *Onchidium* sp. Hainan Hard-bodied), 后者为瘤背石磺 (*Onchidium struma*); (4) FJH 和 HNH 由外部形态和主要解剖特征判定为 *Platevindex* 属的一新纪录种 (*Platevindex mortoni* Britton, 1984), 但分子生物学研究结果与形态学分析结果有些许分歧, 3 种系统发生树显示 *Platevindex* sp. (HNH) 与 *Paraoncidium* 归属于同一亚群 (图 1~3); MP 树、贝叶斯树分析则又可得出 *Platevindex* sp. (FJH) 与 *Onchidium* 为同一亚群 (图 2、3)。

随着科学技术的发展, 动物分类方法的不断丰富, 已由单纯地依靠栖息环境、体色、体型等简单外部形态到形态特征与内部结构相结合的分类方法, 直至目前利用各种分子标记进行系统发育和系统分类分析。分子生物学方法与传统形态学分析结果有时会有不一致现象。因此, 综合利用形态学与分子生物学方法将成为解决物种分类和研究系统进化的有效途径。形态特征和基因序列相结合可对石磺科各属、种及群体间遗传关系和遗传多样性进行分析, 以进一步明确中国大陆石磺科的系统分类和系统发育状况。

石磺科贝类主要分布在热带、亚热带, 我国石磺科贝类的总体分布也证明南部海岸滩涂种类较多 (4 属 5 种), 中部次之 (3 属 3 种), 北部最少 (1 属 1 种)。这种分布趋势符合物种发生的规律。石磺繁殖盛季 (6—8 月), 在夏季季风影响下我国杭州湾以南, 东海、南海的沿岸流与外海暖流系统汇合在一

起, 自南向北流动, 由此可推测历史上我国石磺分布由南向北扩散。其中 *Onchidium* 属分布最广, 海南岛、江浙沪等地沿海皆有发现, *Peronia*、

Platevindex 和 *Paraoncidium* 等属分布范围较 *Onchidium* 属小。

参考文献:

- Boucher P, Rocroi P, Fryda J. 2005. Classification and nomenclator of gastropod families [J]. *Malacologia*, **47**: 1-97.
- Britton KM. 1984. The Onchidiacea (Gastropoda, Pulmonata) of Hong Kong with a worldwide review of the genera [J]. *J Mollus Stud*, **50**: 179-191.
- Cai YY, Zhang Y, Wei RF. 1995. An Introduction to Mollusk [M]. Shanghai Science and Technology Press, 69-72. [蔡英亚, 张英, 魏若飞. 1995. 贝类学概论. 2版. 上海科学技术出版社, 69-72.]
- Carapelli A, Frati F, Nardi F, Dallai R, Simon C. 2000. Molecular phylogeny of apterygotan insects based on nuclear and mitochondrial genes [J]. *Pedobiologia*, **44**(4): 361-373.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, **39**: 783-791.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK. 1996. Molecular Systematics [M]. Sunderland(MA): Sinauer Associates.
- Huang JT, Shen BP, Wang ZS. 2004. The observation on ecological habits of *Onchidium struma* [J]. *Mar Fisher*, **26**(2): 103-109. [黄金田, 沈伯平, 王资生. 2004. 瘤背石磺的生态习性观察. 海洋渔业, **26**(2): 103-109.]
- Huang JT, Zhang YX. 2004. Indoor cultivation experiment of *Onchidium struma* in warm box [J]. *Mar Sci*, **28**(10): 14-16. [黄金田, 张余霞. 2004. 瘤背石磺室内温箱养殖试验. 海洋科学, **28**(10): 14-16.]
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny[J]. *Biometrics*, **17**: 754-755.
- Hwang UW, Kim W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematic [J]. *Korean J Parasitol*, **37**(4): 215-228.
- Ji XL, Lin XT, Xu ZN, Lin YT. 2000. Mechanism of mariculture self-pollution and its effects on environment [J]. *Mar Environ Sci*, **19**(4): 66-71. [计新丽, 林小涛, 许忠能, 林燕棠. 2000. 海水养殖自身污染机制及其对环境的影响. 海洋环境科学, **19**(4): 66-71.]
- Kano Y, Chiba S, Kase T. 2002. Major adaptive radiation in neritopsine gastropods estimated from 28S rRNA sequences and fossil records [J]. *Proc Biol Sci*, **269**(1508): 2457-2465.
- Knight A, Mindell DP. 1993. Substitution bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic position of Fea's viper[J]. *Syst Biol*, **42**(1): 18-31.
- Oiu LY. 1991. Morphology and habit of *Onchidium struma* along the coast of Jiangsu and Shanghai in China [J]. *Chn J Zool*, **26**(3): 33-36. [邱立言. 1991. 苏沪沿海瘤背石磺的形态和习性. 动物学杂志, **26**(3): 33-36.]
- Shen HD. 2009. Experimental Biology and Systematic Classification of Onchidiidae in Mainland China [D]. Ph. D. thesis, Shanghai Ocean University.
- Shen HD, Chen HC, Chen XL, Sun HW, Hua XM, Xiao HJ. 2004. Preliminary studies on the absorption rates and the feeding effects of different diets on sea-slug *Onchidium* sp [J]. *J Shanghai Fisher Univ*, **13**(4): 293-297. [沈和定, 陈汉春, 陈贤龙, 孙华伟, 华雪铭, 肖华军. 2004. 几种饲料对石磺的暂养效果及其消化率的初步研究. 上海水产大学学报, **13**(4): 293-297.]
- Shen HD, Li JL, Zhang WR. 2004. Study on biospeciality and aquatic foreground of *Onchidium* [J]. *Chn Fisher*, **1**: 60-63. [沈和定, 李家乐, 张婉溶. 2004. 石磺的生物学特性及其增养殖前景分析. 中国水产, **1**: 60-63.]
- Shu TF, Luo L, Wen YM. 2002. Effects of mariculture on coastal ecological environment [J]. *Mar Environ Sci*, **21**(2): 74-79. [舒廷飞, 罗琳, 温琰茂. 2002. 海水养殖对近岸生态环境的影响. 海洋环境科学, **21**(2): 74-79.]
- Stringer BL. 1969. The species of New Zealand Onchidiidae (Mollusca, Gastropoda) and their distribution [J]. *Mar Freshwat Res*, **3**: 29-45.
- Swofford DL. 2002. PAPA*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) [M]. Version 4.0 beta.10. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Tillier S, Ponder WF. 1992. New species of Smeagol from Australia and New Zealand, with a discussion of the affinities of the genus (*Gastropoda : pulmonata*) [J]. *J Mollus Stud*, **58**(2): 135-155.