

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5136—2019

上旋齿蜗牛检疫鉴定方法

Detection and identification of *Helicodonta obvoluta* (Müller, 1774)

行业标准信息服务平台

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国福州海关、中国湿地博物馆、中华人民共和国宁波海关、中华人民共和国杭州海关、福建省农业科学研究院。

本标准主要起草人：周卫川、杨海芳、王沛、林阳武、崔俊霞、董文勇、吴志毅、吴宇芬。

行业标准信息平台

上旋齿蜗牛检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了上旋齿蜗牛 *Helicodonta obvolvata* (Müller, 1774) 的检疫鉴定方法。
本标准适用于上旋齿蜗牛的检疫鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注文件的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。
SN/T 3067—2011 软体动物常规检疫规范

3 术语与定义

SN/T 3067—2011 规定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

口唇 lip

壳口缘部, 按其位置又可划分为内唇、外唇、上唇、下唇、基唇和轴唇。外唇在幼螺时一般很薄, 至成螺时逐渐加厚, 或有时具齿。

3.2

毛刺 hairs

贝壳的附属延伸物, 有些种类的蜗牛会在体螺层上分泌长出细长的毛状刺物。毛刺在成熟时多会脱落, 留下毛刺痕。

3.3

矢囊 dart sack

矢囊是蜗牛雌性生殖系统中一个藏有 1 枚或多枚中空的钙质或壳质骨针的肌肉质的囊。一般用长径与短径之比来描述矢囊的相对长度。

3.4

恋矢 love dart

恋矢就是矢囊中的骨针, 为蜗牛交配时刺激器官, 一般一个矢囊含有 1 枚恋矢, 恋矢的质地和形状常用于分类。

3.5

受精囊 bursa copulatrix

蜗牛的受精器官, 由受精囊和受精囊柄组成, 其中受精囊柄的形态和有无分支常用于分类鉴定。

3.6

边缘 verge

阴茎与阴茎本体交界处的圆锥状突起, 该特征种间差异稳定, 常作为种间鉴定的重要特征。

3.7

壁柱 pilaster

阴茎内壁上的柱状突起纹路, 其伸展的方向和疏密程度常用于分类。

4 基本信息

学名:*Helicodonta obvoluta* (Müller,1774)
异名:*Helix obvoluta* Müller,1774;*Helicodonta langhofferi* Wagner,1912;*Helicodonta obvoluta albanica* Wagner,1914
英文名:Cheese snail
中文名:上旋齿蜗牛
分类地位:软体动物门 Mollusca,腹足纲 Gastropoda,柄眼目 Stylommatophora,上旋齿蜗牛科 Helicodontidae Kobelt,1904,上旋齿蜗牛属 *Helicodonta* Férussac,1821。
上旋齿蜗牛的近似种主要有 *H.angigyra* (Rossmassler,1834)和 *H.wilhelminae* Maassen,1991。该蜗牛的其它信息参见附录 A。

5 原理

上旋齿蜗牛昼伏夜出,常隐藏在人们难以发现的地方,易于传播。其传播特点是不需要特定的寄主,凡接触过地面的物品都可传播。传播方式和途径是确定现场检疫方式的依据。贝壳形态、软体解剖和分子特征是实验室鉴定的主要依据。

6 器具和试剂

6.1 仪器和用具

仪器:体视显微镜、微型离心机、恒温金属浴、PCR 仪、凝胶照相系统。
用具:放大镜、手电筒、塑料自封袋、广口标本瓶、4 mm 孔径土壤筛、小铁铲、游标卡尺、白瓷盘、培养皿、镊子、剪刀、显微镊子、显微剪刀、微针、解剖腊盘、标签、移液枪、1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管。

6.2 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。
无水乙醇、硫酸镁、动物基因组 DNA 提取试剂盒、PCR Master Mix、ddH₂O。

7 现场检疫

对来自疫区(参见附录 A)的运输工具和货物实施重点查验。仔细检查运输工具、废塑料、木条箱、原木、苗木、水果、蔬菜、花卉、未经加工的植物性材料等是否有蜗牛附着其上,上旋齿蜗牛昼伏夜出,尤其要注意阴暗蔽光处的检查,用手电筒仔细寻找蜗牛的行迹。上旋齿蜗牛爬行过后,会留下银灰色的丝带状粘液痕迹,这是判定是否有蜗牛污染的重要依据。发现蜗牛标本,随时装入塑料自封袋或标本瓶带回实验室做进一步的鉴定。发现盆景等携带土壤或其它细碎衬垫材料时,需过筛检查是否有卵或幼螺污染。

8 实验室鉴定

8.1 测量、观察和解剖

用游标卡尺测量蜗牛贝壳的壳高和壳宽、卵粒直径。用肉眼或放大镜或体视显微镜仔细观察卵和

螺的形态特征。

将闷杀处理(参见 10.1)后的标本,参照 SN/T 3067—2011 中 8.3.1 进行软体解剖,分离出生殖系统。

8.2 上旋齿蜗牛属 *Helicodonta* Férussac, 1821 鉴定特征

贝壳扁平,呈褐色至咖啡色。壳顶轻微下陷。胚螺层光滑。体螺层圆形,壳面密布不规则的辐射状刻纹和长约 1 mm 的毛刺,成熟时常脱落。壳口适度向下倾斜,外唇反折。脐孔开放,较为宽大。

8.3 上旋齿蜗牛 *Helicodonta obvoluta* (Müller, 1774) 鉴定特征

8.3.1 卵

圆球形,白色,直径 2.3 mm~2.4 mm。

8.3.2 贝壳

8.3.2.1 成螺

贝壳深棕色,螺旋部扁平,有 5 个~6 个略凸起的螺层,壳顶稍微凹陷,贝壳表面通常覆盖长约 1 mm 长的毛刺,成螺标本毛刺常脱落仅留痕迹。壳口折叠呈圆三角形是其典型特征,口缘上下两侧均较平扁,外唇白色外折,中部增厚形成腭牙或胼胝,在外观上中唇被折叠分成三个弯,内唇贴覆于体螺层上形成很薄的无色透明的胼胝部。脐孔开放,宽大,可透视,呈同心圆。壳高 5 mm~7 mm,壳宽 11 mm~15 mm(参见附录 B 中图 B.1)。

阿尔巴尼亚和黑山共和国的地理种群,贝壳通常较小,壳顶更为凹陷,各螺层增长更为迅速,毛刺短,约为其它种群 1/3。壳口更圆,内侧没有齿状突,外侧也没有相应的凹槽。

8.3.2.2 幼螺

其形态与成螺相似,壳质薄,螺层少,贝壳表面通常覆盖着 1 mm 长的毛刺。

8.3.3 螺体

腹足淡黄色,颈部颜色较深。头部至腹足爬行时伸展长度可达 23 mm~32 mm(参见附录 B 中图 B.2)

8.3.4 生殖系统

阴茎鞘薄而透明,包被在阴茎与阴茎本体的表面。阴茎内分布几根粗的呈纵向排列的壁柱,其中一根又短又宽,形成一个纵向的槽。壁柱的前端垫状增厚,表面有大量的圆锥形坑,在垫状增厚的壁柱背面有一个马鞍状突起,表面密布圆锥形的刺。这些结构形成了一个明显的瓣膜,能够区分阴茎的前端和末端。在瓣膜的后面,具有一个短小的分裂成两瓣的边缘。阴茎牵引肌从螺轴肌长出,插入阴茎本体末端。阴道细长,内侧平滑或布满不明显的纵向折叠。矢囊系统很特殊:仅见粘液腺 2 支,无矢囊和恋矢。受精囊卵圆形,受精囊柄中等长度,无分支(参见附录 B 中图 B.3)。

9 结果评定

以贝壳形态为基本鉴定依据,结合螺体和生殖系统解剖形态特征,并注意与近似种鉴别(参见附录 C),对于贝壳特征典型的个体符合 8.3.2 鉴定为上旋齿蜗牛 *Helicodonta obvoluta* (Müller, 1774),对于贝壳特征有变异的个体,需同时符合 8.3.2、8.3.3 和 8.3.4 才能鉴定为上旋齿蜗牛 *Helicodonta obvoluta* (Müller, 1774)。单独查获的卵粒或幼螺,用 COI 基因进行序列鉴定(参见附录 D),当检测样品

的 DNA 序列与已知上旋齿蜗牛的 DNA 序列同源性 $\geq 95\%$ 时,确定为上旋齿蜗牛的疑似样品,需要通过孵化和饲养(见 SN/T 3067—2011 中 8.4 饲养鉴定)为成螺后,再做进一步的形态鉴定。

10 标本处理和保存

10.1 标本处理

将蜗牛置于盛满水的瓶中,盖上瓶盖,进行闷杀,蜗牛在慢慢窒息的死亡过程中,逐渐伸展身体;或逐渐加入少量硫酸镁,进行麻醉闷杀。

将闷杀后伸展的蜗牛标本置于无水乙醇中浸泡 1 d~2 d,然后在 75%的乙醇溶液中固定,每隔 1 d~2 d 换 1 次乙醇溶液,共换 3 次~4 次,便可长期保存于 75%的乙醇溶液中。

10.2 保存时间

经处理后的标本,至少妥善保存 6 个月,并注明时间、产地、寄主、采集人等信息。

行业标准信息平台

附 录 A

(资料性附录)

上旋齿蜗牛的寄主、地理分布及其他信息

A.1 寄主

杂食性,以各种绿色植物为食。幼螺以腐植质、植物的幼苗和嫩芽为食;成螺取食各种绿色植物的茎、叶和果实,喜食蔬菜和花卉等园艺作物。

A.2 地理分布

上旋齿蜗牛分布遍及欧洲的大部分国家,从西班牙西北部到塞尔维亚都有分布,包括法国、瑞士、列支敦斯登、比利时、卢森堡、荷兰、德国中南部、奥地利、捷克、斯洛伐克、波兰、匈牙利、斯洛文尼亚、克罗地亚、意大利、波斯尼亚和黑塞哥维那、塞尔维亚等国家和地区,英国东南部和德国北部分布着早期遗留下来的隔离种群。

A.3 生物学与危害性

上旋齿蜗牛主要危害作物的幼苗和生长期的嫩芽,导致缺苗断垄,减低产量,污染产品,同时传播人畜共患寄生虫病,威胁人畜健康。该蜗牛适应性强,可以通过休眠方式度过恶劣环境,因此,防治上也较为困难。

上旋齿蜗牛喜欢生活在树林中的枯枝落叶层下和石缝中。在法国一年一代,5月~7月是该蜗牛交配产卵的高峰期,成螺交配后2天~3天产卵,一次约20粒,3周后孵化为幼螺,幼螺1.5个螺层,4个~6个月后成熟。在波兰二年一代,成螺一般产卵于4 mm~6 mm的腐木深处,5月~6月间一次可产卵15粒~20粒,而9月一次仅产1粒卵,大约15天~30天后孵化为幼螺,幼螺仅为1个螺层,6个~12个月后成熟。一般10月末分泌厚的膜魔封住壳口,进入冬眠期,至翌年4月又重新开始活动。

附 录 B
(资料性附录)
上旋齿蜗牛形态特征



图 B.1 上旋齿蜗牛成螺贝壳形态
(A:侧面观;B:背面观;C:腹面观)



图 B.2 上旋齿蜗牛成螺形态(<https://inpn.mnhn.fr/>)

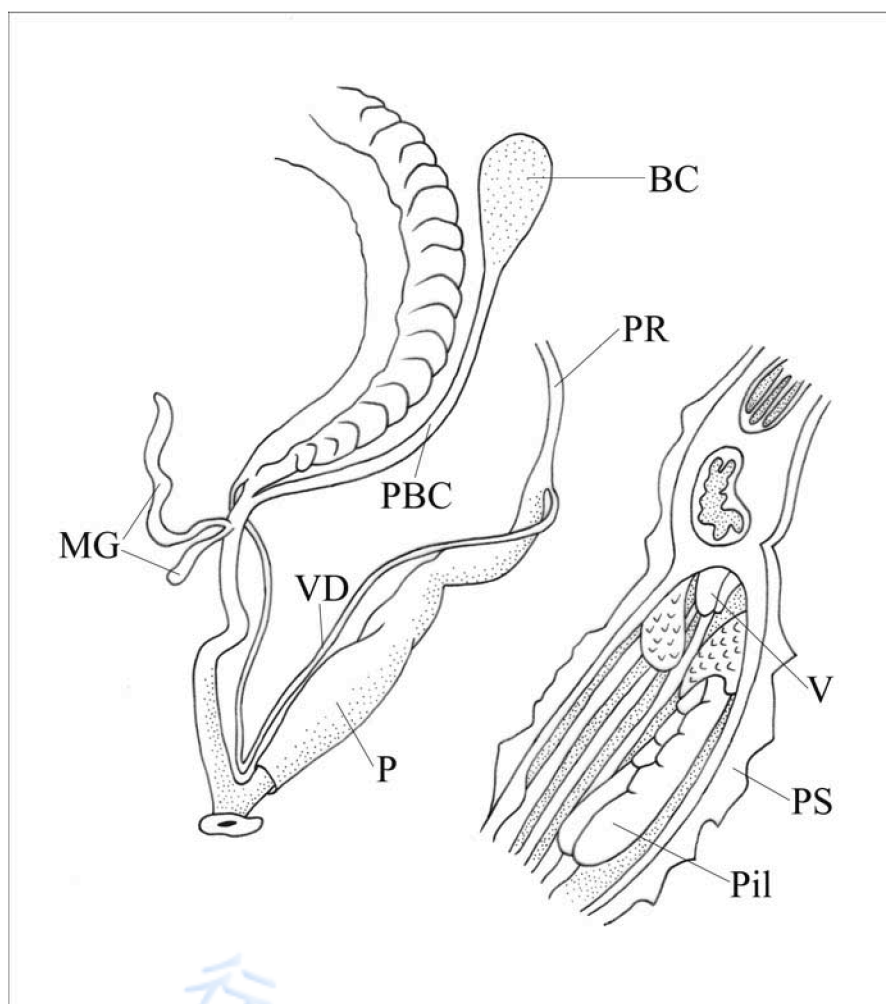




图 B.3 上旋齿蜗牛生殖系统(Schileyko, 2005)

MG: 粘液腺; P: 阴茎; PR: 阴茎牵引肌; PBC: 受精囊柄; BC: 受精囊; VD: 输精管; V: 边缘;
PS: 阴茎鞘; Pil: 壁柱

附 录 C
(资料性附录)

上旋齿蜗牛与近似种的鉴别方法

表 C.1 上旋齿蜗牛与近似种鉴别特征的比较

鉴别特征	<i>Helicodonta angigyra</i>	<i>Helicodonta obvolvata</i>	<i>Helicodonta wilhelminae</i>
螺层数	—	5~6	5.5~6.0
脐孔	脐孔稍窄,不呈同心圆	脐孔开放,较宽,可透视	脐孔开放,不呈同心圆
壳面	淡黄褐色	深黄褐色	—
壳口	壳口无折叠呈圆形,无胼胝部	壳口折叠呈圆三角形,有薄的胼胝部	壳口无折叠呈圆形,有胼胝部
壳高(mm)× 壳宽(mm)	4.0~5.5×9.0~11.0	5.0~7.0×11.0~15.0	5.6~7.0×13.5~16.0
分布	分布窄,阿尔卑斯山脉	分布广,欧洲广大地区	分布窄,希腊的克里特岛
鉴别图			—

行业标准信息平台

附 录 D
(资料性附录)
上旋齿蜗牛 COI 基因辅助鉴定方法

D.1 DNA 提取

取适量腹足肌肉,用 SDS 方法或动物基因组 DNA 试剂盒方法提取 DNA。

D.2 COI 基因引物

LCO1490;5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3'
HCO2198;5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

D.3 反应体系

反应体系为 20 μ L:其中 DNA 模板 2 μ L,LCO1490(10 μ M) 0.5 μ L,HCO2198(10 μ M) 0.5 μ L,
2 \times Master Mix 10 μ L,ddH₂O 7 μ L。

D.4 PCR 扩增条件

94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 50 s,45 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,30~35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C。

D.5 测序

将 PCR 扩增样品送有资质的生物技术公司测序。

D.6 比对鉴定

将双向测序获得的 600 bp~700 bp 长度的 DNA 序列片段,经软件拼接和人工校对后,与 Genbank
登录号为 KY940217 已知上旋齿蜗牛 COI 基因的标准序列进行比对,相似度 $\geq 95\%$ 的待鉴样品确定为
上旋齿蜗牛的疑似样品。