

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5137—2019

华僧螺检疫鉴定方法

Detection and identification of *Monacha cartusiana* (Müller, 1774)

行业标准信息平台

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国福建海关、中国湿地博物馆、中华人民共和国杭州海关、中华人民共和国张家港海关。

本标准主要起草人：王沛、杨海芳、王武军、周卫川、吴志毅、陆军、林阳武。

行业标准信息服务平台

华僧螺检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了华僧螺的检疫鉴定方法。
本标准适用于华僧螺的检疫鉴定。

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,仅注日期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 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鞭状体 flagellum

鞭状体是蜗牛雄性生殖系统中的附器,一般由阴茎本体末端分枝形成鞭状体。

3.2

受精囊 bursa copulatrix

蜗牛的受精器官,其中受精囊的大小及受精囊柄的形态和有无分支常用于分类鉴定。

3.3

矢囊 dart sack

矢囊是蜗牛生殖系统中一个藏有 1 枚中空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

阴茎 penis

阴茎系统一般由阴茎、阴茎本体、阴茎牵引肌和鞭状体组成,其中后三者常因种类不同而缺失。

3.5

壳口 aperture

贝壳开口部位,是蜗牛头和腹足的出口,一般无齿、片、褶等结构。壳口的边缘为口唇,按其在壳口中的位置不同可分为内唇、外唇、轴唇、基唇、上唇和下唇等,内唇常贴覆于体螺层上形成胼胝部。

3.6

轴唇 columellalip

贝壳壳口的边缘为口唇,按其在壳口中的位置不同可分为内唇、外唇、轴唇、基唇、上唇和下唇,靠近螺轴的口唇即称轴唇,有些种类的轴唇常外折导致脐孔部分或完全被覆盖。

4 基本信息

学名: *Monacha cartusiana* (Müller, 1774)。

异名：*Helix cartusiana* Müller, 1774。

英文名：Carthusian snail, Chartreuse snail。

中文名：华僧螺。

分类地位：软体动物门 Mollusca, 腹足纲 Gastropoda, 柄眼目 Stylommatophora, 湿螺科 Hygromiidae, 僧螺属 *Monacha*。

僧螺属有 3 亚属, 记录种 49 个, 华僧螺同亚属的近似种有紫僧螺 *M. cantiana* (Montagu, 1803) 和叙利亚僧螺 *M. syriaca* (Ehrenberg, 1831)。华僧螺的其他信息参见附录 A。

5 方法原理

传播方式和生态习性是确定现场检疫方式的依据。贝壳形态和软体解剖是实验室鉴定的主要依据, 分子特征作为不具备形态学鉴定样品的鉴定依据。

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、搪瓷盘、培养皿、镊子、剪刀、小剪刀、显微镊子、显微剪刀、微针(直径 0.15 mm)、解剖蜡盘、标签、1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管、移液枪。

6.2 试剂

除另有规定外, 所有试剂均为分析纯。

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、木质包装箱、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, 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。华僧螺爬行过后, 一般都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, 随时装入塑料自封袋或标本瓶带回实验室做进一步的检验鉴定。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。

8 实验室鉴定

8.1 测量、观察、解剖和饲养

用游标卡尺测量蜗牛贝壳的壳高和壳宽、卵粒的直径或长和宽。用肉眼或放大镜或体视显微镜仔细观察卵、贝壳和螺体的形态特征。

将闷杀处理(参见 10.1)后的标本, 按照 SN/T 3067—2011 中 8.3.1 进行软体解剖, 分离出生殖系统。单独查获的卵粒, 按照 SN/T 3067—2011 中 8.4 方法, 将其孵化和饲养为成螺后, 再做鉴定。

8.2 僧螺属 *Monacha* Fitzinger, 1833 鉴定特征

贝壳小至中型,扁球形,壳质薄,壳面乳白色至黄色。胚螺层光滑或分布短小的硬毛。壳口近圆形,口唇微红色或白色。脐孔窄,有时被完全覆盖,有时被半覆盖。螺层 5 个~7 个。该属下有三个亚属,分别为 *Monacha paratheba* Hesse, 1914, *Monacha monacha* (Fitzinger, 1833) 和 *Monacha metatheba* Hesse, 1914。三个亚属区别如下: *Monacha paratheba* Hesse, 1914 有阴道附属物和阴茎牵引肌; *Monacha monacha* (Fitzinger, 1833) 有阴道附属物,但无阴茎牵引肌; *Monacha metatheba* Hesse, 1914 无阴道附属物,但有阴茎牵引肌。

8.3 华僧螺鉴定特征

8.3.1 卵

球形,直径 1.5 mm~2.2 mm。

8.3.2 贝壳

8.3.2.1 成螺

贝壳中等大小,扁球形,壳质薄却硬,半透明。有 5 个~6 个螺层。壳顶尖,褐色。缝合线浅。体螺层上布满大量微弱凹螺纹和细小模糊的不规则生长线,靠近缝合线处生长线变粗。壳口卵形,成螺有较厚的内环肋,内环肋白色至棕色。内唇白色,壳口边缘常呈为微红色或褐色。脐孔微小,几乎完全被反折的轴唇所覆盖。在同一种群的个体间,壳面颜色差异很大,基色为乳白色至黄色。壳高 6 mm~10 mm,壳宽 9 mm~18 mm。(参见附录 B 中图 B.1)

8.3.2.2 幼螺

幼螺贝壳在外部形态上与成螺类似,表面常常覆盖细小的毛。个体小,壳质更薄,口唇无内环肋。

8.3.3 螺体

螺体呈浅灰色,头部两侧至前触角间各有一条黑线,为触角收缩肌。动物常以黏液附着在植株上栖息。(参见附录 B 中图 B.2)

8.3.4 生殖系统

生殖腔短。输精管相当长,从端部斜插入阴茎本体。阴茎肿胀,膨大成棒形,其宽度是阴茎本体 3 倍以上,阴茎内部有一特殊的“V”形结构,端部圆钝。阴茎本体较长。鞭状体短,端部渐细。无阴茎牵引肌。阴道附属物基部膨大,端部细长。粘液腺分多枝,中等长度,不卷曲。受精囊柄短,受精囊特大。(参见附录 B 中图 B.3)

8.3.5 COI 基因序列鉴定

参照附录 C 方法提取 DNA、PCR 扩增和双向测序,将所测序列与 Genbank 登录号为 KM247389 已知华僧螺的标准 COI 基因序列进行比对,相似度 $\geq 95\%$ 的待鉴样品确认为华僧螺的疑似样品。(参见附录 C)

8.3.6 近似种鉴别特征比较

华僧螺与近似种 *M. cantiana* (Montagu, 1803) 和 *M. syriaca* (Ehrenberg, 1831) 的主要鉴别特征参见附录 D。

9 结果评定

以贝壳形态为基本鉴定依据,结合螺体形态和生殖系统解剖形态特征,对于贝壳特征典型的个体符合 8.3.2 鉴定为华僧螺,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 才能鉴定为华僧螺。不具备形态特征的卵粒、幼螺等样品,用 CO I 基因进行序列鉴定(参见附录 C),当待测样品的 DNA 序列与已知标准样品的 DNA 序列同源性 $\geq 95\%$ 时,确定为华僧螺的疑似样品。幼螺需通过孵化和饲养(参见 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,快速进行麻醉闷杀。

将闷杀后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。解剖后的生殖系统可直接保存于 75%的乙醇溶液中。

10.2 保存时间

经鉴定处理后的华僧螺标本应永久保存,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)

华僧螺的寄主、地理分布及其他信息

A.1 寄主

杂食性,幼螺以腐植质和植物的幼苗和嫩芽为食,成螺以各种农作物和园艺作物为食。

A.2 地理分布

华僧螺主要分布在地中海盆地和欧洲东南部,包括英国、法国、比利时、荷兰、德国、乌克兰、捷克、葡萄牙、西班牙、意大利、希腊、瑞士、奥地利、匈牙利等国。

传入地区:澳大利亚,美国的芝加哥、威尔明顿州和密歇根州。

A.3 生物学与危害性

华僧螺是近年来国际运输工具检疫中常被截获的一种危险性有害生物。该种蜗牛起源于地中海盆地,在欧洲广泛分布,现已传入美国,被学者认为是对农业、自然生态系统、人类健康和贸易具有重大潜在威胁的外来入侵物种。成螺寿命可达2年,每年可产卵40粒~80粒。该螺可大量聚集在植物顶部啃食,造成农作物产量和品质下降。此外,华僧螺也是人畜共患寄生虫病的中间寄主,严重危及人类和家畜的健康。

行业标准信息平台

附 录 B
(资料性附录)
华僧螺形态特征

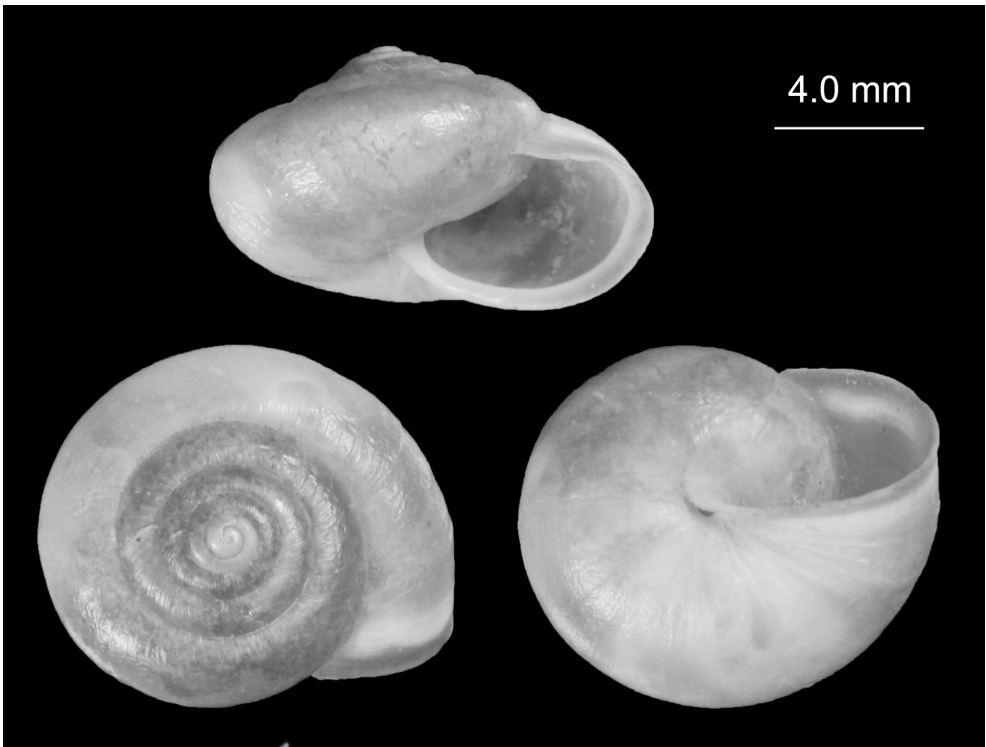


图 B.1 成螺贝壳形态特征
(上:侧面观;左下:背面观;右下:腹面观)



图 B.2 螺体形态特征

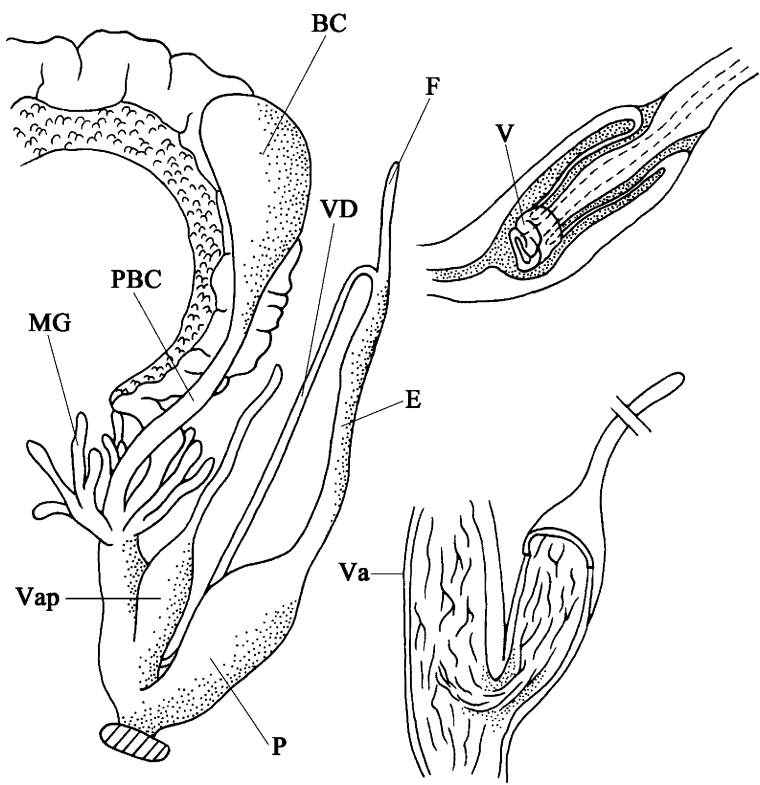


图 B.3 生殖系统形态特征(仿 Schileyko, 2006)

(P: 阴茎; E: 阴茎本体; F: 鞭状体; VD: 输精管; Vap: 阴道附属物; MG: 黏液腺; PBC: 受精囊柄; BC: 受精囊; V: 边缘; Va: 阴道)

行业标准信息平台

附 录 C
(资料性附录)
华僧螺 COI 基因鉴定方法

C.1 DNA 提取

取腹足肌肉约 30mg,用 SDS 方法或动物基因组 DNA 提取试剂盒方法提取基因组 DNA。

C.2 COI 基因引物

LCO1490:5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO2198:5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

C.3 反应体系

反应体系为 20 ul:其中 DNA 模板 2 ul(100 ng/ul),LCO 1490(10 uM)0.5 ul,HCO2198(10 uM)0.5 ul,2xMaster Mix 10 ul,ddH₂O 7ul。

C.4 PCR 扩增条件

94 °C 5 min;94 °C 50 s、45 °C 30 s、72 °C 50 s,30 个循环;72 °C 10 min、4 °C 终止。

C.5 测序

将 PCR 扩增样品送有资质的生物技术公司测序。

C.6 比对鉴定

将双向测序获得的 600 bp~700 bp 长度 DNA 序列,经软件拼接和人工校对后,与 Genbank 登录号为 KM247389 已知华僧螺的标准 COI 基因序列进行比对,相似度≥95%的待鉴样品确定为华僧螺的疑似样品。

附 录 D
(资料性附录)
华僧螺与近似种的鉴别

表 D.1 华僧螺与同亚属近似种鉴别特征的比较

鉴别特征	华僧螺 <i>M.cartusiana</i> (Müller, 1774)	紫僧螺 <i>M.cantiana</i> (Montagu, 1803)	叙利亚僧螺 <i>M.syriaca</i> (Ehrenberg, 1831)
螺层	约 5 个~6 个	约 5 个~6 个	约 4.5 个~5.5 个
贝壳	扁球形,壳面基色为乳白色至微黄色	稍扁,壳面基色为乳白色至黄色	更扁,贴近缝合线处有色带,呈白色
壳高×壳宽	6 mm~10 mm×9 mm~18 mm	11 mm~14 mm×16 mm~20 mm	6 mm~9 mm×8 mm~12 mm
壳口	内唇白色,唇缘微红色	内唇微红色或白色,唇缘与壳面颜色一致	内唇白色,唇缘淡红色或褐色
脐孔	小,几乎被覆盖	大,未被覆盖	无,完全被覆盖
典型贝壳照片对比	