



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5135—2019

布氏蜗牛检疫鉴定方法

Detection and identification of *Fruticicola fruticum* (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。

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：中华人民共和国福州海关、福建省农业科学研究院生物资源研究所、中华人民共和国拉萨海关。

本标准主要起草人：周卫川、林阳武、王沛、吴宇芬、文艺、陈晟。

行业标准信息平台

布氏蜗牛检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了布氏蜗牛的检疫鉴定方法。
本标准适用于布氏蜗牛的检疫鉴定。

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

螺旋部 spiral

为动物内脏器官盘存之处,通常由除体螺层外的其它几个螺层组成。

3.2

胚螺层 embryonic shell

贝壳最早发育的部分称为胚螺层,一般为壳顶 1.5 个~2 个螺层,其形态有尖、钝、圆钝、扁平、乳头状,有的种类常被腐蚀磨损,但这些特征较为明显,且稳定,常用于分类。

3.3

外套膜 mantle

为陆生软体动物躯体背部皮质层皱褶延伸而成,是一层覆盖内脏囊的膜状物,肺血管网密布其上,可行呼吸作用与分泌碳酸钙形成贝壳。

3.4

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。

3.5

阴茎鞘 penis sheath

包被在阴茎与阴茎本体外围的一层鞘状膜。

3.6

轴唇 columella lip

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:*Fruticicola fruticum* (Müller, 1774)。
异名:*Helix fruticum*, Müller, 1774; *Bradybaena fruticum* (Müller, 1774)。
英文名:Bush snail。
中文名:布氏蜗牛。

分类地位:软体动物门(Mollusca),腹足纲(Gastropoda),肺螺亚纲(Pulmonata),柄眼目(Stylommatopoda),巴蜗牛科(Bradybaenidae Pilsbry, 1934),布氏蜗牛属(*Fruticicola* Held, 1838)。
布氏蜗牛属只有 2 个种,即布氏蜗牛和史氏蜗牛 *Fruticicola schrenkii* (Middendorff, 1851)。布氏蜗牛的其他信息参见附录 A。

5 方法原理

生态习性和传播方式及途径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。布氏蜗牛爬行过后,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他细碎衬垫材料时,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 布氏蜗牛属 *Fruticicola* Held, 1838 鉴定特征

贝壳呈扁圆球形至透镜形,壳质稍厚。体螺层膨大,圆形,壳面白色至栗色,具有稠密的生长线和细螺紋。体螺层周缘常有颜色较深的色带,有些个体则无色带。壳口形状随贝壳形状而变,近圆形至窄角状,适度倾斜。生殖系统无鞭状体。该属和巴蜗牛属 *Bradybaena* Beck, 1837 的主要区别是阴茎较长,内有刺激器,而巴蜗牛属则阴茎较短,无刺激器。

8.3 布氏蜗牛鉴定特征

8.3.1 卵

卵粒圆形,白色,直径 1.5 mm 左右。

8.3.2 贝壳

8.3.2.1 成螺

贝壳呈扁圆球形,壳质稍厚,坚实。5 个~6 个螺层,缝合线深,各螺层膨胀、外凸,胚螺层表面光滑,螺旋部粗糙。贝壳透明,活体一般透过贝壳可见黑色小点或斑纹,为外套膜色彩。壳面色泽变异较大,以淡黄色为主,有时呈红棕色甚至紫罗兰色,周缘具有色带或无色带。脐孔开放且深,略被轴唇遮盖,其直径约是壳宽的 1/7。体螺层膨大,圆形,具有稠密的生长线和细螺紋。壳口简单,近圆形,适度向下倾斜。外唇内侧增厚,形成较厚的环唇肋。壳高 10 mm~20 mm,壳宽 13 mm~25 mm。(参见附录 B 中图 B.1、图 B.2)

8.3.2.2 幼螺

幼螺贝壳较小,壳质薄,透明,易碎,形态特征与成螺贝壳基本一致。

8.3.3 螺体

动物软体多为浅色,透过贝壳可以看到外套膜的形态,其上黑点和暗色斑块的特征更为明显。触角颜色比腹足稍深。(参见附录 B 中图 B.3)

8.3.4 生殖系统

输精管十分细长,其长度约为阴茎的 2 倍多,与阴茎本体末端相连。阴茎长,内部布满纵向或者横向倾斜的直或者弯曲的折叠,末端部分沿着浅槽缩小,无圆锥形的边缘结构。阴茎基部具阴茎鞘。阴茎牵引肌与阴茎本体相连,较短。阴道卵圆形或长椭圆形,矢囊短小,圆锥形,有副矢囊。粘液腺 2 枝或多枝,气泡状至圆管状。受精囊柄基部膨大,后渐变细,受精囊大(参见附录 B 中图 B.4)。

8.3.5 COI 基因序列鉴定

按照附录 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 AY546264.1 已知布氏蜗牛的 COI 基因标准序列进行比对,相似度 $\geq 95\%$ 的待鉴样品确认为布氏蜗牛的疑似样品。(参见附录 C)

8.3.6 近似种鉴别特征比较

布氏蜗牛与近似种史氏蜗牛的主要鉴别特征列于附录 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 鉴定为布氏蜗牛,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 才能鉴定为布氏蜗牛。不具备形态鉴定的卵粒、幼螺等样品,用 COI 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 95%时,确定为布氏蜗牛的疑似样品,需要通过饲养或孵化和饲养(参见 SN/T 3067 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

经鉴定处理后的布氏蜗牛标本应永久保存,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)

布氏蜗牛的寄主、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,尤其喜食蔬菜和花卉等园艺作物。在野外也发现该蜗牛常取食蘑菇等菌类。

A.2 地理分布

欧洲的大部分国家,包括奥地利、保加利亚、捷克共和国、德国、英国、荷兰、波兰、斯洛伐克、瑞士和乌克兰。传入地区:不列颠群岛的东南部。

A.3 生物学与危害性

布氏蜗牛对恶劣环境的抗性强,为广布性种类,广泛分布于欧洲地区,危害当地的园艺作物,并传播人畜共患寄生虫病,对环境卫生也造成影响。

布氏蜗牛对干旱敏感,喜生活在温暖潮湿的地方,特别是高大的绿色植被下面。在瑞士和保加利亚,布氏蜗牛可生活在海拔 1 800 m 的高山,但高于 1 500 m 的山地种群密度较低。在希腊北部,成螺在初夏季节产卵,秋季活动频繁,冬季休眠,来年春天又开始活动。生长一年后壳宽为 10 mm,二年后 20 mm,三年后可达 25 mm。该蜗牛一般在温暖潮湿的三月~八月可多次产卵,每次产卵 10 粒~30 粒,25 d~50 d 后孵化出幼螺,幼螺在四月~八月快速生长,约一年半至两年后性成熟。成螺寿命可达六年之久。

附 录 B
(资料性附录)
布氏蜗牛形态特征

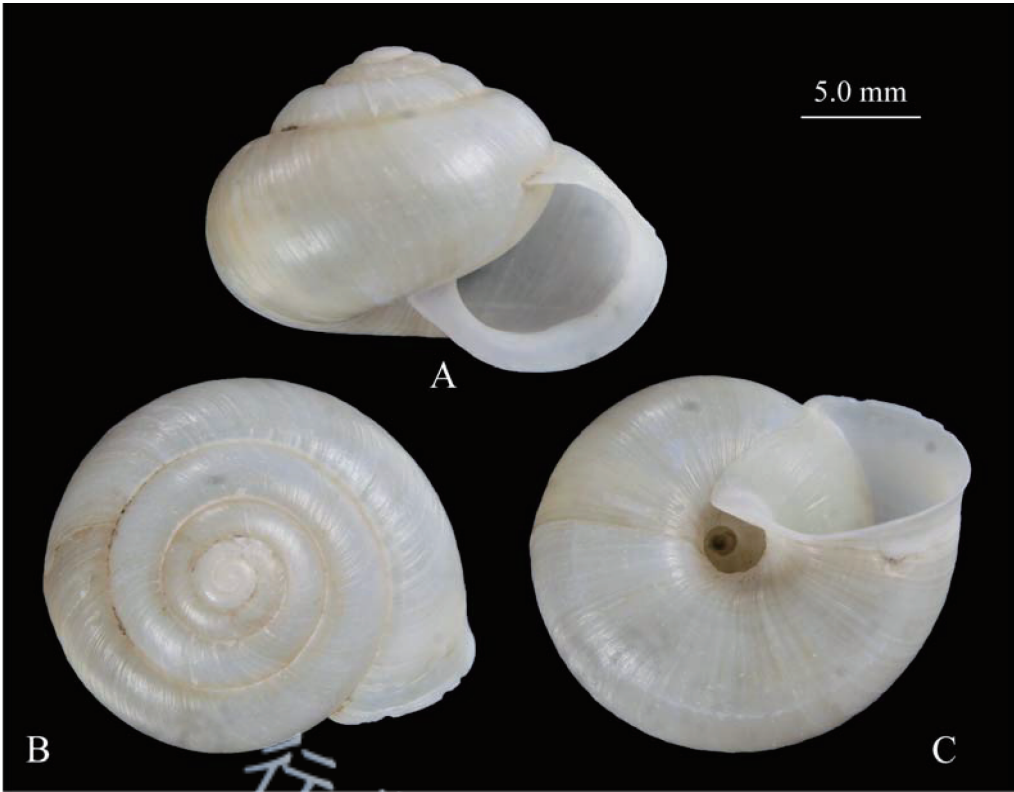


图 B.1 成螺贝壳形态特征
(A:侧面观;B:背面观;C:腹面观)



图 B.2 成螺贝壳色泽和色带的变异



图 B.3 螺体形态特征(引自 <https://en.wikipedia.org/>)

行业标准信息平台

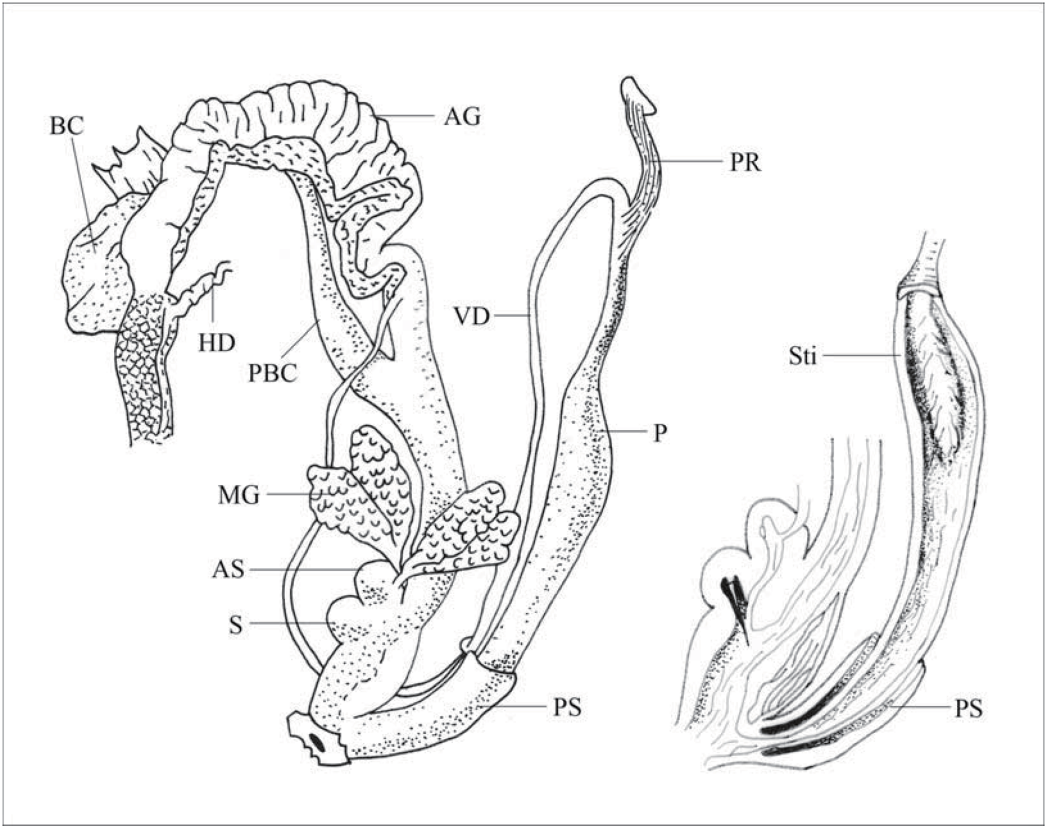


图 B.4 生殖系统形态特征(仿 Schileyko, 2004)

(MG:粘液腺;P:阴茎;PS:阴茎鞘;PR:阴茎牵引肌;S:矢囊;AS:副矢囊;
PBC:受精囊柄;BC:受精囊;VD:输精管;HD:两性管;AG:蛋白腺;Sti:刺激器)

附 录 C
(资料性附录)
布氏蜗牛 COI 基因鉴定方法

C.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。

C.2 COI 基因引物

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

C.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。

C.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。

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 长度的 DNA 序列片段,经软件拼接和人工校对后,与 Genbank 登录号为 AY546264.1 已知布氏蜗牛 COI 基因的标准序列进行比对,相似度 $\geq 95\%$ 的待鉴样品确定为布氏蜗牛的疑似样品。

附 录 D
(资料性附录)
布氏蜗牛与近似种的鉴别

表 D.1 布氏蜗牛同属物种鉴别特征的比较

鉴别特征	布氏蜗牛 <i>F. fruticum</i> (Müller, 1774)	史氏蜗牛 <i>F. schrenkii</i> (Middendorff, 1851)
螺层数	5 个~6 个	4.5 个~5 个
贝壳	圆球形	凸透镜形
脐孔	开放	窄小,部分被轴缘覆盖
壳面	淡黄色为主,色泽变异较大,透明	角白色,色泽变异小,不透明或轻微半透明
壳口	明显的白色内环唇肋	弱的白色内环唇肋
壳高×壳宽	10 mm~20 mm×13 mm~25 mm	9 mm~14 mm×14 mm~18 mm
分布	广泛分布于欧洲	俄罗斯西北部局部地区

行业标准信息平台