

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4638—2016

尖头旋蜗牛检疫鉴定方法

Detection and identification of *Cochlicella acuta* (Müller, 1774)

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国中山出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国张家港出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王沛、周卫川、黄蓬英、王章根、徐浪、崔俊霞、陆军、林阳武。

尖头旋蜗牛检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了尖头旋蜗牛 *Cochlicella acuta* (Müller, 1774) 的检疫鉴定方法。
本标准适用于尖头旋蜗牛的检疫鉴定。

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 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鞭状体 flagellum

蜗牛雄性生殖系统中的附器,一般在阴茎本体末端分枝形成鞭状体。

注:鞭状体的有无和形态常用于分类。

3.2

阴茎鞘 penial sheath

阴茎外围一薄层,紧贴于阴茎。

3.3

贮液囊 reservoir

受精囊的附属器,着生于受精囊与受精囊柄连接处,用于贮存外来精液。

3.4

缝合线 suture

蜗牛贝壳各螺层之间下陷的连接处。缝合线有深有浅,有简单的或锯齿形的,这些特征常用于分类鉴定。

3.5

螺轴 columella

蜗牛贝壳的旋转中轴即称螺轴。

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,靠近螺轴的部位。

注: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: *Cochlicella acuta* (Müller, 1774)

异名: *Helix acuta* Müller, 1774

英文名: Pointed snail, Conical snail

俗名: 尖头蜗牛、圆锥蜗牛

分类地位: 软体动物门 Mollusca, 腹足纲 Gastropoda, 柄眼目 Stylommatophora, 旋蜗牛科 Cochlicellidae Schileyko, 1972, 旋蜗牛属 *Cochlicella* Ferussac, 1821。尖头旋蜗牛同属的近似种有巴布拉旋蜗牛 *C. barbara* (Linnaeus, 1758)、圆锥旋蜗牛 *C. conoidea* (Draparnaud, 1801)。尖头旋蜗牛的其他信息参见附录 A。

5 方法原理

尖头旋蜗牛主要通过运输工具、木质包装材料和污染的农副产品远距离传播, 污染的谷物、油菜籽和柑橘类水果是其最重要的传播媒介。其传播特点是不需要特定的寄主, 凡接触过地面的物品都有可能传播。传播方式和传播途径是确定现场检疫方式的依据。贝壳形态、解剖结构和分子生物学特征是实验室鉴定的主要依据。

6 器具和药品

6.1 仪器和用具

设备: 体视显微镜、微型离心机、恒温金属浴、PCR 仪、凝胶照相系统。

器具: 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、移液器。

6.2 药品和试剂

除另有规定外, 所有试剂均为分析纯。

75%乙醇、无水乙醇、硫酸镁、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、木质包装物、未经加工的植物性材料、大麦、小麦、油菜籽、水果、牧草等是否有蜗牛附着其上, 尖头旋蜗牛昼伏夜出, 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。蜗牛爬行过后, 一般会留下银灰色的丝带状黏液痕迹, 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

用游标卡尺测量蜗牛贝壳的壳高和壳宽、壳口高和壳口宽、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(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。

单独查获的卵粒, 参照 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 旋蜗牛属 *Cochlicella* Ferussac, 1821 鉴定特征

贝壳较小,高塔形,颜色多变。壳质薄易碎。壳口简单,椭圆形。脐孔微小,几乎完全被反折的轴唇所覆盖。体螺层周缘下常有黑褐色螺旋状色带。阴茎本体很长,阴茎具有长短不一的鞭状体。

8.3 尖头旋蜗牛 *Cochlicella acuta* (Müller, 1774) 鉴定特征

8.3.1 卵

白色,圆球形,直径约 1.0 mm。

8.3.2 贝壳

8.3.2.1 成螺

壳高 10 mm~20 mm,壳宽 5 mm~8 mm,呈高塔形,有 8 个~10 个螺层和锯齿状的缝合线。壳质薄易碎。壳顶尖,褐色。壳口椭圆形,壳口高超过壳口宽的长度,无环唇肋。轴向刻纹由生长线构成,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,基色为纯白色至浅黄色,体螺层周缘下常有黑褐色螺旋状色带。壳面基色与螺轴反圈形成的淡褐色或黑褐色条带相重叠或分隔,产生特殊的斑驳色块。(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无太大差异,只是个体小,壳质更薄,在体螺层周缘有明显的棱角状外突,成螺则无此特征。

8.3.3 螺体

动物呈淡黄色,背部从领到头部间有一条黑色的中线,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。(参见图 B.2)

8.3.4 生殖系统

爪薄,部分隐藏。生殖腔非常短。输精管相当长,从端部斜插入阴茎本体。阴茎十分肿胀,膨大呈棍棒状,其宽度是阴茎本体 4 倍~5 倍,阴茎鞘明显,阴茎本体较长。矢囊很长,壁厚。粘液腺一枝,分为两个树杈。受精囊柄基部肿胀,受精囊小。(参见图 B.3)

Cochlicella 和 *Prietocella* 解剖特征的不同在于:前者鞭状体较长,而后者较短或仅留痕迹。

8.3.5 COI 基因序列鉴定

按附录 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 KP233843 已知尖头旋蜗牛的标准 COI 基因序列进行比对,相似度一般应 $\geq 95\%$ 。

9 结果评定

以贝壳形态为基本鉴定依据,螺体和生殖系统解剖形态为辅助鉴定特征,并注意与近似种鉴别(参见附录 D),对于贝壳特征典型的个体符合 8.3.2 鉴定为尖头旋蜗牛 *C. acuta* (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 才能鉴定为尖头旋蜗牛 *C. acuta* (Müller, 1774)。符合 8.3.5 作为前期初筛或形态鉴定结果的分子佐证。

SN/T 4638—2016

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。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。



附 录 A

(资料性附录)

尖头旋蜗牛的寄主、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,成螺取食各种绿色植物的茎和叶。

A.2 地理分布

尖头旋蜗牛主要分布在地中海东部地区:希腊、以色列、埃及;欧洲西南及西部的大部分国家:西班牙、法国、比利时、荷兰;不列颠群岛:英格兰南部和西部沿海、威尔士、苏格兰、爱尔兰。

传入地区:澳大利亚南部、美国。

A.3 生物学与危害性

尖头旋蜗牛对禾谷类作物、柑橘类和葡萄类水果以及豆科牧草危害特别严重,已被美国、澳大利亚、日本等国列为检疫性有害生物。1996年,美国从澳大利亚进境的一艘柑橘类水果船上截获大量尖头旋蜗牛,从而导致美国对澳大利亚进境的水果实施100%的强制性检疫,据澳方2009年统计:2006年~2008年美国各口岸多次检出尖头旋蜗牛,只要检出一头小蜗牛,同批次所有货物都要实施熏蒸处理,使澳大利亚出口柑橘严重受挫。2002年,美国农业部评估尖头旋蜗牛为第三大危害最为严重的螺类之一。尖头旋蜗牛起源于西欧,于19世纪末20世纪初传入澳大利亚,之后在澳大利亚南部塔斯马尼亚、维多利亚和新南威尔士等州的果园和牧场大暴发,现在正向其他地区扩散危害,对农牧业生产造成巨大损失。由于美国、日本等国家对其实施检疫,严重影响澳大利亚农副产品对北美和亚洲的出口贸易。另外,尖头旋蜗牛也是人畜共患肺吸虫 *Brachylaima cribbi* 的中间寄主,严重危及人类和家畜的健康。

SN/T 4638—2016

附录 B
(资料性附录)
尖头旋蜗牛形态特征

尖头旋蜗牛形态特征见图 B.1、图 B.2 和图 B.3。



图 B.1 成螺贝壳形态特征 (A:正侧面观,B:背侧面观)



图 B.2 尖头旋蜗牛生态图(附着在植株上栖息;引自 internet)

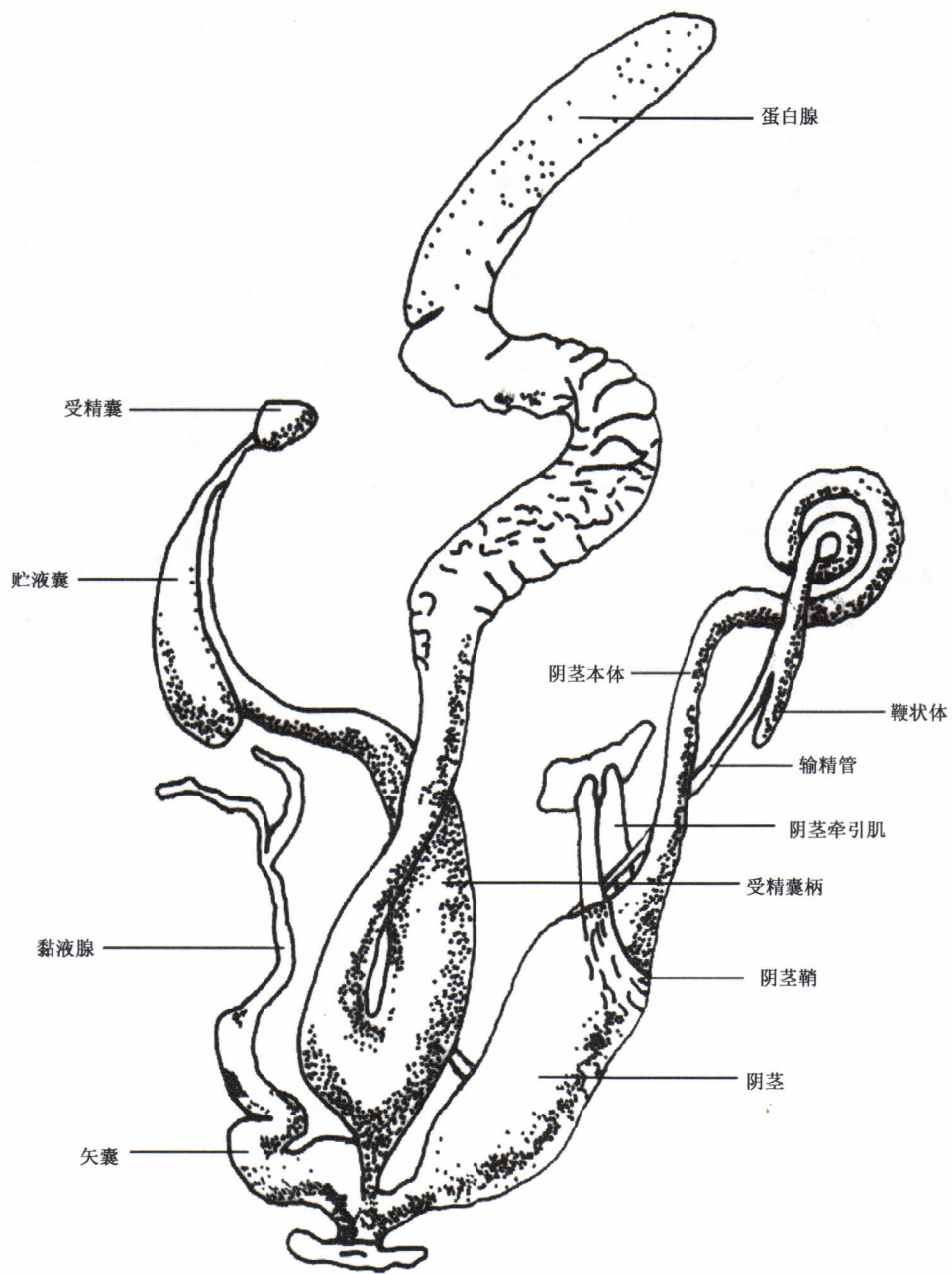


图 B.3 尖头旋蜗牛生殖系统形态(仿 Schileyko, 2006)

附 录 C
(规范性附录)

尖头旋蜗牛 COI 基因鉴定方法

C.1 DNA 提取

取腹足肌肉约 10 mg,用 SDS 方法或 DNA 提取试剂盒方法获取基因组 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 μL :其中 DNA 模板 2 μL (100 ng/ μL), LCO1490 (10 μM) 0.5 μL , HCO2198 (10 μM) 0.5 μL , 2 \times Master Mix 10 μL , ddH₂O 7 μL 。

C.4 PCR 扩增条件

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

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 DNA 序列,经软件拼接和人工校对后,与 Genbank 登录号为 KP233843 已知尖头旋蜗牛的标准 COI 基因序列进行比对,相似度 $\geq 95\%$ 的待鉴样品确定为尖头旋蜗牛的疑似样品。

附 录 D
(资料性附录)

尖头旋蜗牛与近似种的鉴别

尖头旋蜗牛与近似种鉴别特征比较见表 D.1。

表 D.1 尖头旋蜗牛与近似种鉴别特征比较

鉴别特征	尖头旋蜗牛 <i>C.acuta</i> (Müller,1774)	巴布拉旋蜗牛 <i>C.barbara</i> (Linnaeus,1758)	圆锥旋蜗牛 <i>C.conoidea</i> (Draparnaud,1801)
螺层/层	约 8~11	约 7~8	约 4.5~6
贝壳	壳面颜色白色至褐色,更细长,螺旋部更高	壳面颜色较深,细长,螺旋部较高	壳面颜色微黄色,较短,螺旋部较低
壳高×壳宽	(9 mm~15 mm)×(4 mm~7 mm)	(7 mm~15 mm)×(4.5 mm~7 mm)	(6 mm~9 mm)×(5 mm~6 mm)
黏液腺	一支,分成两个树杈	三支,分成五个树杈	两支,分成三个树杈
阴茎鞘	有	无	无
贮液囊	有	无	无
典型贝壳 照片对比			

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
尖头旋蜗牛检疫鉴定方法
SN/T 4638—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533
网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2017年11月第一版 2017年11月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 • 2-32113 定价 21.00 元



SN/T 4638-2016