bio-101 www.bio-protocol.org/e1010631 DOI:10.21769/BioProtoc.1010631

陆生贝类形态学研究方法

Research Methods of Morphology for Terrestrial Mollusca

张国一 [1,*]，谢广龙 [2]

[1]生命科学学院，山东师范大学，济南，山东省；[2]生命科学学院，曲阜师范大学，曲阜，山东省

*通讯作者邮箱：starsareintherose@gmail.com

引用格式：张国一，谢广龙. (2021). 陆生贝类形态学研究方法. Bio-101 e1010631. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010631.

How to cite: Zhang, G. Y. and Xie, G. L. (2021). Research Methods of Morphology for Terrestrial Mollusca. Bio-101 e1010631. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010631. (in Chinese)

摘 要： 陆生贝类是动物界第二大纲腹足纲的重要类群，但是对于陆生贝类的贝壳形态学术语不统一以及早期破坏贝壳的解剖方法对研究陆生贝类造成了诸多困扰。本文在传统的形态学描述和比较解剖学的基础上，研究归纳了一组可用的陆生贝类形态学术语并改进了一种对于贝壳非破坏性的形态学研究方法。

关键词：贝类学，腹足纲，软体动物，形态学

研究背景

在最初的陆生贝类研究中，往往依赖贝壳的形态特征，而软体部分比较解剖学研究则很少，较早的研究见于 Tryon (1887)，之后民国时期也有介绍 (薛德焴, 1934)，更多见于近三十年 (Yen and Hwang, 2016; 金志良，1993)。对于陆生贝类的基于形态学的系统研究多发表于上世纪末至本世纪初 (Cuezzo, 1998 and 2003; Wu, 2004)，但是未有详细全方面的形态学术语列表。

对于贝壳形态学研究方法，引用较多的是 Kerney and Cameron (1979) 介绍的螺层计数方法。陆生贝类解剖的相关研究在描述分离软体部分和贝壳时，往往都会选择破坏贝壳的技术手段 (Lőw *et al*., 2016; White-McLean, 2011; 郭阳阳等，2015; 张卫红等，2016)，或者对于软体和贝壳分离方面过于简略 (陈德牛和高家祥，1981；陈德牛和张国庆，1996)。金志良 (1993) 较早的提出了非破坏性的解剖学研究方法，但是处理

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

之后的标本不太适宜于分子生物学相关研究；吴岷 (2002) 提出了一种非破坏性的贝壳分离办法，器材略复杂，本文对其操作工具进行了简化；日本学者也提出了一种非破坏性的方法，但是对标本要求太高 (Fukuda *et al*., 2008)。黄重期 (2017) 对陆生贝类解剖学进行了详细的描述，本文所介绍的顺序与其方法相差不多，但是增加了若干注意事项，改进了部分易失败的步骤。

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 培养皿
3. 纱布
4. 种子袋
5. 塑料扎带
6. 蛭石
7. 蛋壳粉
8. 沥青
9. 猫粮/狗粮
10. 小球藻片
11. 燕麦片
12. 无水乙醇

仪器设备

1. 昆虫针
2. 眼科剪，维纳斯 8.5 cm 直头
3. 尖头镊子
4. 饲养盒
5. 橡胶吸球
6. 体式显微镜

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

实验步骤

一、标本采集

1. 微型蜗牛 (壳高或壳宽 1-3 mm 左右) 一般栖息于落叶层，时间充足可以在落叶层中慢慢挑拣；时间不充足可以用塑封袋对落叶层落叶进行收集，待当日休息时间翻找，收集后可以用离心管作为保存容器，直接进入标本的制作环节。非微型蜗牛则可以直接采集，收集至种子袋中。蛞蝓和半蛞蝓采集后应该立即饲养或者制作标本。在温度让人适宜且湿度较高的环境下采集 ， 重点观察岩石周围和和落叶层。同时，对采集地的经纬度、海拔、植被等相关信息进行详细记录。
2. 在条件不允许直接制作标本时，用纱布将休眠的标本的包裹若干层后用塑料扎带将纱布固定，并标记相应标本符号，然后放入种子袋中保存。有条件则直接制作标本。

二、标本饲养

1. 选薄半透明的饲养盒，在较为宽的两壁扎出成排的通气孔；或直接购买相同规格的饲养盒。
2. 蛭石经过三次水洗后使用，将一半饲养盒底铺满 1-2 cm 厚的蛭石。蛭石中水分以刚好没有表面溢出的流动水为好。
3. 定期更换蛭石。如发现粪便或者食物残渣在 24 h 内有霉菌等微生物滋生或发现尖眼蕈蚊一类的蛆形虫出现，则应该立即更换蛭石。
4. 定期向饲养盒内蛭石加入水。对于蛭石的湿度保持，蛞蝓的要求最高，半蛞蝓次之，蜗牛最低。
5. 将采集来的亚成体和幼体标本放入饲养盒中。每个 20 cm × 12.5 cm × 7.5 cm 规格的饲养盒最多饲养贝壳直径 5 cm 的蜗牛 3 只，不然容易滋生螨虫。
6. 放置饲养盒于阴凉处。
7. 按猫/狗粮:蛋壳粉:燕麦片:小球藻片 = 3:4-14:2:1 的质量比将混合物磨粉，放入储物罐保存。其中蛋壳粉的作用是使饲料在与更多的水混合并补充钙质，使得变稀，部分蜗牛不吃太干燥的饲料，可以改变蛋壳粉占比来调节干湿程度。
8. 待使用时，用小汤匙将饲料粉末与水混合至糊状，放于没有蛭石的一半饲养盒底，如有剩余应该在 24 h 内清理。
9. 如果出现个体口腔部位脱落，鉴于目前没有任何治疗方案，也没有任何病因相关的

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

研究，应该立即进入标本制作的流程。

10. 如果出现个体仅有足露出且足没有反应并有腥味产生，则是死亡，DNA 大概率提取不出来，应该立刻更换垫材和饲养盒，用 75%的酒精对新饲养盒进行消毒，用蒸汽或者其他高温方式对蛭石进行消毒，之后转移其他个体并密切观察。
11. 如果出现螨虫且大规模爆发，则应该立即制作标本；如果出现少量螨虫，则严重的个体可用流水不停清洗软体部分，不存在螨虫的个体暂时隔离并密切观察，一律按照上述方法更换饲养盒和垫材。

三、标本制作

1. 将成体蜗牛活体放置于 5%乙醇或蒸馏水中 6-24 h 进行处死。这取决于标本个体的大小，标本越大，耗费时间往往越短。 用 5%乙醇放松标本，标本伸展不好，姿态不会是特别舒展的姿态，但是很少出现生殖孔有矢囊外翻的情况；用蒸馏水闷杀标本，标本伸展好，但是出现生殖孔有矢囊外翻的机率大大增加，这对于之后进行的生殖系统形态学研究不利。
2. 将标本固定在 75%乙醇中，并每隔两到三天更换一次 75%乙醇，共更换三次后保存于 75%乙醇。此过程完全取决于标本体积和容器内 75%乙醇体积的比较。
3. 选取标本两侧对称中轴线一侧的足部组织，放入装有无水乙醇的离心管中。此举是为了分子信息的提取与分析。足部组织的选取方式是为了方便对于半蛞蝓和蛞蝓的类群的形态学研究。
4. 将装有足部组织的离心管放入存放在同一个标本的瓶中，以防记混。

四、标本解剖

1. 将固态沥青放于一可加热的干净容器中，下置酒精灯加热使其熔化。
2. 将不同规格的培养皿放置于水平平面。
3. 将熔化的沥青倒入不同型号的培养皿中至培养皿深度的一半，制成沥青盘。待冷却后即可使用。
4. 表面不平整时，重新熔化即可。也可以用石蜡盘，但是加入酒精解剖时，表面会有一层油膜，对标本的观察和保存不利。
5. 将标本放置于盛有 75%乙醇溶液的沥青盘中，放置于体式显微镜下。

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

6. 用适当规格的昆虫针在贝壳的胚螺层略外一点钻一个小孔。若标本较大或者贝壳较厚昆虫针难以操作，可以用小刀刀尖在相应位置旋转打孔，但此时钻的孔会较昆虫针大，胚螺层易掉落。
7. 将 10 μl 移液枪头套在剪去头部的 1 ml 移液枪头上，并在 1 ml 移液枪头上套上橡胶吸球，制成冲洗工具。这样使得冲洗工具的出水口可以与钻的小孔衔接。
8. 将冲洗工具吸取保存标本的液体 (此处为 75%乙醇溶液) 后，将其出水口对准钻的小孔，待用乙醇溶液冲洗若干次，软体和贝壳略有分离。若遇见贝壳较薄或较为脆弱的情况，可以先解剖软体，不用先软体和贝壳分离，慢慢剥离出生殖器即可 (可能只能剥离出前端)。冲洗工具不应该用力怼在贝壳上，防止对贝壳的破坏。
9. 用镊子将软体部分沿螺旋线方向慢慢拔出，若感觉拉扯有阻力，则应该立即停止，重复冲洗，直到能分离。便
10. 待分离后，清洗沥青盘，更换沥青盘中的 75%乙醇溶液。
11. 将分离好的软体放置于盛有 75%乙醇溶液的沥青盘内，整个过程用眼科剪剥离即可，尖头镊子可辅助，拍照时可用昆虫针牵引固定。肺螺类一般生殖系统为中空管状，而原始类群则是系膜将各个系统相互连接，生殖系统对分类学的参考意义较小。这里，我们以肺螺类的生殖系统为例。同时，此处以多数的右旋标本为例，左旋标本在左右位置与右旋个体相反。
12. 从生殖孔在中轴线对称的左侧 (右旋个体的生殖孔位置在头部右侧) 的位置用眼科剪剪开一个开口，仅仅剪开皮肤组织，然后向头部两侧对称的对称轴剪去，从上触角和下触角之间剪开，然后继续朝向生殖孔方向剪去，将生殖孔一圈的皮肤剪开，此时整个头部皮肤差不多可以自由翻动且生殖器前端可以与其他系统分开。
13. 顺着生殖器前端，找到一个环形的管状结构 (为阴茎和受精管)，在这个管状结构有肌肉组织 (阴茎牵引肌) 与右侧皮肤内侧相连，将其与皮肤内侧的连接剪断。
14. 之后顺着生殖系统前端向后将整个生殖系统慢慢剥离出来。在靠近软体部分的末端 (与头部相反的一端)，可以看到一个明显的曲折的管状结构 (两性管)。此结构向前端有半圆柱状的蛋白腺，蛋白腺前端有易被扯断的受精囊球，此处单独剥离；此结构向后有很难剥离的两性腺，可以不剥离，留照即可，将两性腺管后端剪断。此时，便可将完整的生殖系统剥离出来。

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

结果与分析

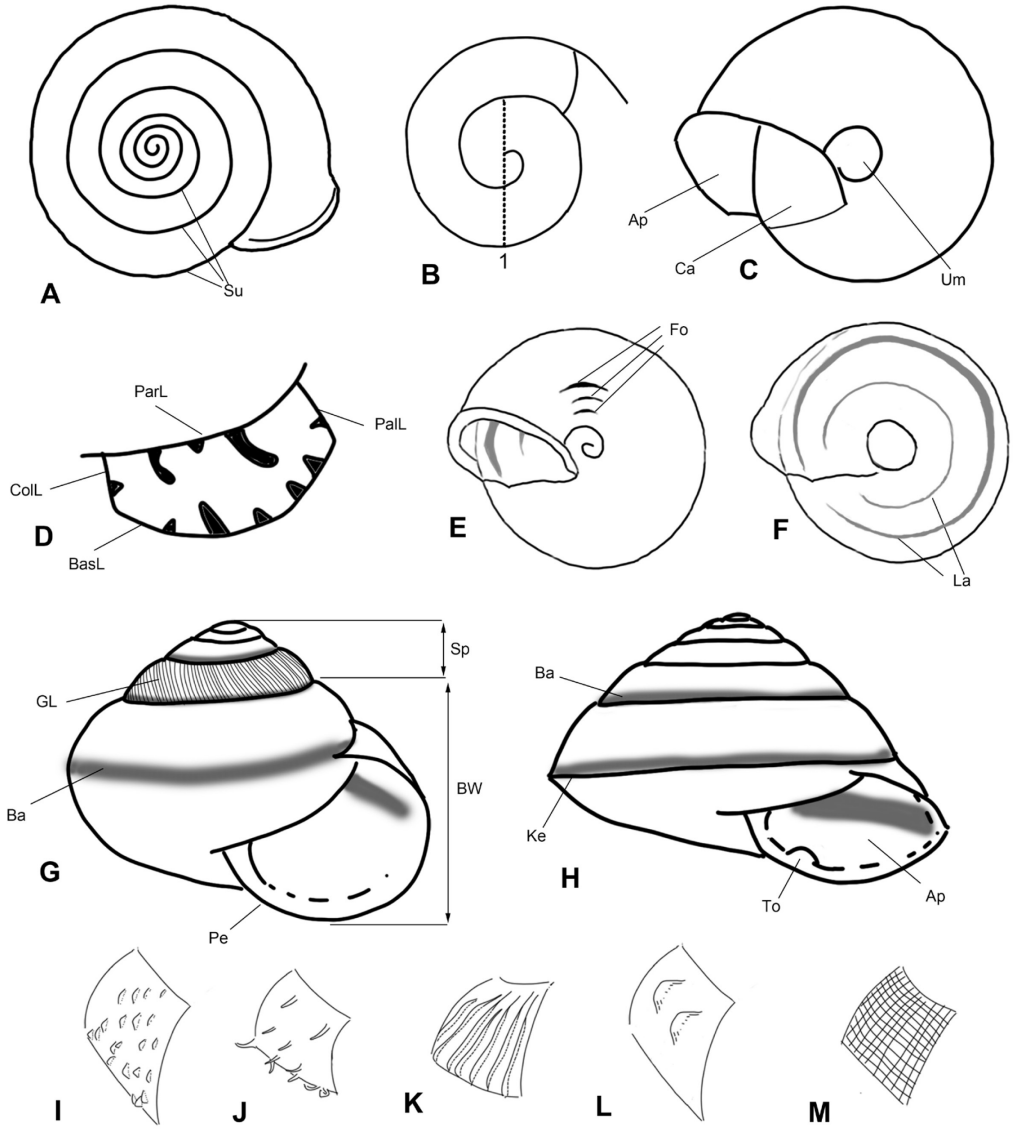

图 1. A 壳顶观视图；**B** 胚螺层，数字 **1** 位置为 **1** 个螺层位置；**C** 脐孔观视图；**D** 贝壳截面图；**E** 脐孔观透视图；**F** 脐孔观透视图；**G** 壳口观视图；**H** 龙骨突起贝壳壳口观视图；**I** 鳞片；**J** 毛；**K** 肋；**L** 结节；**M** 螺旋横沟和生长线交织 Ap—壳口 (Aperture)；Ba—色带 (Band)；BasL—基唇 (Basal Lip)；BW—体螺层 (Body Whorl)；Ca—胼胝部 (Callus)；ColL—轴唇 (Columellar Lip)；Fo—褶 (Fold)；GL—生长线 (Growth Lines)；Ke—龙骨突起 (Keel)；La—板 (Lamellae)；PalL—颚唇 (Palatal Lip)；ParL—壁唇 (Parietal Lip)；Pe—外壳唇 (Peristome)：Sp—螺旋部 (Spire)：Su—缝合线 (Sutures)；To—齿 (Tooth)。

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

1. 贝壳 (图 1)

白瓷状增厚 (ring-like thickening)：出现在壳口内；缺失。

壁唇突起 (parietalis)：出现，缺失。

齿 (tooth)：出现，缺失。若出现，数量，位置。[一般描述位于壳口的突起]

次生螺层 (teleoconch)：光滑；具生长线；具螺旋横沟和生长线；具毛；具鳞片。

颚唇突起 (palatalis)：出现，缺失。

缝合线 (suture)：深；浅。

呼吸管 (breathing tube)：出现，缺失。若出现，有细纹出现于上；光滑。

结节 (node)：出现；缺失。若出现，分布位置。

壳唇 (columella lip)：扩张；不扩张。翻折；不翻折。[可分为靠近螺轴的轴唇 (columellar lip)，与胼胝部相接的壁唇 (parietal lip)，其余部分分为近上端 (螺顶方向) 的颚唇 (palatal lip) 和近下端的基唇 (basal lip)]

壳口 (aperture)：形状。

肋 (ribs)：出现；缺失。每 mm 生长线条数。

鳞 (scar)：出现；缺失。若出现，分布位置。出现的生长时期。

龙骨突起 (keel)：出现；缺失。若出现，是否平滑；是否中空。出现的生长时期。

螺层 (whorls)：数量。颜色。

螺旋部 (spire)：除体螺层外的其他螺层。

螺旋横沟 (spiral furrows)：出现；缺失。若出现，分布位置。均匀分布；分布无规律。

螺轴 (columella)：垂直；倾斜。

毛 (hair)：出现；缺失。分布位置。出现的生长时期。

胚螺层 (protoconch)：光滑；具生长线；具螺旋横沟和生长线。

胼胝部 (callus)：明显，不明显。

板 (lamellae)：出现，缺失。[出现轴唇和壁唇上的增厚的片状结构]

脐孔 (umbilicus)：闭合；被壳口遮盖；未被壳口遮盖。占壳宽比。

色带 (band)：出现；缺失。数量。颜色。分布位置。

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

生长线 (growth line)：明显，不明显。每 mm 生长线条数。

厣痕 (constriction)：出现，缺失。[一般是厣收缩后所处的增厚处]

体螺层 (body whorl)：下降剧烈；下降和缓；不下降；上升。

外壳唇 (peristome)：薄；厚。

厣 (operculum)：出现，缺失。生长纹分布。

皱襞(plica)：出现，缺失。若出现，数量，位置。[一般用于描述贝壳内部的突起结构]

褶 (fold)：出现；缺失。[出现颚唇和基唇上的增厚的片状结构]

轴唇突起 (columellaris):出现，缺失。[在螺轴上的突起]

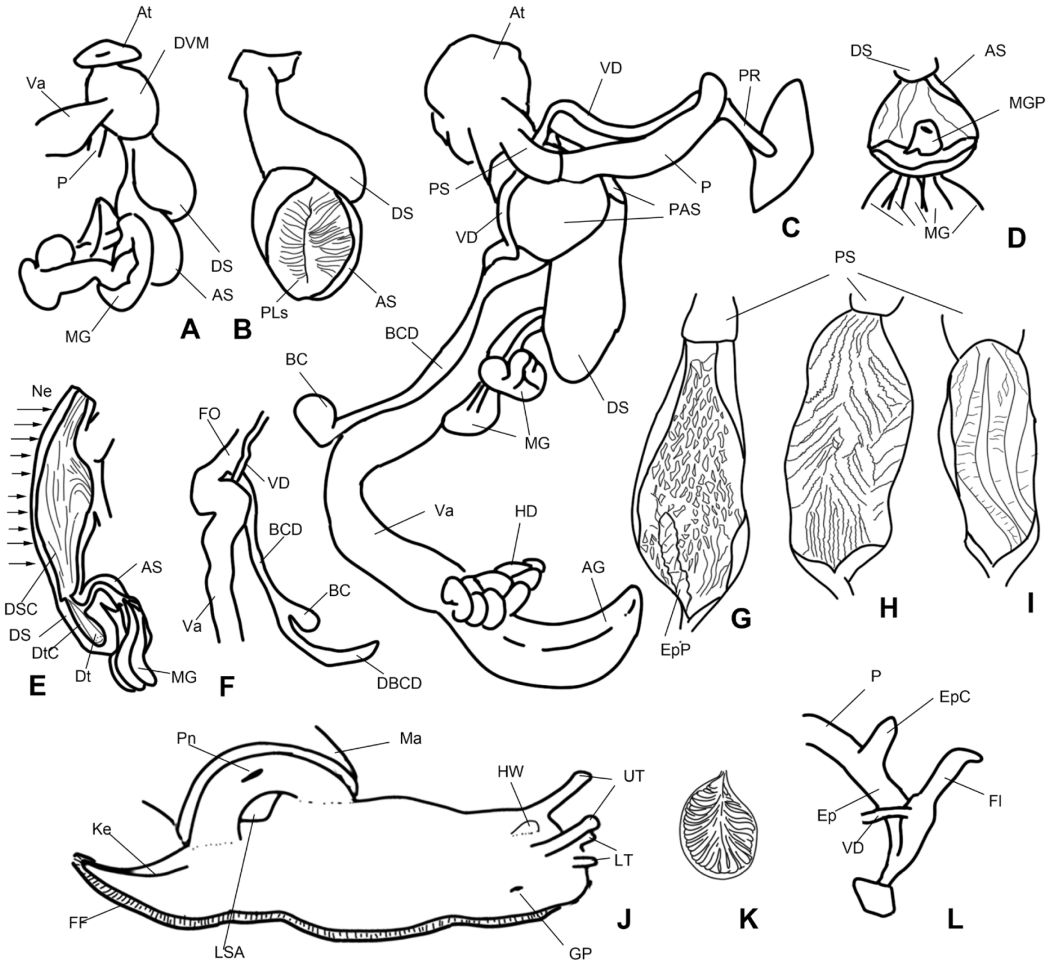

图 2. A-B 生殖器雄性部分局部图；**C** 生殖器全局图；**D** 副矢囊解剖图；**E** 雄性生殖器部分剖面图，箭头所指为颈状结构；**F** 生殖器雌性部分局部图；**G** 阴茎内褶交织成网状；**H** 阴茎内褶呈 V 形；**I** 阴茎内褶平行；**J** 软体部分；**K** 粘液腺聚成一簇；**L** 生殖器雄

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

性部分局部图 AG—蛋白腺 (Albumen Gland)；AS—副矢囊 (Accessory Sac)；At—前庭 (Atrium)；BC—受精囊 (Bursa Copulatrix)；BCD—受精囊管 (Bursa Copulatrix Duct)；DBCD—受精囊囊管盲囊 (Diverticle of Bursa Copulatrix Duct)；DS—矢囊 (Dart Sac)；DSC—矢囊腔 (Dart Sac Chamber)；Dt—恋矢 (Dart)；DtC—恋矢腔 (Dart Chamber)；DVM—前端囊状结构 (Membranous sac surrounding Dart sac and/or distal region of Vagina near atrium)；Ep—阴茎本体 (Epiphallus)；EpC—阴茎盲囊 (Epiphallic Caecum)；EpP—阴茎内突起 (Epiphallic Papillae)；FF—足缘 (Foot Fringe)；Fl—鞭状体 (Flagellum)；FO—游离输卵管 (Free Oviduct)；GP—生殖孔 (Genital Pore)；HD—两性腺管 (Hermaphroditic Duct)；HW—头瘤 (Head Wart)；Ke—嵴 (Keel)；LSA—叶形附属物 (Leaf-Shaped Appendage)；LT—下触角 (Lower Tentacle)；Ma—外套膜 (Mantle)；MG—粘液腺 (Mucous Glands)；MGP—粘液腺内突起 (Papilla of Mucous Glands)；Ne—颈状结构 (Neck)；P—阴茎 (Penis)；PAS—基副矢囊 (Proximal Accessory Sac)；PLs—多层片状结构 (Poly-Layered structure)；Pn—呼吸孔 (Pneumostome)；PR—阴茎牵引肌 (Penial Retractor)；PS—阴茎鞘 (Penial Sheath)；UT—上触角 (Upper Tentacle)；Va—雌道 (Vagina)；VD—输精管 (Vas Deferens)。

2. 软体部分

齿舌 (radula)：齿式。

颚片 (jaw)：出现，数量。缺失。

呼吸孔 (pneumostome)：位置。形状。

嵴 (keel)：出现；缺失。

头瘤 (head wart)：出现；缺失。

外套膜 (mantle)：覆盖百分比。

尾部 (tail)：形状。

叶形附属物 (leaf-shaped appendage) 出现，在左外套膜下；在右外套膜下；两侧均出现。缺失。

足缘 (foot fringe)：褶皱范围。褶皱形状。

3. 生殖系统 (图 2)

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

鞭状体 (flagellum)：出现；缺失。长度。

雌道 (vagina)：基部膨大；基部不膨大。

蛋白腺 (albumen gland)：长度。

多层片状结构 (poly-layered structure)：出现在副矢囊中；缺失。

副矢囊 (accessory sac)：出现；缺失。

基副矢囊 (proximal accessory sac)：出现，单个；多个。有孔洞通向矢囊腔；无孔洞。缺失。

恋矢 (love dart)：出现；缺失。刃数量。长度。

恋矢腔 (love dart chamber)：与粘液腺相通；无任何通入。内含恋矢数量。

两性腺 (hermaphroditic gland)：形状。

两性腺管 (hermaphroditic duct)：长度。

前端囊状结构 (membranous sac surrounding dart sac and/or distal region of vagina near atrium)：出现，包裹部位；缺失。

前庭 (atrium)：延长成颈状 (neck)；非延长。

矢囊 (dart sac)：出现；缺失。

矢囊腔 (dart sac chamber)：与阴茎相通，与雌道相通，与副矢囊相通，与基副矢囊；内含恋矢数量。

受精囊 (bursa copulatrix)：长度。

受精囊管 (bursa copulatrix duct)：长度。

受精囊囊管盲囊 (diverticle of bursa copulatrix duct / diverticulum)：出现，缺失。

输精管 (vas deferens)：长度。

输卵管 (oviduct)：长度。

阴茎 (penis)：短；长。粗，细。长度。

阴茎本体 (epiphallus)：长度。

阴茎内突起 (epiphallic papillae)：出现；缺失。形状。

阴茎内褶 (penial pilasters)：平行；交织成网状；呈 V 形。

阴茎牵引肌 (penial retractor / retractor muscle of the penis)：近前庭端粗；远前庭端粗。长度。

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

阴茎鞘 (penial sheath)：出现，短，长；缺失。长度。

阴茎盲囊 (epiphallic caecum)：出现；缺失。长度。

游离输卵管 (free oviduct)：长度。

粘液腺 (mucous glands / digitiform glands)：复杂分支；聚成一簇。长度。数量。

粘液腺内突起 (papilla of mucous glands / mucous glands insertion papilla)：出现；缺失。

致谢

感谢南京大学的 Dr 吴岷提供的蜗牛饲料的初步配方。感谢山东师范大学王恩翠在语言上的帮助。

竞争性利益声明

作者声明没有利益冲突。

参考文献

1. 陈德牛，高家祥. (1981). 陆生贝类标本的采集、保存及其外生殖器、齿舌、颚片的制作方法. *生物学通报* 58-59.
2. 陈德牛，张国庆. (1996). 陆生和淡水贝类标本的采集、保存及其外生殖器、齿舌和颚片的制作方法. *植物检疫* 10(2): 78-81.
3. 郭阳阳，谢敏，钟小婷，张卫红. (2015). 陆生贝类齿舌、颚片电镜样品的制备方 法. *四川动物* 34(5): 725-728.
4. 黄重期. (2017). 蜗牛解剖. schoolweb.tn.edu.tw [Access: 18 Apr 2021]
5. 金志良. (1993). 低旋巴蜗牛生殖系统的解剖. 贝类学论文集.
6. 吴岷. (2002). 陆生贝类的采集、饲养及标本制作. *生物学通报* 37(2): 61-62.
7. 薛德焴. (1934). *动物解剖丛书 卷七 蜗牛*. 新亚书店. 上海.
8. 张卫红，刘爱玲，陈少丹，黄丽，吴松林. (2016). 蜗牛的解剖. *生物学通报* 45(3): 45-46.
9. Cuezzo, M. G. (1998). Cladistic analysis of the xanthonychidae (= helminthoglyptidae) (gastropoda: stylommatophora: helicoidea). *Malacologia*

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

39(1): 93-111.

10. Cuezzo, M. G. (2003). Phylogenetic analysis of the Camaenidae (Mollusca: Stylommatophora) with special emphasis on the American taxa. *Zool J Linn Soc* 138(4): 449-476.
11. Fukuda, H., Haga, T. and Tatara, Y. (2008). Niku-nuki: a useful method for anatomical and DNA studies on shell-bearing. *Zoosymposia* 1: 15-38.
12. Kerney, M. P. and Cameron, R. A. D. (1979). *A field guide to the land snails of Britain and North-West Europe*. Collins. London.
13. Lőw, P., Molnár, K. and Kriska, G. (2016). Dissection of a Snail (Helix pomatia). In: Lőw, P., Molnár, K. and Kriska, G. (Eds.). In: *Atlas of Animal Anatomy and Histology*. Cham: Springer International Publishing.
14. Tryon, G. W. (1887). Manual of conchology, structural and systematic: with illustrations of the species. Philadelphia: Conchological Section of the Academy of Natural sciences of Philadelphia.
15. White-McLean, J. A. (2011). Snail Dissection. Retrieved from https://idtools.org/id/mollusc/dissection_snail.php.
16. Wu, M. (2004). Preliminary phylogenetic study of Bradybaenidae (Gastropoda: Stylommatophora: Helicoidea). *Malacologia* 46: 79-125.
17. Yen, Y. H. and Hwang, C. C. (2016). Reproductive system of Aegista taiwanica Kuroda, 1941 (Gastropoda Bradybaenidae). *Bulletin of Malacology, Taiwan* 39: 37-46.

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.