

ICS 65.150

CCS B 50

T/GDSF

广东水产学会团体标准

T/GDSF 0009—2022

南海岛礁海域贝类生态增殖技术规范

Technical specifications for ecological enhancement and of reef-inhabiting shellfish
in South China Sea

2022 – 11 – 30 发布

2022 – 12 – 1 实施

广东水产学会 发布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 海域选择 1

 4.1 自然条件 1

 4.2 水质理化条件 1

5 物种选择 2

6 种苗培育及苗种要求 2

7 生态增殖 2

 7.1 苗种的适应性驯化及优选 2

 7.2 苗种运输方法 2

 7.3 底播增殖 3

8 增殖容量 3

9 生态增殖效果评估 3

 9.1 基于贝类生物量的增殖效果评估 3

 9.2 基于环境 DNA 的增殖效果评估 4

 9.3 基于增殖群体回捕占比率的增殖效果评估 4

10 管理 4

附 录 A （规范性） 贝类生态增殖放流情况记录表..... 5

 A.1 贝类生态增殖放流情况记录表 5

附 录 B （资料性） 基于贝类环境 DNA 的贝类丰度计算..... 6

 B.1 特异性 qPCR 扩增引物设计 6

 B.2 PCR 扩增、质粒构建及质粒标准模板制备 6

 B.3 DNA 标准定量曲线制作 6

 B.4 环境 DNA 的 qPCR 扩增及贝类丰度计算 6

附 录 C （资料性） 基于微卫星分子标记的贝类底播回捕占比率计算..... 7

 C.1 样本采集 7

 C.2 样本保存 7

 C.3 样本 DNA 提取 7

 C.4 多态性 SSR 位点的筛选 7

 C.5 PCR 扩增及基因分型..... 7

 C.6 特定种类贝类回捕抽样样本的遗传区分及回捕占比率计算 7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由广东水产学会提出并归口。

本文件起草单位：中国科学院南海海洋研究所、海南大学、广西科学院、广西精工海洋科技有限公司、湛江市东海岛东方实业有限公司。

本文件主要起草人：胡超群、黄勃、张跃环、刘文广、陈偿、罗鹏、李军、马海涛、秦艳平、陈移、张华、王小兵、姜发军、柯志新、宋建强、陈文林。

南海岛礁海域贝类生态增殖技术规范 (报批稿)

1 范围

本文件规定了南海岛礁海域贝类生态增殖的海域选择、物种选择、种苗培育及苗种要求，描述了生态增殖效果监测与评估的方法，提供了贝类生态增殖管理的指导意见。

本文件适用于南海岛礁海域贝类的生态增殖。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB 11607 渔业水质标准

DB33/T 846 海洋底栖贝类增殖放流技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

原生种 Original species

在无人为干预的野生环境下自然演化而来的物种。

3.2

生态增殖 Ecological enhancement

采用放流、移植或栽培、底播等人工方式，在生态系统承载力范围内，利用天然生产力增加生物种群产量的过程。

3.3

适应性驯化 Adaptive domestication

增殖放流苗种适应野外海域环境的人工培育和处理过程。

3.4

底播增殖 Bottom sowing for stock enhancement

通过播撒底栖生物苗种到适合的海底生境，利用天然生产力增加放流种群产量的过程。

3.5

环境 DNA Environmental DNA

是指从环境样本中提取的所有DNA的集合，包括环境微生物以及从生物体上脱落下来的活细胞DNA和因生物死亡后细胞破碎而游离出的胞外DNA。

4 海域选择

4.1 自然条件

根据岛礁环境特点，结合历史资料、捕捞生产信息以及资源生态环境的本底调查资料，针对不同种类的贝类，筛选确定贝类生态增殖的海域。增殖海域应生态环境良好、饵料生物丰富、水流畅通。

4.2 水质理化条件

增殖海域的水质理化因子应符合表1的要求。

表1 南海岛礁贝类增殖海域水质理化因子要求

水质理化因子	参数
水温	18℃~35℃
盐度	25~35
pH	8.0~9.0
底层溶解氧	4.0mg/L~10.0mg/L
透明度	>20cm
其它水质因子	符合GB 11607规定

5 物种选择

选择来自南海海域的礁栖贝类原生种，禁止采用外来种、杂交种、转基因种以及其他不符合生态要求的贝类物种进行生态增殖。适合南海岛礁海域生态增殖的主要贝类种类为羊鲍（*Haliotis ovina*）、杂色鲍（*H. diversicolor*）、大马蹄螺（*Trochus niloticus*）、塔形马蹄螺（*T. pyramis*）、马氏珠母贝（*Pinctada martensi*）、大珠母贝（*P. maxima*）、无鳞砗磲（*Tridacna derasa*）、鳞砗磲（*T. squamosa*）、番红砗磲（*T. crocea*）和福建牡蛎（*Crassostrea angulata*）。

6 种苗培育及苗种要求

用于生态增殖的人工繁育贝苗和底播贝苗应活动力强、外观无损伤、无畸形、规格整齐。规格应符合表2的要求。

表2 南海岛礁贝类底播生态增殖苗种规格

规格等级	体长
小规格	0.5cm~1cm
中等规格	1cm~3cm
大规格	>3cm

7 生态增殖

7.1 苗种的适应性驯化及优选

7.1.1 苗种的适应性驯化

贝类苗种的适应性驯化方法如下：

- 在室内人工养殖环境下，从稚贝开始，饵料以麒麟菜和石莼为主，以人工饲料为辅，对贝类进行适应性食性驯化；
- 在底播生态增殖前对贝类苗种进行为期 7d 的躲避天敌能力的适应性驯化，在室内养殖池内每 10m² 投放等规格蟹 5 只；
- 第 8d 不投喂饲料，只进行大量换水，并进行吸底，以去除贝苗的排泄物。

7.1.2 驯化苗种优选

挑选驯化条件下状态良好的贝类苗种用于底播。在贝类苗种中挑选健壮、活力好的个体，进行运输和底播生态增养殖。

7.2 苗种运输方法

选择适合长途运输的水运法和适合短途运输的充气干运法进行贝类苗种运输。

7.2.1 水运法

一般采用水车，在车内用空调控温，内有充气装置及降温设备，运输时间宜控制在 48h 以内，运输时间大于 48h 时，需就地暂养后再进行运输。

7.2.2 干运法

7.2.2.1 充气干运法：适合短途运输。将贝类苗种放入双层塑料袋内，每个塑料袋内放置贝苗 500 个～1000 个，注入纯氧后，将塑料袋放入泡沫箱内，密封。将泡沫箱放入转运框中，盖上顶盖以防贝体逃出。运输时间宜控制在 10h 以内。

7.2.2.2 非充气干运法：适合部分牡蛎苗种的短途运输。此方法一般保持苗种及附着体湿润即可。

7.3 底播增殖

7.3.1 底播时间

南海岛礁海域贝类苗种的底播最适宜月份为每年的3月～12月。

7.3.2 底播天气

选择晴朗、多云或阴天进行底播生态增殖，海面最大风力≤5级，气温≤35℃。

7.3.3 运输船及暂养桶

根据运输量以及放流海域的水深，选择合适大小的渔船或快艇作为运输船，运输船应有遮阴设施和配置移动式增氧泵，可平稳放置暂养桶，暂养桶体积为 100L～300L，每个暂养桶放置增氧气石 1 个。对于部分牡蛎苗种，一般保持苗种及附着体湿润即可。

7.3.4 苗种运输

以抄网将贝苗从暂养网箱内捞至装有清洁海水的暂养桶内，暂养桶每桶放置贝苗5000个～15000个；对于部分牡蛎苗种，一般保持苗种及附着体湿润即可。将贝类苗种运输至底播预定海域。

7.3.5 苗种底播

船速：2m/s～4m/s，投放密度：0.1个/m²～0.2个/m²，苗种底播按照DB33/T 846中的方法进行，记录投放中心位点的GPS坐标、投放数量和覆盖范围（距中心位点坐标的距离），填写贝类增殖放流情况记录表（参见附录A）。

8 增殖容量

不超过增殖海域历史上礁栖贝类最大捕捞产量的2倍。

9 生态增殖效果评估

9.1 基于贝类生物量的增殖效果评估

基于潜水调查结果，根据底播增殖实施前后增殖海域和对照海域（未实施贝类增殖的临近海域）的贝类生物量变化来评估生态增殖效果。底播增殖实施前增殖海域和对照海域的本底贝类生物量分别为 B_{Q1} 和 B_{QC1} ；底播增殖一年后增殖海域和对照海域的贝类生物量分别为 B_{Q2} 和 B_{QC2} 。生态增殖效果评估值（ R_Q ）计算公式如下：

$$R_Q = [(B_{Q2}/B_{Q1}) / (B_{QC2}/B_{QC1}) - 1] \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- R_Q ——增殖效果评估值，单位为%；
- B_{Q1} ——增殖海域的本底贝类生物量，单位为个/hm²；
- B_{Q2} ——实施一年后增殖海域的贝类生物量，单位为个/hm²；
- B_{QC1} ——对照海域的本底贝类生物量，单位为个/hm²；
- B_{QC2} ——实施一年后对照海域的贝类生物量，单位为个/hm²。

按照表3的分级标准，进行贝类生态增殖效果的分级评估。

表3 基于贝类生物量的生态增殖效果评估分级

指标	增殖效果分级			
	优	良	一般	差
增殖效果评估值 (R_Q)	$>30\%$	$30\% \geq R_Q \geq 20\%$	$20\% > R_Q \geq 10\%$	$<10\%$

9.2 基于环境 DNA 的增殖效果评估

调查增殖海域和对照海域的贝类环境DNA丰度（方法参见附录B），根据底播增殖实施前后增殖海域和对照海域贝类环境DNA的丰度变化来评估生态增殖效果。底播增殖实施前增殖海域和对照海域的本底贝类环境DNA丰度分别为 B_{E1} 和 B_{EC1} ；底播增殖一年后增殖海域和对照海域的贝类环境DNA丰度分别为 B_{E2} 和 B_{EC2} 。生态增殖效果评估值（ R_E ）计算公式如下：

$$R_E = [(B_{E2}/B_{E1})/(B_{EC2}/B_{EC1}) - 1] \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- R_E ——增殖效果评估值，单位为%；
 - B_{E1} ——增殖海域的本底贝类环境DNA丰度，单位为拷贝/mL；
 - B_{E2} ——实施一年后增殖海域的贝类环境DNA丰度，单位为拷贝/mL；
 - B_{EC1} ——对照海域的本底贝类环境DNA丰度，单位为拷贝/mL；
 - B_{EC2} ——实施一年后对照海域的贝类环境DNA丰度，单位为拷贝/mL。
- 按照表4的分级标准，进行贝类生态增殖效果的分级评估。

表4 基于环境 DNA 的贝类生态增殖效果评估分级

指标	增殖效果分级			
	优	良	一般	差
增殖效果 (R_E)	$>30\%$	$30\% \geq R_E \geq 20\%$	$20\% > R_E \geq 10\%$	$<10\%$

9.3 基于增殖群体回捕占比率的增殖效果评估

在贝类底播增殖实施一年后，在增殖海域进行贝类增殖群体回捕，基于微卫星分子标记的贝类底播回捕占比率的计算方法参见附录C。

按照表5的分级标准，进行贝类生态增殖效果的分级评估。

表5 基于增殖群体回捕占比率的贝类生态增殖效果评估分级

指标	增殖效果分级			
	优	良	一般	差
增殖群体回捕占比率 (R_H)	$>20\%$	$20\% \geq R_H \geq 10\%$	$10\% > R_H \geq 5\%$	$<5\%$

10 管理

贝类增殖放流后，应定期巡查放流海域，防止非法捕捞增殖放流的贝类资源。

附 录 A
(规范性)
贝类生态增殖放流情况记录表

A.1 贝类生态增殖放流情况记录表

贝类生态增殖放流情况记录表见表A.1。

表A.1 贝类生态增殖放流情况记录表

增殖放流单位：		记录日期：	
贝类种类		放流日期	
放流人员		放流海域	
气温		水温	
盐度		pH	
放流数量		规格	
放流海域中心位点 GPS 坐标			
放流海域边缘坐标 1		放流海域边缘坐标 2	
放流海域边缘坐标 3		放流海域边缘坐标 4	
放流海域边缘坐标 5		放流海域边缘坐标 6	
放流海域边缘坐标 7		放流海域边缘坐标 8	
放流海域边缘坐标 9		放流海域边缘坐标 10	
放流海域边缘坐标 11		放流海域边缘坐标 12	

记录人：_____ 核对人：_____

附录 B

(资料性)

基于贝类环境 DNA 的贝类丰度计算

B.1 特异性 qPCR 扩增引物设计

针对特定贝类种类的线粒体COI基因或基因组DNA特异区域设计种特异性qPCR扩增引物，引物设计的原则为：引物特异性强，长度19bp~22bp，GC含量40%~60%，碱基分布均匀，扩增片段长度为150bp~200bp。

B.2 PCR 扩增、质粒构建及质粒标准模板制备

以目标贝类的DNA为模板，进行常规的贝类特异性PCR扩增，进行PCR产物纯化，采用常规的方法进行PCR产物克隆与质粒转化，提取质粒，溶于50μL ddH₂O中，-20℃保存，测量质粒的浓度。质粒拷贝数计算公式为：

$$ST = 6.02 \times 10^{23} \times CON \times 0.66 \times NT \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

ST——质粒拷贝数，单位为拷贝/μL；

CON——质粒检测浓度，单位为μg/μL；

NT——质粒碱基数量，单位为bp。

B.3 DNA 标准定量曲线制作

将质粒分别稀释至 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 和 10^8 拷贝/μL，作为标准模板，模板量为1μL，进行常规qPCR扩增，以测得的Ct值为纵坐标，以质粒模板拷贝数的对数为横坐标，绘制目标贝类DNA标准定量曲线。

B.4 环境 DNA 的 qPCR 扩增及贝类丰度计算

B.4.1 环境DNA提取

使用标准的采水器收集贝类生态增殖海域的底层海水，每个点采集500mL海水样品，使用0.22μm滤膜对底层海水进行过滤，剪碎滤膜，采用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒对滤膜上的生物样本进行DNA提取，提取后的DNA溶于50μL ddH₂O中，-20℃保存，作为环境DNA。

B.4.2 环境DNA的qPCR扩增及特定种类贝类DNA的定量

以1μL上述提取的环境DNA为模板，进行常规qPCR扩增，扩增体系为20μL，测量样品Ct值，通过标准曲线，求得Ct值所对应的模板中特定种类贝类DNA的拷贝数。

B.4.3 基于环境DNA的贝类丰度计算

在调查海域设置采样点6个，采集采样点的海域底层海水500mL，提取环境DNA，并按照本文件B.4.2的方法对样品中特定种类贝类的DNA进行定量，分别计为 D_{SC1} ~ D_{SC6} ，调查海域特定种类贝类DNA的平均拷贝数（ D_{SC} ）即为特定种类贝类环境DNA的丰度值， D_{SC} 的计算公式为：

$$D_{SC} = (D_{SC1} + D_{SC2} + D_{SC3} + D_{SC4} + D_{SC5} + D_{SC6}) / 6 \dots\dots\dots (B.2)$$

式中：

D_{SC} ——调查海域特定种类贝类DNA的平均拷贝数，单位为拷贝/mL；

D_{SC1} ~ D_{SC6} ——调查海域第1个~6个采样点特定种类贝类DNA的拷贝数，单位为拷贝/mL。

附 录 C

(资料性)

基于微卫星分子标记的贝类底播回捕占比率计算

C.1 样本采集

对于生态增殖区的同种类贝类，底播增殖前分别采集原生种群和底播苗种群体样本各50个~60个，回捕时随机抽取50个~60个回捕样本。

C.2 样本保存

样本采集后，用剪刀剪取一块200mg~500mg的体壁组织，置于10mL离心管中，加入5mL 95%乙醇，常温运至实验室保存。

C.3 样本 DNA 提取

采用常规的海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒提取贝类样本DNA，DNA浓度 $\geq 50\text{ng}/\mu\text{L}$ ， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.8\sim 2.0$ 。

C.4 多态性 SSR 位点的筛选

对不同来源的特定种类贝类进行基因组测序并利用MISA软件查找具有地理差异的特定种类贝类的SSR位点，采用Primer Premier 5软件设计引物，对不同来源的特定种类贝类基因组DNA进行PCR扩增，采用遗传分析仪对PCR扩增产物进行分型，并利用GeneMapper 3.2软件读取等位基因片段的长度，采用Cervus软件计算期望杂合度(He)、观测杂合度(Ho)及多态性信息含量(PIC)，筛选出20个~30个具有高度多态性的特定种类贝类的SSR标记。

C.5 PCR 扩增及基因分型

利用本文件C.4中具有高度多态性的SSR标记的特异性引物，对特定种类的贝类样本进行PCR扩增。PCR反应体系25 μL ，包括：10 $\times$ PCR buffer 2.5 μL 、10 mM dNTP 0.5 μL 、高保真PCR酶1U、正向引物(10 μM) 0.5 μL 、反向引物(10 μM) 0.5 μL 、DNA模板1 μL ，其余由无菌双蒸水补足至25 μL 。PCR扩增程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30s，52 $^{\circ}\text{C}$ ~58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30s，共32个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸6min。采用遗传分析仪对PCR扩增产物进行分型。

C.6 特定种类贝类回捕抽样样本的遗传区分及回捕占比率计算

C.6.1 特定种类贝类回捕抽样样本的遗传区分

利用本文件C.5的分型结果，通过相关软件对三个群体（原生种群、放流苗种和回捕样本）进行遗传分析，鉴定特定种类贝类的回捕抽样样本与同种类底播苗种群体和原生种群间的遗传距离，如回捕抽样样本与底播苗种群体具有相似的分子遗传特征，且聚为一类时，可确定其为底播群体的回捕个体。

C.6.2 贝类底播回捕占比率计算

统计特定种类贝类回捕抽样样本中底播群体的回捕个体数，并按如下公式计算贝类底播回捕占比率：

$$R_H = (C_n/C_t) \times 100\% \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

R_H ——贝类底播回捕占比率，单位为%；

C_n ——特定种类贝类回捕抽样样本中底播群体的回捕个体数，单位为个；

C_t ——特定种类贝类回捕抽样样本的总个体数，单位为个。