



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114258878 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 01

(21) 申请号 202111386863.3

(22) 申请日 2021.11.22

(71) 申请人 中国科学院南海海洋研究所

地址 511458 广东省广州市南沙区海滨路  
1119号

(72) 发明人 张跃环 李军 秦艳平 马海涛  
喻子牛

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限  
公司 44001

代理人 刘明星 朱聪聪

(51) Int. Cl.

A01K 61/50 (2017.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种砗磲亲本原位催产方法

(57) 摘要

本发明公开了一种砗磲亲本原位催产方法。它包括亲本选择、原位催产、幼虫检查、催产效应评估等技术环节。本发明不同于砗磲全人工繁育方法,筛选野外半封闭潟湖等环境作为催产场,夜间进行原位催产,尽最大努力模拟人工苗种生产过程,规避风险和敌害,批量化获得与野生苗种一致的人工催产型苗种;结合现代分子标记技术进行亲子识别,评估其原位催产效应。本发明充分利用了砗磲幼虫期浮游特性,借助于海浪、洋流等实现大面积扩散,形成部分砗磲苗种聚集区,为今后砗磲繁育提供充足的亲本,为我国南海砗磲资源快速修复提供技术保障。本发明具有简便易行、效果显著等优点。

1. 一种砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、性腺监测:在我国南海野外岛礁海域、潟湖或环礁的5-30米水深无浪区环境中,通过潜水找到野生或人工移植砗磲分布群,进行定位,记录好亲本群站点位置,定期观察性腺发育情况;

b、原位催产:当性腺发育成熟时,潜水至砗磲群分布区,采用催产剂注射至外套膜中进行原位催产;

c、幼虫检查:亲本原位催产后,在岛礁海域、潟湖或环礁海域多点收集水中浮游生物,过滤大个体杂质;利用酒精固定后,观测幼虫数量;然后检测足面盘幼虫的丰度和数量;识别是不是砗磲幼虫、是哪一种砗磲子代、是不是原位催产子代;

d、催产效率评估:催产6-9个月后,检查原位催产站点所在的岛礁海域、潟湖、环礁周边是否有10-30mm左右的新生砗磲苗种,取回来若干个个体,进行亲子鉴定,检测其原位催产的效率,计算催产获得子代的数量。

2. 根据权利要求1所述的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,所述的步骤b中,催产剂是五羟色胺溶液,其使用剂量为五羟色胺/砗磲总重=0.3-0.5mg/kg范围内。

3. 根据权利要求1所述的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,所述的步骤c中,特异性的分子标记是指可以同时区分3-5种以上砗磲的复合PCR引物组合,可以有效的区分幼虫的组成及其亲本来源。

4. 根据权利要求1所述的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,所述的步骤d中,通过单位面积砗磲子代数量、种类,亲子鉴定技术,评估原位催产效率极其为其资源恢复的可行性。

5. 根据权利要求1所述的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,所述的步骤a中是用GPS进行定位。

6. 根据权利要求1所述的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,所述步骤a中的定期观察性腺发育情况是通过肉眼观察+显微取样相结合的办法定期观察性腺发育情况。

7. 根据权利要求1所述的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,所述的步骤b中,在进行原位催产时,每次注射只选择一种砗磲进行注射;催产时间控制在1h内;催产时间选择在夜间8-10点;先搜集排放中的卵子,之后散开与新排出精子结合,促使受精卵随着海浪漂流。

8. 根据权利要求1所述的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,所述的步骤c的幼虫检查为:亲本原位催产24h后,利用300目筛绢网在潟湖、环礁等海域多点收集水中浮游生物,采用大网目过滤大个体杂质;利用酒精固定后,观测幼虫数量;原位催产7d后,再一次检测足面盘幼虫的丰度和数量;为了确定是不是砗磲幼虫、是哪一种砗磲子代、是不是原位催产子代,需要用特异性的分子标记进行识别。

9. 根据权利要求1所述的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,所述的步骤d的取回来若干个个体,进行亲子鉴定,检测其原位催产的效率,计算催产获得子代的数量是取回来若干个个体,进行亲子鉴定,以催产亲本和野外苗种的DNA为材料,利用微卫星等标记来检测其原位催产的效率,计算催产获得子代的数量。

## 一种砗磲亲本原位催产方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于海洋农业中贝类繁育养殖技术领域,具体涉及一种砗磲亲本原位催产方法。

### 背景技术

[0002] 砗磲是软体动物门瓣鳃纲砗磲科生物的统称,有2属12种,广泛分布于从西太平洋到印度洋非洲东海岸的热带珊瑚礁海域。在我国有分布着8种砗磲,它们分别是砗磲属的大砗磲(*Tridacna gigas*)、无鳞砗磲(*Tridacna derasa*)、鳞砗磲(*Tridacna squamosa*)、长砗磲(*Tridacna maxima*)、诺瓦砗磲(*Tridacna nova*)、番红砗磲(*Tridacna crocea*)以及砗蚝属的砗蚝(*Hippopus hippopus*)和瓷口砗蚝(*Hippopus porcellanus*)。

[0003] 我国南海珊瑚礁的潟湖、堡礁、岛礁的礁盘都是砗磲的原有分布海域,由于砗磲固着生活在热带浅层透明海域的习性使其极易被捕捞,环境恶化、人为盗捕等原因,导致砗磲数量锐减,大砗磲活体几乎灭绝,无鳞砗磲基本上功能性灭绝,其他砗磲也很少见。对此,中国科学院南海海洋研究所于2016年突破了砗磲的人工繁育技术,培育出5种砗磲和2种砗蚝的健康苗种,开展了砗磲在我国南海的增殖放流,实现了砗磲资源量增加。然而,人工底播增殖数量很难满足我国南海砗磲资源恢复需求量,对此,迫切需要开发一种高效率的催产技术,借助海浪、洋流等力量实现砗磲苗种大面积原位增殖,从而达到实现砗磲资源恢复的目的。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种简便易行、效果显著的砗磲亲本原位催产方法。

[0005] 本发明的砗磲亲本原位催产方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0006] a、性腺监测:在我国南海野外岛礁海域、潟湖、环礁等地的5-30米水深无浪区环境中,通过潜水找到野生或人工移植砗磲分布群,进行定位,记录好亲本群站点位置,定期观察性腺发育情况;

[0007] b、原位催产:当性腺发育成熟时,潜水至砗磲群分布区,采用催产剂注射至外套膜中进行原位催产;

[0008] c、幼虫检查:亲本原位催产后,在潟湖、环礁等海域多点收集水中浮游生物,过滤大个体杂质;利用酒精固定后,观测幼虫数量;然后检测足面盘幼虫的丰度和数量;识别是不是砗磲幼虫、是哪一种砗磲子代、是不是原位催产子代;

[0009] d、催产效率评估:催产6-9个月后,检查原位催产站点所在的潟湖、环礁周边是否有10-30mm左右的新生砗磲苗种,取回来若干个个体,进行亲子鉴定,检测其原位催产的效率,计算催产获得子代的数量。

[0010] 优选,所述的步骤a中,砗磲分布群可以野生状态下的分布群,也可以是人工移植后的砗磲分布群,但是一定要达到性成熟年龄,确保可以产出精卵。

[0011] 优选,所述的步骤b中,催产剂是五羟色胺溶液,其使用剂量为五羟色胺/砗磲总重

=0.3-0.5mg/kg范围内。

[0012] 优选,所述的步骤c中,特异性的分子标记是指可以同时区分3-5种以上砗磲的复合 PCR引物组合,可以有效的区分幼虫的组成及其亲本来源。例如参见Ma,H.,Feng,H.,Zhang, Y.,Qin,Y.,Xiang,Z.,Li,J.,Zhang,Y\*.,Yu,Z\*. Multiplex species-specific PCR identification of native giant clams in the South China Sea:a useful tool for application in giant clam stock management and forensic identification. *Aquaculture* 2021,531:735991。

[0013] 优选,所述的步骤d中,通过单位面积砗磲子代数量、种类,亲子识别技术,评估原位催产效率极其为其资源恢复的可行性。

[0014] 优选,所述的步骤a中是用GPS进行定位。

[0015] 优选,所述的定期观察性腺发育情况是通过肉眼观察+显微取样相结合的办法定期观察性腺发育情况。

[0016] 优选,所述的步骤b中,在进行原位催产时,为了获得纯种砗磲资源,每次注射只选择一种砗磲进行注射;为了保障配子的交配效率,催产时间控制在1h内;为了减小野外天敌对配子的食用概率,催产时间选择在夜间8-10点;为了提高卵子使用效率,先搜集排放中的卵子,之后散开与新排出精子结合,促使受精卵随着海浪漂流。

[0017] 优选,所述的步骤c的幼虫检查为:亲本原位催产24h后,利用300目筛绢网在潟湖、环礁等海域多点收集水中浮游生物,采用大网目过滤大个体杂质;利用酒精固定后,观测幼虫数量;原位催产7d后,再一次检测足面盘幼虫的丰度和数量;为了确定是不是砗磲幼虫、是哪一种砗磲子代、是不是原位催产子代,需要用特异性的分子标记进行识别。

[0018] 优选,所述的步骤d的取回来若干个个体,进行亲子鉴定,检测其原位催产的效率,计算催产获得子代的数量是取回来若干个个体,进行亲子鉴定,以催产亲本和野外苗种的DNA为材料,利用微卫星等标记来检测其原位催产的效率,计算催产获得子代的数量。

[0019] 本发明不同于砗磲全人工繁育方法,筛选野外半封闭潟湖等环境作为催产场,夜间进行原位催产,尽最大努力模拟人工苗种生产过程,规避风险和敌害,批量化获得与野生苗种一致的人工催产型苗种;结合现代分子标记技术进行亲子识别,评估其原位催产效应。本发明充分利用了砗磲幼虫期浮游特性,借助于海浪、洋流等实现大面积扩散,形成部分砗磲苗种聚集区,为今后砗磲繁育提供充足的亲本,为我国南海砗磲资源快速修复提供技术保障。本发明具有简便易行、效果显著等优点。

### 具体实施方式:

[0020] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0021] 实施例1:

[0022] a、亲本促熟:2020年3月中旬,在我国西沙群岛永兴岛潟湖的10m水深无浪区环境中,2个潜水员对其砗磲资源进行了调查,发现了13个成体诺瓦砗磲(壳长在20-30cm),分布在3m<sup>2</sup>的面积内,利用GPS定位了该站点;通过肉眼观察,发现其性腺部位呈现橘红色,说明性腺尚未成熟,利用注射器抽取了一点点性腺部分组织,发现小部分精子可以跳动,卵子直径在80-90μm,尚未达到成熟;直至5月1日,通过GPS定位,找到该站点,潜水后发现这些诺瓦砗磲性腺呈现棕黄色,说明已经成熟,进一步采用显微镜检测,发现精子活跃,卵子直径

100 $\mu\text{m}$ ,卵黄颜色深,说明卵子已经成熟;

[0023] b、原位催产:当其性腺发育成熟后,潜水员在夜间8点,带着防水手电进行夜潜,找到砗磲群后,利用注射器按照0.3mg/kg剂量五羟色胺溶液注射至10个诺瓦砗磲的外套膜中,2-3min后,诺瓦砗磲开始排放精子,大约持续了15min,停止了10min左右,开始排放卵子;潜水员用事先准备好的400目网袋收集卵子;之后在给另外3个诺瓦砗磲催产,当期其排放精子时,将收集的卵子散置于雾状精子中,实现了受精作用,之后受精卵随着海浪飘流;整个催产过程大约持续了60min,之后潜水员回到潟湖岸边;

[0024] c、幼虫检查:5月2日夜间8点,潜水员利用300目筛绢网在潟湖收集水中浮游生物,之后利用100目筛绢网过滤,收集生物用95%酒精固定;之后带回中国科学院西沙海洋观测站实验室,利用显微镜发现潟湖中有一定数量的D形幼虫,大概密度为25个/ $\text{m}^3$ ,按照潟湖水体估算1000亩 $\times$ 667平方米 $\times$ 3米水深=200.1万水体,整个过程中大约有5002.5万D形幼虫;为了确定这些幼虫是否砗磲幼虫,是否是催产幼虫,开展了分子鉴定(具体参见Ma,H.,Feng,H.,Zhang,Y.,Qin,Y.,Xiang,Z.,Li,J.,Zhang,Y\*,Yu,Z\*.Multiplex species-specific PCR identification of native giant clams in the South China Sea:a useful tool for application in giant clam stock management and forensic identification.Aquaculture 2021,531: 735991.),证明了此批次幼虫50%左右为该批次幼虫,而且是这些亲本的子代,也就是说,此次原位催产获得了2500万个幼虫;5月9日清晨,潜水员利用200目筛绢网在潟湖收集水中浮游生物,之后利用80目筛绢网过滤,收集生物用95%酒精固定;之后带回中国科学院西沙海洋观测站实验室,利用显微镜发现潟湖中有一定数量的足面盘幼虫,大概密度为3个/ $\text{m}^3$ ,按照潟湖水体估算,整个过程中大约有600万足面盘幼虫;为了确定这些幼虫是否砗磲幼虫,是否是催产幼虫,开展了分子鉴定,证明了该批次幼虫30%左右为该批次幼虫,而且是这些亲本的子代,也就是说,此次原位催产获得了180万个足面盘幼虫;

[0025] d、催产效率评估:2020年12月10日,通过潜水方式检查潟湖周边是否有新生砗磲苗种,经过断面法调查,发现有野生砗磲苗种(壳长在10-15mm),大约50个/百平方米,按照1000亩 $\times$ 667平方米=66.7万平方米,估算大约有新生砗磲苗种3.335万个砗磲苗种;为了确定这些苗种是否原位催产获得的,开展了分子鉴定,证明了此批次幼虫50%左右为原位催产亲本的子代,也就是说,此次原位催产获得了16675个砗磲苗种。

[0026] 以上结果说明:诺瓦砗磲亲本原位催产技术是有效的、可行的,最关键的是获取的苗种已经定生在珊瑚石上,而且钻出来一个小窝,很好的保护了自己,这种原位催产型苗种跟野生苗种一样,具有更好的环境适应性。最关键的是,由于受到海浪和洋流影响,这种方式获得苗种形成部分野生苗种聚居区,为今后的繁衍生息提供了充足的亲本,有助于我国南海砗磲资源快速修复。

[0027] 实施例2:

[0028] a、亲本促熟:2021年3月初,在我国西沙群岛永兴岛潟湖的10m水深无浪区环境中,2个潜水员放置了30个壳长在30-40cm的鳞砗磲亲本,将其放置于5 $\text{m}^2$ 以内,形成认为的砗磲亲本群,首先用网笼加以防护,定期观察存活状态,当期完全适应了环境后,打开网笼,利用GPS定位了该站点;通过肉眼观察,发现其性腺部位呈现橘红色,说明性腺尚未成熟,利用注射器抽取了一点点性腺部分组织,发现小部分精子可以跳动,卵子直径在80-90 $\mu\text{m}$ ,尚未达

到成熟；直至5月7日，通过GPS定位，找到该站点，潜水后发现这些诺瓦砗磲性腺呈现棕黄色，说明已经成熟，进一步采用显微镜检测，发现精子活跃，卵子直径100 $\mu\text{m}$ ，卵黄颜色深，说明卵子已经成熟；

[0029] b、原位催产：当其性腺发育成熟后，潜水员在夜间8点，带着防水手电进行夜潜，找到砗磲群后，利用注射器按照0.5mg/kg剂量五羟色胺溶液注射至25个鳞砗磲的外套膜中，3-5min后，鳞砗磲开始排放精子，大约持续了12min，停止了8min左右，开始排放卵子；潜水员用事先准备好的400目网袋收集卵子；之后在给另外5个鳞砗磲催产，当期其大量喷放精子时，将收集的卵子散置于雾状精子中，实现了受精作用，之后受精卵随着海浪飘流；整个催产过程大约持续了60min，之后潜水员回到潟湖岸边；

[0030] c、幼虫检查：5月8日夜间8点，潜水员利用300目筛绢网在潟湖收集水中浮游生物，之后利用100目筛绢网过滤，收集生物用95%酒精固定；之后带回中国科学院西沙海洋观测站实验室，利用显微镜发现潟湖中有一定数量的D形幼虫，大概密度为60个/ $\text{m}^3$ ，按照潟湖水体估算1000亩 $\times$ 667平方米 $\times$ 3米水深=200.1万水体，整个过程中大约有1.2亿个D形幼虫；为了确定这些幼虫是否砗磲幼虫，是否是催产幼虫，开展了分子鉴定(具体参见 Ma, H., Feng, H., Zhang, Y., Qin, Y., Xiang, Z., Li, J., Zhang, Y\*, Yu, Z\*. Multiplex species-specific PCR identification of native giant clams in the South China Sea: a useful tool for application in giant clam stock management and forensic identification. *Aquaculture* 2021, 531: 735991.)，证明了此批次幼虫60%左右为该批次幼虫，而且是这些亲本的子代，也就是说，此次原位催产获得了7200万个幼虫；5月15日清晨，潜水员利用200目筛绢网在潟湖收集水中浮游生物，之后利用80目筛绢网过滤，收集生物用95%酒精固定；之后带回中国科学院西沙海洋观测站实验室，利用显微镜发现潟湖中有一定数量的足面盘幼虫，大概密度为8个/ $\text{m}^3$ ，按照潟湖水体估算，整个过程中大约有1600万足面盘幼虫；为了确定这些幼虫是否砗磲幼虫，是否是催产幼虫，开展了分子鉴定，证明了此批次幼虫50%左右为该批次幼虫，而且是这些亲本的子代，也就是说，此次原位催产获得了800万个足面盘幼虫；

[0031] d、催产效率评估：2021年10月20日，通过潜水方式检查潟湖周边是否有新生砗磲苗种，经过断面法调查，发现有野生砗磲苗种(壳长在10-30mm)，大约20个/百平方米，按照1000亩 $\times$ 667平方米=66.7万平方米，估算大约有新生砗磲苗种13.34万个砗磲苗种；为了确定这些苗种是否原位催产获得的，开展了分子鉴定，证明了此批次幼虫45%左右为原位催产亲本的子代，也就是说，此次原位催产获得了大约6万个鳞砗磲苗种。

[0032] 以上结果说明：鳞砗磲亲本原位催产技术是有效的、可行的，最关键的是获取的苗种已经定生在珊瑚石上，而且钻出来一个小窝，很好的保护了自己，这种原位催产型苗种跟野生苗种一样，具有更好的环境适应性。最关键的是，由于受到海浪和洋流影响，这种方式获得苗种形成部分野生苗种聚居区，为今后的繁衍生息提供了充足的亲本，有助于我国南海砗磲资源快速修复。