

福建省水产学会团体标准

T/FSF 003—2023

双齿围沙蚕种质标准

Germplasm Standard of *Perinereis aibuhitensis*

20XX - XX - XX 发布

20XX - XX - XX 实施

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 名称与分类	1
4.1 学名	1
4.2 分类地位	1
5 形态特征	1
5.1 外部形态特征	1
5.2 内部构造	5
5.3 可数性状	5
5.4 可量性状	5
6 生长与繁殖	6
6.1 生长	6
6.2 繁殖	6
7 细胞遗传学特性	6
8 分子遗传学特性	7
9 检测方法	8
9.1 外部形态	8
9.2 内部构造	8
9.3 分子遗传学检测	8
9.4 体长测量	8
9.5 怀卵量测量	8
9.6 细胞遗传学检测	8
10 判定规则	8
附录 A 线粒体 COI 基因片段的序列分析方法	9
附录 B 双齿围沙蚕体长测量方法	10
附录 C 双齿围沙蚕怀卵量测量方法	11
附录 D 双齿围沙蚕核型分析方法	12

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。

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。

本文件由福建省水产学会提出并归口。

本文件起草单位：福建省洋泽海洋生物科技有限公司、福建农林大学、福建省淡水水产研究所、罗源县水产技术推广站、中国科学院海洋研究所、福建省水产技术推广总站。

本文件主要起草人：邵光明、陈志、刘燕飞、叶永健、陈鑫淇、周洪磊、李钧、钟传明、霍朋辉、兰昌花。

双齿围沙蚕种质标准

1 范围

本文件给出了双齿围沙蚕[*Perinereis aibuhitensis* (Grube 1878)]的名称与分类、形态特征、生长与繁殖、细胞遗传学特性及分子遗传学特性及检测方法。

本文件适用于双齿围沙蚕的种质检测与鉴定。

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/T 18654.12 养殖鱼类种质检验 第12部分：染色体组型分析

GB/T 22213 水产养殖术语

DB21/T 3120-2019 水产动物物种分子鉴定COI、16S rRNA分子标记法

3 术语和定义

GB/T 22213 界定的术语和定义适用于本文件。

4 名称与分类

4.1 学名

双齿围沙蚕 *Perinereis aibuhitensis* (Grube 1878)。

4.2 分类地位

环节动物门 (Annelida)，多毛纲 (Polychaeta)，游走目 (Erranta)，沙蚕科 (Nereidae)，围沙蚕属 (*Perinereis*)。

5 形态特征

5.1 外部形态特征

5.1.1 体型

双齿围沙蚕为两侧对称的长柱体，后端尖，背腹稍扁平（图1）。分为头部、躯干部和尾部。身体背部呈肉红色或蓝绿色，中央有一条背血管（图2）。腹面红白相间，正中央有一条腹血管（图3）。



图1 体型



图2 身体背部



图3 腹面

5.1.2 头部

分为口前叶和围口节两部分（图4）。口前叶似梨形，前部窄，后部宽（图5）。2对眼呈倒梯形排列于口前叶中后部（图5）。在口前叶前面有一对口前触手和一对分节的触角，触手稍短于触角（图5）。触须4对（图4）。吻各区具颚齿（图6、图7），颚齿在各区的形态、数目和排列：I区2~4个（有的标本6个），圆锥状颚齿纵列或成堆；II区12~18个圆锥状而出为2~3弯曲排；III区30~54个圆锥状颚齿；IV为18~25个圆锥状颚齿成3~4斜排；V区具2~4个圆锥状齿；VI区2~3个平直的扁棒状（扁三角形）颚齿成1排，VI区远端和亚中部区域的脊分离（VI-V-VI区域的脊 π 型）；VII、VIII具40~50个圆锥状颚齿为2横排（图8、图9）。大颚具侧齿6~7个。

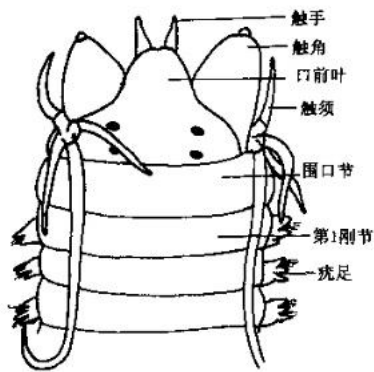


图4 头部



图5 形态图

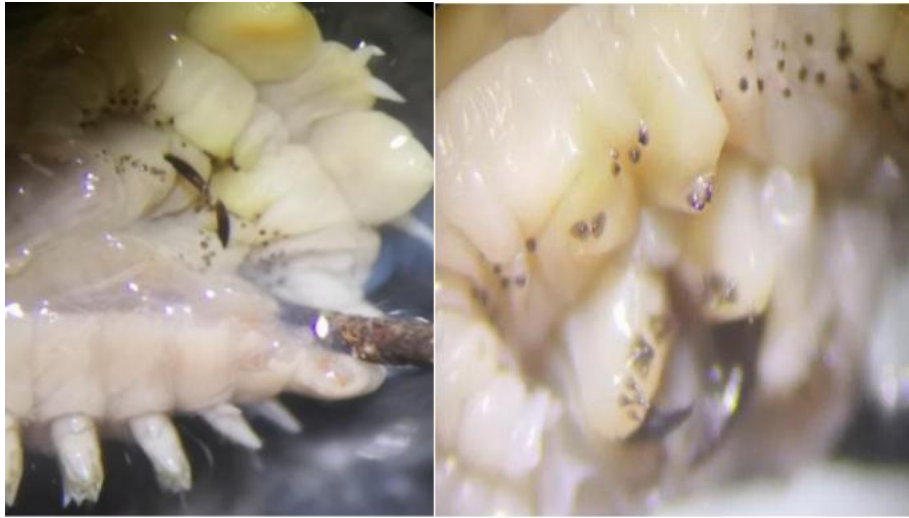


图6 吻部背面

图7 吻部腹面

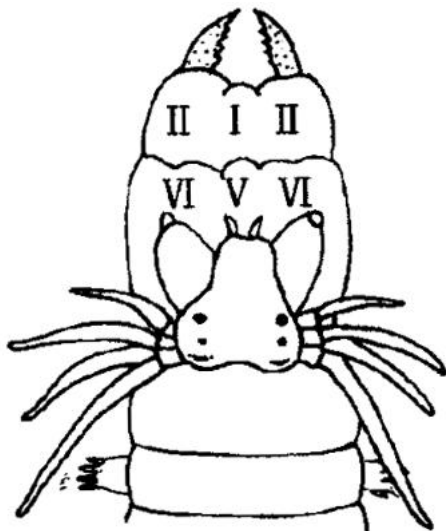


图8 沙蚕吻的分区（背面观）

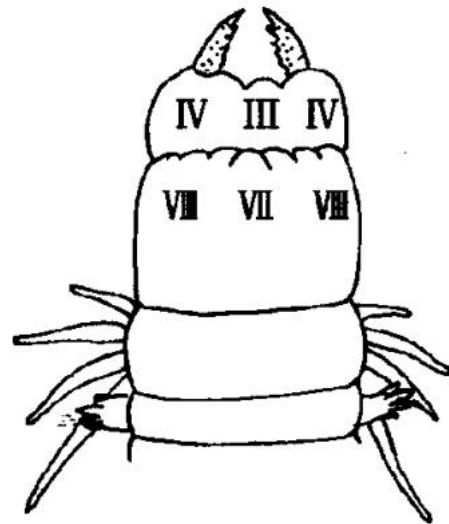


图9 沙蚕吻的分区（腹面观）

5.1.3 躯干部

从围口节之后起，直到身体后端，每个体节两侧有疣足一对。除前2对疣足单叶型外，其余皆为双叶型。体前部双叶型疣足，上背舌叶近三角形，背腹须均为须状，背须与上舌叶约等长，腹须短，仅为下腹舌叶的一半（图10）；体中部疣足，背须短于上背舌叶，上背舌叶尖细，下背舌叶稍短且钝，2个腹前刚叶和1个腹后刚叶与下腹舌叶近等长，腹须短（图11）；体后部疣足，明显变小，上下背舌叶和腹舌叶变小为指状（图12）。

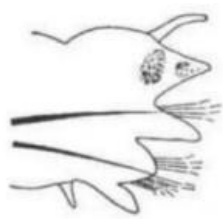


图10 体前部疣足后面观

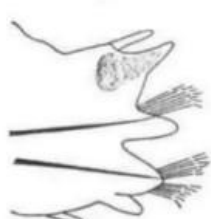


图11 体中部疣足后面观



图12 体后部后面观

疣足背刚毛皆为复型等齿刺状（图13）。疣足腹刚毛，在腹足刺上方者为复型等齿刺状和复型异齿镰刀形（图14），腹足刺下方者为复型异齿刺状（图15、图16）和复型异齿镰刀形（图14）。



图13 复型等齿刺状刚毛



图14 复型异齿沙蚕镰刀形刚毛



图15 复型异齿刺状刚毛



图16 复型异齿刺状刚毛

5.1.4 尾部

在身体最后一节或几个无疣足的体节称尾或肛节，具肛门和1对腹位的肛须（图17）。



图17 尾部

5.2 内部构造

5.2.1 体腔

体壁与肠管间存在腔隙。

5.2.2 消化道

消化管为从口到肛门的直管，根据其结构和来源可分为前肠、中肠和后肠三部分。

5.2.3 排泄系统

除体前三体节外，每个体节都有一对肾管，其一端呈漏斗状，开口在隔膜上，称为肾口，与体腔相通；另一端开口在体外叫肾孔。

5.3 可数性状

触须4对，1对腹位的肛须。吻各区均具颚齿：I区2~4个（有的标本6个），圆锥状颚齿纵列或成堆；II区12~18个圆锥状而出为2~3弯曲排；III区30~54个圆锥状颚齿；IV为18~25个圆锥状颚齿成3~4斜排；V区具2~4个圆锥状齿；VI区2~3个平直的扁棒状（扁三角形）颚齿成1排，VI区远端和亚中部区域的脊分离（VI-V-VI区域的脊 π 型）；VII、VIII具40~50个圆锥状颚齿为2横排。

5.4 可量性状

沙蚕虫体：体长83mm-220mm的虫体具50~182个刚节；

异沙蚕体：雄虫体长67mm~205mm，具87~170个刚节。雌虫体长75mm~140mm，具99~178个刚节。

6 生长与繁殖

6.1 生长

体长8.3 cm~22 cm的双齿围沙蚕，其体长与体重关系应符合公式（1）：

$$W = 0.033 L^{1.623} \quad (R^2 = 0.712) \quad (1)$$

式中：

W—体重的数值，单位为克（g）；

L—体长的数值，单位为厘米（cm）。

6.2 繁殖

6.2.1 性成熟年龄

一年性成熟，稚沙蚕长大变态为异沙蚕体，群浮产卵受精后死亡。

6.2.2 繁殖季节

春季到秋季均有繁殖，繁殖盛季是4~5月和9~10月。

6.2.3 产卵类型

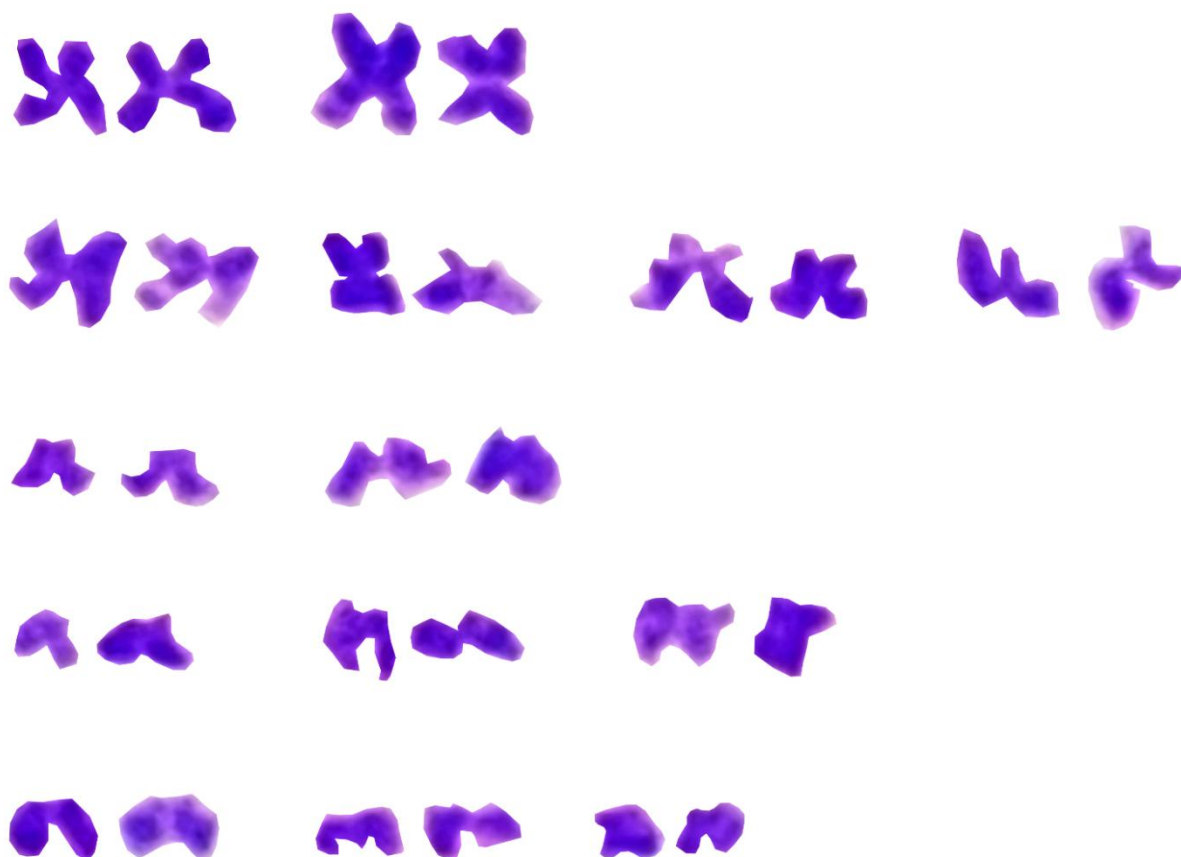
成熟卵子为圆球形，蓝绿色，沉性卵，卵径180~230 μm。

6.2.4 怀卵量

绝对怀卵量一般在8万~29万粒，相对怀卵量一般在0.526~1.27万粒/g。

7 细胞遗传学特性

染色体数量为 $2n = 28$ 。



8 分子遗传学特性

双齿围沙蚕线粒体*COI*基因片段的碱基序列（663 bp）：

TTTATATTTT	ATTTTCGGCA	TATGATCCGG	TCTTCTGGC	ACATCTATGA	50
GCCTCCTAAT	CCGTGCTGAA	TTAGGTCAAC	CAGGATCCCT	TCTCGGTAGA	100
GATCAATTAT	ACAACACTAT	TGTCACAGCT	CACGCATTCT	TAATAATTTT	150
CTTTCTTGTT	ATACCTGTTA	TAATCGGGGG	GTTTGGTAAC	TGACTGGTCC	200
CTCTTATATT	AGGTGCCCCA	GACATAGCGT	TCCCACGCCT	GAATAATATA	250
AGATTTTGGC	TTTTACCCCC	ATCCTTAACC	CTCCTTCTCT	CTAGTGCAGC	300
TGTAGAAAAA	GGAGTCGGAA	CAGGTTGAAC	AGTATACCCC	CCTCTAGCTA	350
GAAACATTGC	CCACGCGGGT	CCCTCTGTTG	ACTTAGCAAT	TTTCTCCCTT	400
CACTTAGCAG	GTGTCTCATC	AATTATAGGC	GCCCTTAATT	TTATTACGAC	450
AGTCATCAAC	ATACGCTCAA	AAGGCCTTCG	TTTAGAACGT	GTGCCTTTAT	500
TTGTGTGATC	AGTTATAGTA	ACCGCCATTC	TTCTTCTTTT	AAGCCTTCCA	550
GTTCTAGCCG	GAGCCATCAC	TATGCTTCTT	ACAGATCGTA	ATTTAAACAC	600
GCGGTTCTTT	GACCCTGCGG	GAGGAGGGGA	CCCTATCCTG	TATCAACATT	650
TATTTTGATT	TTT				663

种内K2P遗传距离小于2%。

9 检测方法

9.1 外部形态

按5.1规定采用目视或解剖镜下观察和计数检测。

9.2 内部构造

将沙蚕解剖后，在解剖镜下观察。

9.3 分子遗传学检测

检测方法应符合附录A的规定，引物按照DB21/T 3120-2019规定执行。

9.4 体长测量

体长测量方法见附录B。

9.5 怀卵量测量

怀卵量测量方法应符合附录C的规定。

9.6 细胞遗传学检测

检测方法应该符合附录D的规定。

10 判定规则

10.1 当检测结果符合第5章要求，可以判定物种时，按第5章要求判定。

10.2 当第5章的项目无法进行检测或准确判定时，增加检测第8章要求内容，依据检测结果对物种进行辅助判定。

附 录 A
(规范性)
线粒体 COI 基因片段的序列分析方法

A.1 总DNA提取

取双齿围沙蚕组织剪碎并用10%蛋白酶K消化后，按照标准的酚—氯仿抽提法或者使用试剂盒进行总DNA的提取，琼脂糖凝胶电泳后DNA条带单一，无杂带。

A.2 引物序列

扩增引物序列为COI-F（5'-TAA ACT TCA GGGTGA CCA AAA AAT CA-3'）和COI-R（5'-GGT CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'）。

A.3 序列扩增与测序

50 μ L PCR反应体系：5 U的*Taq* DNA聚合酶，10 \times PCR缓冲液[200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4; 200 mmol/L KCl; 100 mmol/L (NH₄)₂SO₄; 15 mmol/L MgCl₂] 5 μ L，2.5 mM的dNTP 2.5 μ L，引物COI-F和COI-R（10 μ M）各10 μ L，基因组DNA约为50 ng，加双蒸水至50 μ L。每组PCR均设阴性对照用来检测是否存在污染。

PCR扩增参数：95 $^{\circ}$ C预变性5min，95 $^{\circ}$ C变性30 s，49 $^{\circ}$ C退火30 s，72 $^{\circ}$ C延伸20s，循环35次，然后72 $^{\circ}$ C后延伸5 min。

所有PCR均在热循环仪上完成。扩增产物经纯化后经测序仪直接测序，为了保证序列的准确性，对所有样品均进行双向测序。

A.4 遗传距离分析

利用Kimura两参数模型（Kimura 2-parameter, K2P）计算检测样品的序列与参考序列的遗传距离。

附 录 B
(规范性)
双齿围沙蚕体长测量方法

B.1 双齿围沙蚕的快速处死

取500ml 无水乙醇倒入盆，将沙蚕放入盆中并保证无水乙醇浸没沙蚕，5-10秒后沙蚕会由于失水死亡。

B.2 双齿围沙蚕的摆放

准备一个平整的桌子，用镊子将沙蚕一端提起，另外一端与桌面接触，然后将沙蚕自然摆放在桌子上，摆放过程中保证沙蚕身体平直、无拉伸或压缩。

B.3 双齿围沙蚕体长测量

用直尺测量沙蚕体长，直尺精度到1mm。

附 录 C
(规范性)
双齿围沙蚕怀卵量测量方法

C.1 卵子的获取

取异沙蚕体雌蚕，电子称称量每个个体的重量为 w (g)，用解剖刀纵向逐一剖开沙蚕，将每条沙蚕卵子溶解到1L的过滤海水中。

C.2 卵子数量的统计

用玻璃棒搅拌使卵子在海水中分布均匀，用移液枪取 $200\ \mu\text{L}$ 的海水放入解剖镜下计数，每个个体重复5次，计算每 $200\ \mu\text{L}$ 溶液中卵子数量平均值为 x 粒，每个个体的绝对怀卵量 $y = 5000x$ ，相对怀卵量 $z = y/w$ 。

附 录 D
(规范性)
双齿围沙蚕核型分析方法

D.1 沙蚕细胞的获取

配制100-200ml浓度为0.5g/L的秋水仙素海水溶液，取3-6条幼蚕放入溶液中浸泡12h。用剪刀纵向剖开沙蚕，并放到生理盐水中清洗，以使细胞会进入到生理盐水中。去除沙蚕，将溶液转移至10ml的离心管中，1000转/min离心8 min，去除上清。

D.2 沙蚕细胞的固定

用8 ml的0.075 M KCL重悬细胞，并于室温静置1 h。注意轻轻吹打，不要用力，免得细胞膜破裂。室温下加入2 ml新鲜配制的固定液（甲醇：冰乙酸=3:1），静置5 min。1000转/min离心8 min，去除上清，加入2 ml的固定液重悬细胞。4℃固定15 min。重复步骤上一步骤2次，最后加入适当体积的固定液重悬细胞至合适的浓度。

D.3 滴片

从-20℃冰箱中取出干净的载玻片放到一个支撑物上，用移液枪吸取一定体积的上述溶液，从1.5 m左右的高处滴到载玻片上，载玻片在42℃烤片机上烘干后放入-20℃冰箱保存备用。

D.4 染色

用吉姆萨染液染色30min，倒掉染液，并用清水轻轻清洗。

D.5 拷片及观察

载玻片在42℃烤片机上烘干，100倍油镜下镜检。
