

附件 3



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ□□□—20□□

抗虫转基因植物对生物多样性影响评价 技术导则

**Technical guideline for biodiversity impact assessment of
insect-resistant transgenic plants**

(征求意见稿)

20□□-□□-□□发布

20□□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前言.....	15
1 适用范围.....	16
2 规范性引用文件.....	16
3 术语和定义.....	16
4 评价原则.....	17
5 评价流程.....	17
6 基础资料.....	18
7 评价目标.....	19
8 调查方法.....	19
9 结果表述.....	20
附录 A（资料性附录）不同生物种群或群落的调查方法.....	21
附录 B（资料性附录）抗虫转基因植物对生物群落影响评价中部分生物多样性指标的计算公式.....	30

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》，履行《卡塔赫纳生物安全议定书》，评价抗虫转基因植物可能对生物多样性产生的影响，制定本标准。

本标准规定了抗虫转基因植物对生物多样性影响评价的技术原则、程序、内容和方法。

本标准附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准为首次发布。

本标准由生态环境部自然生态保护司、法规与标准司组织制订。

本标准主要起草单位：生态环境部南京环境科学研究所。

本标准生态环境部 20□□年□□月□□日批准。

本标准自 20□□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

抗虫转基因植物生物多样性影响评价技术导则

1 适用范围

本标准规定了抗虫转基因植物生物多样性影响评价的技术原则、程序、内容和方法。
本标准适用于开放环境条件下评价抗虫转基因植物对生物多样性的影响。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件或者其中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB/T 30989	高通量基因测序技术规程
GB/T 32722	土壤质量 土壤样品长期和短期保存指南
GB/T 32725	实验室测定微生物过程、生物量与多样性用土壤的好氧采集、处理及贮存指南
HJ 625	抗虫转基因植物生态环境安全检测导则（试行）
HJ 710.1	生物多样性观测技术导则 陆生维管植物
HJ 710.6	生物多样性观测技术导则 两栖动物
HJ 710.7	生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类
HJ 710.8	生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物
HJ 710.9	生物多样性观测技术导则 蝴蝶
HJ 710.10	生物多样性观测技术导则 大中型土壤动物
HJ 710.13	生物多样性观测技术导则 蜜蜂类
LY/T1692	转基因森林植物及其产品安全性评价技术规程
转基因植物及其产品环境安全检测抗虫水稻第4部分：生物多样性影响（农业部953号公告-8.4-2007）	
转基因植物及其产品环境安全检测抗虫玉米第4部分：生物多样性影响（农业部953号公告-10.4-2007）	
转基因植物及其产品环境安全检测抗虫棉花第4部分：生物多样性影响（农业部953号公告-12.4-2007）	

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 转基因 transgene

也称为外源基因或者异体基因，指通过基因工程技术插入并整合到受体植物基因组中的外源遗传物质，一般包括目的基因、载体基因、启动子和终止子基因、标记基因或报告基因。其中，目的基因指以修饰受体细胞遗传组成并表达其遗传性状为目的的基因，本标准中目的基因是指表达杀虫蛋白的杀虫基因。

3.2 抗虫转基因植物 insect-resistant transgenic plant

通过基因工程技术将杀虫基因导入受体植物基因组而培育出的抗虫品种（系）。

3.3 受体植物 parental plant

接受并表达外源基因的植物品种（系）。

3.4 非转基因对照植物 non-transgenic control plant

与受体植物属于同一物种但是不含有转基因的植物品种（系）。

3.5 转基因蛋白 transgene protein

目的基因在抗虫转基因植物中表达所产生的蛋白。

3.6 靶标生物 target organisms

抗虫转基因植物中的转基因蛋白所针对的生物。本标准中抗虫转基因植物的靶标生物主要指有害昆虫，即靶标害虫。

3.7 非靶标生物 non-target organisms

抗虫转基因植物中转基因蛋白所针对的靶标生物以外的其他生物。

3.8 暴露 exposure

抗虫转基因植物中转基因蛋白与靶标生物或非靶标生物接触或者同时存在于同一环境中。

3.9 生物多样性 biodiversity

所有来源的活生物体中的变异性，这些来源除其它外包括陆地、海洋和其它水生生态系统及其所构成的生态综合体，包括物种内、物种之间和生态系统的多样性。本标准中生物多样性主要是指调查区域内可能受到抗虫转基因植物影响的物种多样性。

3.10 种群 population

在同一时期内占有空间的一定空间的同种生物个体的集合。

3.11 群落 community

在一定的自然区域内，相互之间具有直接或间接关系的不同种生物的总和。

3.12 优势种 dominant species

对群落结构和群落环境的形成具有明显控制作用的物种，通常是个体数量多、生物量高、生活力强的生物种类。

3.13 指示种 indicator species

生物学或生态学特性可表征其他物种或环境质量状况的物种或物种组合。

3.14 关键种 keystone species

在维持生态系统结构及演替上具有重要作用、其影响大小和其自身的丰度并不一定成比例的物种。

3.15 伴生种 companion species

为群落中与优势种相伴存在、但不起主要作用的常见种类。

3.16 多度 abundance

某一植物物种在单位面积（样方）上的个体数量，通常采用直接计数法或目测估计法进行测定。

3.17 盖度 coverage

植物地上部分的垂直投影面积占样方面积的百分比。

3.18 性比 sex ratio

种群中雄性个体和雌性个体数目的比例。

4 评价原则

4.1 预先防范原则

对于可能会对生物多样性产生不利影响的抗虫转基因植物，即使目前缺乏其产生不利影响的充分科学证据，也应对该抗虫转基因植物的生物多样性影响进行评价，并采取适当措施预防可能出现的不利影响。

4.2 科学性原则

必须基于严谨的科学态度、采用科学的方法和技术评价抗虫转基因植物的生物多样性影响，对采集到的试验数据进行科学的统计分析，得出可验证的评价结果，并对评价结果进行科学的解释。

4.3 个案分析原则

针对具体的外源基因特征、受体植物类型、释放环境及用途、待评估生物的特性等，开展抗虫转基因植物对特定生物多样性的影响评价。

5 评价流程

按照图 1 的流程评价抗虫转基因植物的生物多样性影响。

(1) 收集和整理抗虫转基因植物的相关生物学背景资料及种植状况信息；

- (2) 确定生物多样性调查的对象、区域和方法；
- (3) 根据评价的目的开展群落或者种群水平生物多样性调查；
- (4) 如果评价结果显示抗虫转基因植物对群落或特定生物种群无显著影响，则得出抗虫转基因植物对生物多样性影响的评价结果；
- (5) 如果评价结果显示抗虫转基因植物对群落或特定生物种群具有显著影响，则进一步调查该影响的持续性、程度、原因等，进而得出抗虫转基因植物对生物多样性影响的评价结果。

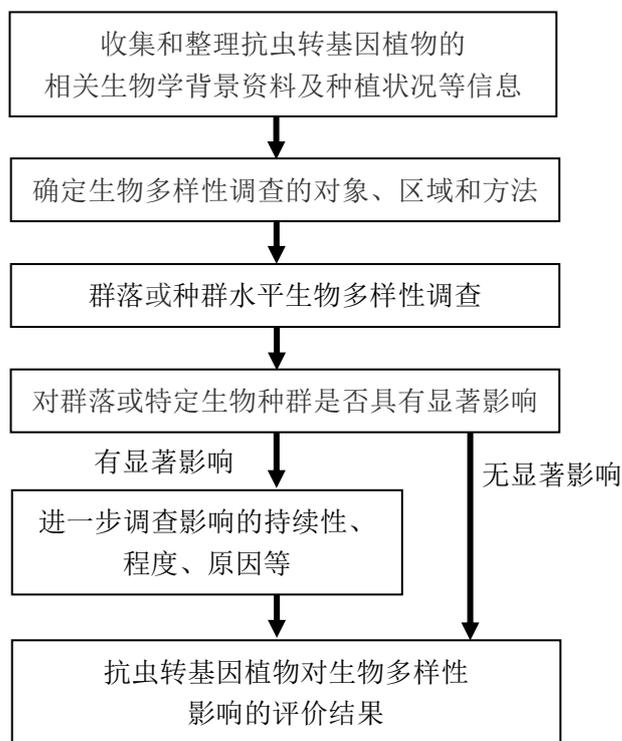


图 1 抗虫转基因植物对生物多样性影响评价流程图

6 基础资料

6.1 受体植物

受体植物应包括但不限于以下方面：

- a) 学名、俗名和其他名称；分类学地位；驯化程度（野生种还是栽培种）。
- b) 原产地及引进时间；用途；在国内的应用情况。
- c) 对人体健康和生态环境是否发生过不利影响；从历史上看，受体植物演变成有害植物（如杂草等）的可能性；是否有长期安全应用的记录。
- d) 生活周期（一年生还是多年生）；繁殖方式（有性繁殖或无性繁殖），如为有性繁殖，授粉方式（自花授粉、异花授粉或常异花授粉，虫媒传粉还是风媒传粉）；全生育期；在自然界中生存繁殖的能力，包括越冬性、越夏性及抗逆性等。
- e) 在国内的地理分布和自然生境；生长发育所要求的生态环境条件，包括自然条件和栽培条件的改变对其地理分布区域和范围影响的可能性；对生态环境的影响及其潜在危险程度；涉及到国内非通常种植的植物时，应描述该植物的自然生境和有关其天然捕食者、寄生物、竞争物和共生生物的资料。
- f) 受体植物的遗传变异和遗传稳定性；是否有发生遗传变异而对人类健康或生态环境产生不利影响的资料；受体植物的监测方法和监控的可能性。
- g) 在无受体植物时，可参考上述要求调查非转基因对照植物的有关背景资料。

6.2 转基因蛋白

转基因蛋白应包括但不限于以下方面：

- a) 目的基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列。
- b) 插入序列在植物细胞中的定位（是否整合到染色体、叶绿体、线粒体，或以非整合形式存在）及其确定方法；插入序列的拷贝数。
- c) 启动子和终止子的大小、功能及其供体生物的名称；标记基因和报告基因的大小、功能及其供体生物的名称；其他表达调控序列的名称及其来源（如人工合成或供体生物名称）。
- d) 转基因方法；插入序列表达的器官和组织，如根、茎、叶、花、果、种子等；插入序列的表达量及其分析方法；插入序列表达的稳定性的。

6.3 抗虫转基因植物

抗虫转基因应包括但不限于以下方面：

- a) 抗虫转基因植物与受体植物在环境安全性方面的差异；
- b) 生殖方式和生殖率；
- c) 传播方式和传播能力；
- d) 休眠期；
- e) 适应性；
- f) 生存竞争能力；
- g) 转变成杂草的可能性；
- h) 对靶标生物及非靶标生物的影响。

6.4 种植状况和管理措施

种植状况和管理措施主要包括：

- a) 抗虫转基因植物及对照植物的种植时间和年限、种植面积，抗虫转基因植物与对照植物生长地之间的距离。
- b) 调查区域的生境特征（如土壤性质、气象特点、生态类型、生物多样性本底）。
- c) 采样地所采取的管理措施（如除草和除虫方式、化学农药的品种和用量、施肥情况、栽培方式及隔离措施）。

7 评价目标

评价目标为评价抗虫转基因植物对其生长环境中特定生物种群或者生物群落的短期或中长期影响。

本标准的评价材料为抗虫转基因植物以及非转基因对照植物。在评价抗虫转基因植物对其生长环境中生物多样性影响的同时，应以相同的方法同时评价相同（似）环境下生长的非转基因对照植物对其生长环境中生物多样性的影响。

8 调查方法

8.1 一般要求

评价抗虫转基因植物对生物多样性影响的调查方法一般包括调查对象、调查区域和采样点、调查时间和频次、调查器具、调查内容等。应根据评价目标、评价材料和调查对象的生物学特性的不同，参考 HJ 625、LY/T1692、农业部953号公告-8.4-2007、农业部953号公告-10.4-2007、农业部953号公告-12.4-2007等有关技术标准，确定具体的调查方法。

8.2 调查对象

直接或者间接暴露于转基因蛋白的生物。
不同生物群落或种群的调查方法可参考附录A。

8.3 调查区域和采样点

调查区域包括：抗虫转基因植物生长的农田、水体或者林地，相同（似）环境背景下非转基因对照植物的生长地，抗虫转基因植物生长地周围的自然环境。

采样点的生物多样性主要特征应能够代表所评价环境中生物多样性的基本状况；根据抗虫转基因植物的生物学特性、抗虫转基因植物对生物多样性影响的方式和特点、调查对象的生长和繁殖特性（如运动能力），确定每个采样点的面积。每个调查区域中采样点的数量应符合统计学的基本要求，至少3个采样点。

8.4 调查时间和频次

根据评价目标和抗虫转基因植物的生活周期确定调查时间和频次。如果评价目标是调查抗虫转基因植物的短期影响，可进行一次或者数次调查，但调查时间应包括抗虫转基因植物的旺盛生长期和外源抗虫基因表达高峰期。如果评价目标是调查抗虫转基因植物的中长期影响，可根据抗虫转基因植物的生活周期，在其每年的重要生长阶段（如出苗期、花期、结实期、收获期）进行调查，并进行多年的连续调查。

8.5 调查内容

8.5.1 评价抗虫转基因植物对其生长环境中生物群落的影响时，调查内容包括：所调查区域的主要生境特征；物种（尤其是优势种、指示种、关键种）的种类、分布、密度和种群动态；生物群落的多样性指数、均匀性指数和优势集中性指数。抗虫转基因植物对生物群落影响评价中主要生物多样性指标的计算公式见附录B。

8.5.2 评价抗虫转基因植物对其生长环境中特定靶标或非靶标生物种群的影响时，调查内容包括：对转基因蛋白的暴露量；该物种的数量、产卵量、繁殖率等个体生长发育、繁殖指标以及该生物种群的种群密度、年龄结构、性别比例、迁入率和迁出率、出生率和死亡率、空间分布等种群特征。

9 结果表述

采用方差分析方法对调查数据进行统计，检测抗虫转基因植物生长区域与非转基因对照植物生长区域的生物多样性指标之间是否存在显著差异。结果表述为：与非转基因植物对照相比，抗虫转基因植物对某生物多样性指标无显著影响（ $P > 0.05$ ）、有显著影响（ $0.01 < P < 0.05$ ）或有极显著影响（ $P < 0.01$ ）。

缺乏非转基因对照植物时，可多年连续调查抗虫转基因植物对生物多样性的影响，采用方差分析方法比较不同年份的生物多样性指标，获得抗虫转基因植物对生物多样性影响的变化情况。结果表述为：在一定时间内，抗虫转基因植物对某生物多样性指标无显著影响（ $P > 0.05$ ）、有显著影响（ $0.01 < P < 0.05$ ）或有极显著影响（ $P < 0.01$ ）。

附录 A

(资料性附录)

不同生物种群或生物群落的调查方法

A.1 植物

按照HJ 710.1、农业部953号公告-10.4-2007、农业部953号公告-8.4-2007等技术标准中规定的方法，调查抗虫转基因植物及其非转基因对照植物生长区域内的植物。

A.1.1 调查样方的设置

在抗虫转基因植物和非转基因对照植物生长区域内，以及生长区域周边（距离生长区100~300m范围内）生境中同时设置样方。

对于森林植物群落，在选定建立调查样地的位置时，用森林罗盘仪确定样地的方向（一般是正南北方向）和基线，然后用经纬仪（全站仪）将样地划分为20m×20m样方；记录测量点之间的水平距、斜距和高差；对每个样方的顶点编号并永久标记；最后，用卷尺、测绳或便携式激光测距仪将每个20m×20m样方划分为5m×5m小样方，样方顶点用临时PVC管标记，边界用塑料绳或其他材料临时标记，这些5m×5m样方作为基本调查单元；调查任务完成后将这些临时标记全部移除，并作无害化处理。样方数量一般面积（垂直投影面积）≤50hm²的设3个样方，50~500hm²的设5个样方，面积>500hm²的每增加100公顷增设1个，但总样方数量一般控制在10个以内。

对于农田植物群落，在选定的调查区域用卷尺或定制的模具设置1m×1m或2m×2m的样方，对样方的顶点编号并永久标记，边界用塑料绳或其他材料临时标记。调查的样方数量一般应不少于5个1m×1m或2m×2m的样方。

A.1.2 森林植物调查

在设置的样方中采用目测估计法进行植物种类调查。所有个体应鉴定到种水平，对调查现场不能鉴定或有疑问的种，须采集标本、拍照、记录植物个体编号，请分类专家鉴定。对于抗虫转基因植物及其对照植物的主要伴生种，应该调查该种的胸径或基径、冠幅、生长状态、盖度等。

A.1.3 农田植物调查

在设置的样方中采用目测估计法进行植物种类调查。所有个体应鉴定到种水平，对调查现场不能鉴定或有疑问的种，须采集标本、拍照、记录植物个体编号，请分类专家鉴定。对于抗虫转基因植物及其非转基因对照植物的主要伴生种，应该调查该种的多度、平均高度和冠幅、生活力、盖度等。

A.2 地上节肢动物

按照HJ 710.9、HJ 710.13、农业部953号公告-8.4-2007、农业部953号公告-10.4-2007、农业部953号公告-12.4-2007等技术标准中规定的方法，调查抗虫转基因植物及其非转基因对照植物生长区域内的昆虫等地上节肢动物。

A.2.1 直接观察法

在转基因植物生长旺盛期，根据不同调查对象，设置不同大小调查区域，调查区域应不小于400m²（20m×20m）或覆盖植株数不少于100，每小区采用对角线或棋盘式取样法调查5个样点，每点调查至少3株植物。采用目测法调查整个植株或单个枝叶及植株附近地面各种节肢动物的数量、种类和发育阶段。对田间不易识别的种类进行采样标记，放入75%乙醇溶液保存，供进一步鉴定。

A.2.2 吸虫器调查法

在转基因植物生长旺盛期，根据不同调查对象，设置不同大小调查区域，调查区域应不小于400 m²（20m×20m）或覆盖植株数不少于100株，每小区采用对角线或棋盘式取样法调查5个样点。每点用吸虫器吸取至少3株植物或枝叶（全株）及其地面1m²范围内的所有节肢动物种类。将抽取的样品带回室内清理和初步分类后，放入75%乙醇溶液保存，供进一步鉴定。

A.2.3 陷阱法

在转基因植物生长旺盛期，根据不同调查对象，设置不同大小调查区域，调查区域应不小于400m²（20m×20m）或覆盖植株数不少于100，每小区采用对角线或棋盘式取样法调查5个样点，每点设置一个陷阱。陷阱结构是：使用3个塑料杯（Φ15cm×10cm），间隔0.5m，埋入土壤中作为陷阱，杯口与地面相平，每个陷阱上都有用铁丝支撑的塑料碗做棚。杯中放有浓度为5%的洗涤剂水，不超过杯容积的1/3。在埋杯第二天调查杯中的节肢动物种类和数量，不易识别的种类编号后放入75%乙醇溶液保存，供进一步鉴定。

A.2.4 诱捕法

在转基因植物生长旺盛期，根据不同调查对象，设置不同大小调查区域，调查区域应不小于400m²（20m×20m）或覆盖植株数不少于100株，每小区采用对角线或棋盘式取样法调查样点，每400 m²设置 2至3个专用诱捕器，各诱捕器间距离20m左右，在每个诱捕器内放置一定量的性诱剂或食物。甜菜夜蛾、斜纹夜蛾等大型昆虫在距离植物顶部 20 cm左右放置专用诱捕器；小菜蛾等体型相对较小的昆虫于靠近植物顶部处放置专用诱捕器。诱捕器使用转换接口外接容器（如可乐瓶）作为贮虫设备。诱虫点每月更换一次以保证诱虫效果，通过统计单瓶诱虫量，监测昆虫种类和数量动态变化。

A.2.5 振落法

在转基因植物生长旺盛期，根据不同调查对象，设置不同大小调查区域。调查区域应不小于400m²（20m×20m）或覆盖植株数不少于100株，每小区采用对角线或棋盘式取样法调查5个样点，对于高大树木上的昆虫，可用振落的方法进行捕捉。其方法是：先在树下铺上白布，然后摇动或敲打树枝树叶，利用昆虫的假死习性，将其振落到白布上进行收集。用这种方法可以采集到鞘翅目（Coleoptera）、脉翅目（Neuroptera）和半翅目（Hemiptera）的许多种类昆虫。有些没有假死习性的昆虫，可在振动后的飞行过程中用网捕捉。

A.2.6 网捕法

A.2.6.1 空网法、扫网法和刮网法

根据用处不同制作空网、扫网和刮网。捕虫网一般网口直径1/3m，网长2/3m，手柄1至数米。空网：用透气、坚韧、浅色的珠罗纱、尼龙纱等制成，专门用来采集蝴蝶、蜂类、蜻蜓等飞翔迅速的昆虫。扫网：用来扫捕树丛、杂草中隐蔽的昆虫，采用较结实的白布或亚麻布制作网袋，网框和网柄都要选择坚固的材料，以承受扫网时较大的阻力。刮网：在树皮上采集昆虫时，可用粗铝丝作架，前面连接上一段有弹性的钢条，缝上白布的网袋，底端可捆上个小瓶，以便接虫。

在转基因植物生长旺盛期，根据不同调查对象，设置不同大小调查区域，但应不小于400m²（20m×20m）或覆盖植株数不少于100，每小区采用对角线或棋盘式取样法调查5个样点，使用合适的捕虫网对至少3株植物上的节肢动物进行采集，每次收集的标本均按号放入75%乙醇溶液保存，供进一步鉴定。

A.2.6.2 马来氏网法

在转基因植物生长旺盛期，根据不同调查对象，设置不同大小调查区域，但应不小于400m²（20m×20m）或覆盖植株数不少于100。

马来氏网选用国际通用的马来氏网 I 型和 II 型。马来氏网 I 型前部高180cm，后部高110cm，长165cm，宽116cm；马来氏网 II 型前部高180cm，后部高110cm，长165cm，宽180cm；材质选用聚乙烯100目以上纱网布，网布高度110cm以下部分网为黑色，110cm以上部分为白色，网纱在前部与昆虫收集器之间紧密连接，并留有直径3~4cm的收集孔；收集器分为上下两部分，上部与网体连通，下部用于盛放无水乙醇收集液且可替换。在布设马来氏网时，确保中部开口部分朝向样点区域，如需多个马来氏网，间隔应大于500m。收集瓶内应灌满无水乙醇，每10~15天取样一次，取样时将收集瓶拧下并迅速拧紧瓶盖，每次收集的标本均按号放入75%乙醇溶液保存，供进一步鉴定。

A.3 土壤微生物

按照GB/T 30989、GB/T 32722、GB/T 32725等技术标准中规定的土壤样品采集和保存、微生物测定方法，调查抗虫转基因植物及其非转基因对照植物生长区域内的土壤微生物。

A.3.1 样品采集

在抗虫转基因植物及其对照植物生长区域采集根际土和根围土，采集深度主要取决于植物种类：一般农作物为0-20cm，果林类作物为0-60cm。为了保证样品的代表性，采取采集混合样的方案。每个采

样区可以是自然分割的一个田块，也可以由多个田块所构成，范围不小于400m²（20m×20m），采样区采用对角线、梅花点、棋盘式或蛇形取样法调查5个样点，每点1-2株植物。采样前应去除地表植被、苔藓及凋落物，采样时还需去除土壤中植物的根系、碎片、落叶及土壤动物等肉眼可见的生物材料。

A.3.2 样品贮存

土壤样品应避光通气贮存，用于磷脂脂肪酸（PLFA）分析以及高通量测序的样品应在-20℃条件下保存。

A.3.3 微生物多样性分析

A.3.3.1 磷脂脂肪酸法

土壤微生物中脂类的提取采用 Bligh&Dyer 提取法，受试土壤经土壤提取液振荡分离去除水相，有机相和悬浮液经干燥后形成脂类提取物。

磷脂脂肪酸的提取方法：将脂类提取物通过硅胶柱分离后，经中度碱水解，使磷脂转化为脂肪酸甲酯。利用固相萃取柱（包括强阳离子交换柱和氨丙基柱）将脂肪酸甲酯分离为饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、羟基脂肪酸、非酯链未取代脂肪酸和非酯链羟基取代脂肪酸，将不同的脂肪酸经衍生化后用于气相测定。

磷酸酯的提取方法：将脂类提取物通过硅胶柱分离后，经酸水解断裂磷脂的极性基团以获得醚酯，经氢碘酸断裂醚键来释放醚酯中的醚键烃类（如碘代烷烃），最后，通过锌粉还原脱卤后转化为磷脂醚酯用于气相测定。

将不同的磷脂脂肪酸/磷脂醚酯采用气相色谱/质谱进行分析测定，利用色谱分析软件对各组分进行定性与定量分析。总微生物量可通过土壤总磷脂脂肪酸含量进行估算。不同的脂肪酸甲酯含量可用摩尔百分比表示。不同土壤类型或不同处理土壤之间的磷脂脂肪酸含量变化可采用主成分分析法进一步分析相关性。

A.3.3.2 高通量测序法

将提取的土壤微生物 DNA 进行高通量测序。扩增引物基于细菌 16SrRNA 和真菌 18SrRNA 的保守区域片段（引物序列见表 A.1），通过测序获得样本的细菌 16SrRNA 和真菌 18SrRNA 的保守区域片段的序列信息，利用 Mothur、QIIME 或 R 软件与数据库中来源明确、鉴定可靠的细菌和真菌基因序列相比对，以确定不同土壤微生物种类。

表 A.1 扩增细菌 16SrRNA 和真菌 18SrRNA 保守区域片段的引物序列

分类	引物类型	引物名称	引物序列 3'-5'	片段大小
细菌	16 S V1-V3	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	520bp
		533R	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	
	16 S V3-V5	357F	CCTACGGGAGGCAGCAG	560bp
		926R	CCGTCAATTCMTTTRAGT	
	16 S V4	520F	AYTGGGYDTAAAGNG	280bp
		802R	TACNVGGGTATCTAATCC	
	16S V4-V5	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	420bp
		907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	
	16S V3-V4	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCA	480bp
		806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	
真菌	ITS1	ITS5F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	250bp
		ITS1R	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
	V4	547F	CCAGCASCYGC GGTAATTCC	420bp
		V4R	ACTTTCGTTCTTGATYRA	

A.4 浮游动物

A.4.1 采样点布设原则

调查区域为抗虫转基因植物种植区的农田水体以及周边灌溉水、池塘、湖泊等自然水域。根据水域的面积和形态、浮游动物的生态分布特点等决定采样点数量（表 A.2）。采样点应有代表性，能反映整个水体浮游动物的基本情况。

表 A.2 采样点设置数量

水域面积 (km ²)	<2	2~5	5~20	20~50	50~100	100~500	>500
采样点数 (个)	3	3~5	5~7	7~10	10~15	15~20	20~30

A.4.2 采样

定量样品应在定性采样之前用采水器采集。每个采样点应采水样 1000ml。分层采样时，可将各层水样分别定量取平均值，或将各层所采水样等量混匀后取 1000ml 再定量，作为此点的定量样品。

枝角类和桡足类动物的定量样品应在定性采样之前用采水器采集，每个采样点应采水样 10000ml~50000ml，再用 25 号浮游植物网过滤浓缩至 100ml，用 37%~40% (V/V) 甲醛溶液固定，用量为水样体积的 5%。

原生动物、轮虫和无节幼体定量样品，可采集 10000ml~50000ml 水样混合后，除留一部分供活体观察不固定外，其余立即用鲁哥氏液固定，用量为水样体积的 1%~1.5% (V/V)。如样品需较长时间保存，则需加入 37%~40% (V/V) 甲醛溶液，用量为水样体积的 4% (V/V)。

A.4.3 水样的沉淀和浓缩

原生动物和轮虫样品固定后，静置沉淀 24h。虹吸浓缩后的水量多少视原生动物和轮虫浓度大小而定，一般情况下可用透明度作参考，根据透明度确定水样浓缩体积见表 A.3。

表 A.3 根据透明度确定水样浓缩体积的方法

透明度 (cm)	1L 水样浓缩后的水量 (ml)
>100	30~50
50~100	100~50
30~50	500~100
20~30	1000 (不浓缩)
<20	>1000 (稀释)

枝角类和桡足类动物常用过滤法浓缩水样。

A.4.4 计数

依据调查对象、样品体积和具体情况，取水样进行种类鉴定、个体计数和室内分析。

A.4.5 浮游动物生物量的测定

原生动物、轮虫可根据体积法求得生物量；枝角类和桡足类可用体长-体重回归方程求得体重（湿重），也可用电子天平直接称重。

A.5 土壤动物

在抗虫转基因植物及其非转基因对照植物生长区域划分网格，按照 HJ 710.10-2014 中规定的简单随机抽样法确定样方，每调查对象不少于 3 个样方，每个样方不小于 5m×5m，样方间距离不小于 10m。每样方内按照随机或者均匀设置 5 个样点，样点需包含或紧邻被评价的植物。

A.5.1 大型土壤动物

每个样点调查面积不小于 1m×1m×0.2m（长×宽×深），利用铁铲等工具将被调查样点土块快速取出，通过目视手检法对大型土壤动物种类和数量鉴别统计。对于不能够准确鉴别的动物，应保存于 75% 乙醇或防压标本盒中，在实验室中进一步鉴定。

蚯蚓等环节动物是土壤质量与生态功能的指示类群，在调查中应当重点关注。

A.5.2 中型土壤动物

每个样点调查面积不小于0.2m×0.2m（长×宽）土壤，采用取土器（半径2.5cm）钻取0~0.2m土层，每样点三点取样，混匀后迅速带回实验室分离鉴定中、小型土壤动物，土壤样品的运输保存按照GB/T 32722执行。利用高温高梯度Tullgren干法设备（筛网网眼为2mm），将土壤动物（主要分离小型节肢类土壤动物类群）从土壤样品中分离出来。收集温度：从20℃开始，每12h升高5℃，升到40℃为止，共持续48h。用Torne氏收集液（1000ml异丙醇，30ml冰醋酸，3ml福尔马林）收集，然后转移到75%的乙醇中。

A.5.3 小型土壤动物

土壤样品采集方法按照5.2进行。利用Baermann浅盘法，将筛盘（网眼为2mm）放入相应的浅盘中，在筛盘上放置一层滤纸，称取20~50g的样土（视土壤动物的密度而定），均匀铺在滤纸上，小心加水至浸没土壤，置于20℃室温条件下分离。12h时，可直接取浅盘上层水体，直接显微镜观察原生动物的数量和种类。48h后，用筛盘（网眼为25μm）对浅盘中的水进行过筛，冲洗，将收集的土壤动物（主要为线虫等类群）保存于75%的乙醇中。

A.6 两栖动物

按照HJ 710.6-2014中规定的方法，调查抗虫转基因植物及其非转基因对照植物生长区域内的两栖动物。

A.6.1 样线法

根据两栖动物分布与生境因素的关系，如海拔梯度、植被类型、水域状态等设置样线。样线尽可能涵盖不同生态系统类型。调查时应在太阳落山一小时后开展，每次调查应重复3天。

在农田或农田与自然生态系统交接区，可采用长样线，长度500~1000m之间；在生境较为复杂的自然生态系统，可设置多条短样线，每条样线长度20~100m之间。每个调查样地的样线应在7条以内，短样线可适当增加数量。样线的宽度根据视野情况而定，一般为2~6m。调查时速度应保持在2km/h左右，行进期间记录物种（成体、幼体、蝌蚪和卵）和个体数量，不宜拍照和采集。

A.6.2 样方法

在调查样地内随机或均匀设置一定数量的样方，样方应尽可能涵盖不同的生境类型和环境梯度。样方一般设置为方形，大小可设置成5m×5m或10m×10m。样方之间应间隔100m以上。每个观测样地的样方数应在7个以上。依次翻开样方内的石块，检视石块下的个体（包括卵），记录样方内见到的所有两栖动物种类和个体数量。

A.6.3 人工庇护所法

在调查区内随机设置3个10m×10m的样方，样方之间应间隔100m以上。在每个样方内，挑选树蛙常选择的产卵树10棵，每棵树捆绑固定6个竹筒（或PVC桶），2个在地面，2个离地面70cm，2个离地面150cm，共布设60个竹筒（或PVC桶）。竹筒长15~18cm，内径3~6cm，竹筒内加入5~10cm深的水。每天巡视检查一次，记录两栖动物的种类以及成体、亚成体、幼体、蝌蚪和卵的数量。连续进行3次。

A.6.4 人工覆盖物法

根据统计分析的要求和两栖动物物种个体大小、种群数量等因素确定人工覆盖物的数目和尺寸。人工覆盖物的材料为木板或波浪状瓦片较好。尺寸一般为30cm×20cm或以上。样地内应采用统一的覆盖物。人工覆盖物的排列方式一般设置成平行线、网格等形状。网格形状的排列方式可采用5个×5个覆盖物的样方，覆盖物之间的间距为5m。可在放置覆盖物的地方下挖5cm，形成足够的隐蔽空间，坑底铺放一些草叶，形成一个适宜的隐蔽环境。每天早晨8~10时查看一次。查看时迅速拿起覆盖物，捕获匿居其下的两栖动物，并临时放在塑料袋或广口瓶中以备测量、标记和采样。

A.7 底栖动物

A.7.1 调查样地的设置

调查区域为抗虫转基因植物及对照植物种植区的农田水体以及周边灌溉水、池塘、湖泊等自然水域。根据调查水体（水田或者沟渠等）的形态特点、底质类型和底栖无脊椎动物的分布特征等因素，在调查水体内设置若干具有代表性的样线，使同一样线上的差异程度尽可能小，在同一样线上每隔一定距离设置一个采样点。

A.7.2 样品采集

使用底泥采泥器采集泥样。采样时每个采样点累计采样面积 $1/8\text{m}^2\sim 1/3\text{m}^2$ 。即使用 $1/16\text{m}^2$ 的彼得生采泥器或改良的彼得生采泥器（ $1/12\text{m}^2$ ），采泥2~4次，采样厚度一般为10~15cm。

A.7.2.1 大型底栖动物

将获得的底泥样品置于40目筛中，在清水中轻轻摇荡，洗去样品中剩余的污泥，筛洗后挑出其中的杂物和植物枝条、叶片等（仔细检查并拣出掺杂在其中的动物），将筛上肉眼能看得见的全部样品倒入白瓷盘中进行分拣，同时利用解剖镜等工具进行物种分类，并记录数量；如不能够及时分选鉴定，应将初步淘洗后的样品保存于70%乙醇中，可参考相关工具书或在相关分类学家的指导下，对样品进行形态分类和物种鉴别。

A.7.2.2 小型底栖动物

将获得的底泥层置于上层为40目、下层为325目的套筛中，在清水中轻轻摇荡，洗去样品中剩余的污泥。中间截留物用于小型底栖动物的分离，如不能够立即操作，将中间截留物保存于浓度为5%的福尔马林溶液中。采用ludox离心分选法分离小型底栖动物：将中间截留物倒入离心管中，再加入4倍体积的ludox HS-40凝胶（密度约为 1.2g/ml ），2000rpm离心约5min，完成后将离心管中上清液倒在325目的网筛上，用自来水冲洗干净。重复上述步骤三次。将网筛（包括截留物）放入含有0.1%虎红溶液的染色缸中染色1h后，自来水洗净。用吸管将染色后截留物转移到玻璃平皿中，于体视显微镜或解剖镜下对小型底栖动物鉴定并计数。

A.8 鱼类

按照HJ 710.7中规定的方法，调查抗虫转基因植物及其非转基因对照植物生长区域内的内陆水域鱼类。

A.8.1 调查样地的设置

根据待调查区域的水体底质、水生植物组成、水深、水体形态、水流等因素划分成若干小区，使同一小区内变异程度尽可能小。小区的面积和数量可根据调查水体的面积、形态和生境特征、工作条件、经费情况等因素确定。一般设置的小区数量不少于3个。

A.8.2 捕捞调查法

根据调查水体的形态以及生境特征等因素，利用合适的网具进行捕捞，鉴定记录鱼类的种类和数量。对那些现场无法鉴定的物种，要尽可能采集完整的标本并作好记录（包括文字、影像和GPS记录），以备室内鉴定之用。应尽可能记录各物种所有能观察到的形态、生物学现状和生态环境信息等。在调查过程中注意收集标本及其他相关资料，并记录相关信息，保留作为凭证以备核查。

A.9 鸟类

应根据待调查区域内鸟类活动高峰期确定一天中的调查时间。调查时的天气应为晴天或多云天气，雨天或大风天气不能开展调查。一般在早晨日出后3小时内和傍晚日落前3小时内进行调查。需准备8~12倍的双筒望远镜（用于行走时或在树林中调查近距离的鸟类）、25~60倍单筒望远镜（用于调查远距离且较长时间停留在某地的鸟类）、鸟类野外手册或鸟类图鉴等工具书、野外记录表、照相机、全球定位系统（GPS）、温度计、必要的防护用品和应急药品等。

A.9.1 分区直数法

根据地貌、地形或生境类型对整个调查区域进行分区，逐一统计各个分区中的鸟类种类和数量，得

出调查区域内鸟类总种数及其个体数量。该方法适用于较小面积的抗虫转基因植物种植区的鸟类调查。

A.9.2 样线法

根据生境类型和地形设置样线，各样线互不重叠，调查者沿着固定的线路行走，并记录样线两侧所见到的鸟类。每种生境类型的样线在2条以上，每条样线长度以1~3km为宜，若因地形限制，样线长度不应小于1km。调查时行进速度通常为1.5~3km/h。

根据对样线两侧调查记录范围的限定，样线法又分为不限宽度、固定宽度和可变宽度3种方法。不限宽度样线法即不考虑鸟类与样线的距离，固定宽度样线法即记录样线两侧固定距离内的鸟类，可变宽度样线法需记录鸟类与样线的垂直距离。

该方法适用于大规模抗虫转基因植物种植区的鸟类调查。

A.9.3 样点法

样点法是样线法的一种变形，即调查者行走速度为零的样线法。以固定距离设置调查样点，样点之间的距离应根据生境类型确定，一般在0.2km以上，在每个样点调查3~10min。

根据对样点周围调查记录范围的界定，样点法又分为不限半径、固定半径和可变半径3种方法。不限半径样点法即调查时不考虑鸟类与样点的距离，固定半径样点法即记录样点周围固定距离内的鸟类，可变半径样点法需记录鸟类与样点的距离。

样点法更适合在崎岖的山地或抗虫转基因植物种植片段化的生境中使用。

A.9.4 红外相机自动拍摄法

红外感应自动照相机能拍摄到活动隐蔽的地面活动鸟类。安置红外相机前，应调查鸟类的活动区域和日常活动路线。尽量将相机安置在目标动物经常出没的通道上或其活动痕迹密集处。

可采用分层抽样法或系统抽样法设置观测样点。分层抽样法中，每种生境类型设置7个以上样点（样点之间间距0.5km以上）。系统抽样法中，在观测样地内按照固定间距观测样点，每1km²至少设置1个观测样点。

记录各样点名称，进行编号，并用GPS定位仪定位。每个样点于田间或树干、树桩上装设1或2台红外感应自动相机。相机架设位置一般距离地面0.3~1.0m，架设方向尽量不朝东方太阳直射处。相机镜头与地面大致平行，略向下倾，一般与鸟类活动路径呈锐角夹角，并清理相机前的空间，减少对照片成像质量的干扰。每一个样点应该至少收集1000个相机工作小时的数据。在夏季每个样点需至少连续工作30d，以完成一个观测周期。

根据设备供电情况，定期巡视样点并更换电池，调试设备，下载数据。记录各样点拍摄起止日期、照片拍摄时间、动物物种与数量、年龄等级、性别、外形特征等信息，建立信息库，归档保存。

A.10 啮齿动物

A.10.1 单公顷弓形夹法

昼间活动为主的啮齿类动物(如旱獭、黄鼠等)根据生境和地形,选择若干块面积为100m²(10 m×10m或者5m×20m)的样地,为了保证样地为规整的正方形或长方形,可采用罗盘或者GPS定位仪来定位。确定好样地后,边堵洞边计数,24h后查盗开洞(有效洞)数量。同时,在盗开洞口布放好弓形夹,24h后收夹,期间每隔1~2h检查1次(夜间可不必检查),检查中凡捕获的鼠类全部取下,夹子仍布放原洞口。鼠类密度的计算公式:

$$\text{鼠密度(只/hm}^2\text{)} = \text{捕获鼠总只数/单公顷样方数} \quad (\text{A.1})$$

根据鼠密度与有效洞口的比例进行大面积的估算。估算公式:

$$\text{有效洞口系数} = \text{单公顷捕鼠只数/单公顷有效洞口数} \quad (\text{A.2})$$

对于大面积估算的面积应不少于该调查面积的0.5%。这种方法能够在较短的时间内获得该地区鼠类数量的情况,是大面积评价鼠类种群数量和危害程度的重要方法。

A.10.2 5m夹夜法

夜间活动为主的啮齿类动物(如跳鼠、沙鼠等),使用板夹每5m布放1夹,每行100夹,行间距50 m,用面粉加植物油或花生米等作饵料。一般天黑前布放,天亮后检查捕获鼠类情况并收夹。所捕获鼠类的个体数与布放板夹总数的百分比,即为捕获率。计算公式:

$$\text{捕获率}(\%) = \text{捕鼠只数} / \text{布放板夹总数} \times 100 \quad (\text{A.3})$$

为了尽可能准确反映当地啮齿动物种群的数量，建议在一个地区布放的夹夜数不低于1000夹夜。

A.10.3 单公顷样方捕尽法

此法适用于群居的啮齿类动物（如：长爪沙鼠、高原鼠兔等），即把样地分为高、中、低 3 种类型进行调查，每种类型设置2~3个样方，将不同密度进行平均作为该地区该种类的密度。样方设定好后采用堵洞盗开法连续布夹48h，捕尽样地内啮齿类动物。具体方法是：选择好样方后首先进行堵洞，并记录堵洞数量，24h后调查盗开洞数量，并在盗开洞口布放弓形夹进行捕鼠。

A.10.4 标记重捕法

单次标记重捕法指根据第二次捕获量中被标记个体所占比例推算目标动物种群数量的标记重捕法。目标动物的种群大小 N 和方差 V_n 分别按下列公式计算：

$$N = \frac{(M+1)(n+1)}{m+1} - 1 \quad (\text{A.4})$$

$$V_n = \frac{(M+1)(n+1)(M-m)(n-m)}{(m+1)^2(m+2)} \quad (\text{A.5})$$

式中： N —种群个体数；

n —第二次捕捉个体数；

M —第一次释放的标记个体数；

m — n 中被标记个体数。

此法的前提假设是：目标动物种群是封闭的，即没有个体迁入或迁出；所有动物有同等的被捕获率；捕获率不受动物是否做标记的影响；标记不会丢失，抽样是随机的。实际应用时，如果个体受捕率有明显差异，可以将数据按性别、年龄等分组计算，以减少误差。

开放种群的多次标记重捕法的假设前提是种群中任意个体在抽样期 i 有相同的受捕率；所有标记个体在此后有相同的存活率；抽样必须瞬间完成，个体立即释放。在时间节点 i 的种群数量按下列公式计算。

$$N_i = (n_i + 1) \times \frac{M_i'}{m_i + 1} \quad (\text{A.6})$$

$$M_i' = m_i + (R_i + 1) \times \frac{z_i}{r_i + 1} \quad (\text{A.7})$$

式中： n_i —时间节点 i 样本中的捕获数；

m_i —时间节点 i 样本中的标记个体数；

R_i —时间节点 i 中标记个体的释放数；

r_i —时间节点 i 中标记释放，其后又被捕获的个体数；

z_i —时间节点 i 以前被标记，在 i 中不被捕获， i 以后再捕获的个体数。

A.10.5 红外相机自动拍摄法

红外感应自动照相机能拍摄到活动隐蔽的地面活动啮齿类动物。安置红外相机前，应调查啮齿类动物的活动区域和日常活动路线。尽量将相机安置在目标动物经常出没的通道上或其活动痕迹密集处。

可采用分层抽样法或系统抽样法设置观测样点。分层抽样法中，每种生境类型设置7个以上样点（样点之间间距0.5km以上）。系统抽样法中，在观测样地内按照固定间距观测样点，每1km²至少设置1个观测样点。

记录各样点名称，进行编号，并用GPS定位仪定位。每个样点于田间或树干、树桩上装设1~2台红外感应自动相机。相机架设位置一般距离地面0.3~1.0m，架设方向尽量不朝东方太阳直射处。相机镜头与地面大致平行，略向下倾，一般与啮齿类动物活动路径呈锐角夹角，并清理相机前的空间，减少对照片成像质量的干扰。每一个样点应该至少收集1000个相机工作小时的数据。在夏季每个样点需至少连续工作30d，以完成一个观测周期。

根据设备供电情况，定期巡视样点并更换电池，调试设备，下载数据。记录各样点拍摄起止日期、照片拍摄时间、动物物种与数量、年龄等级、性别、外形特征等信息，建立信息库，归档保存。

附录 B

(资料性附录)

抗虫转基因植物对生物群落影响评价中部分生物多样性指标的计算公式

B.1 密度

密度是指单位面积上某物种的个体数目，按式 (B.1) 计算。

$$D_i = \frac{N_i}{A} \quad (\text{B.1})$$

式中： D_i —物种 i 的密度，个/ m^2 ；
 N_i —样方内某物种 i 的个体数，个；
 A —样方面积， m^2 。

B.2 频度

频度是指某物种在全部调查样方中出现的百分率，按式 (B.2) 计算。

$$F_i = \frac{Q_i}{\Sigma Q} \times 100 \quad (\text{B.2})$$

式中： F_i —物种 i 的频度，%；
 Q_i —样地内某物种 i 出现的样方数，个；
 ΣQ —样地内被调查物种的样方总数，个。

B.3 种群优势度

种群优势度是指每种群个体数占总个体数比例的分布，按式 (B.3) 计算。

$$D_i = \frac{T_1}{T}, \frac{T_2}{T}, \dots, \frac{T_n}{T}, \quad (\text{B.3})$$

式中： D_i —种群优势度；
 T_1 —最高优势种个体数，个；
 T_2 —次高优势种个体数，个；
 T_n —最低优势种个体数，个；
 T —各种群总个体数，个。

B.4 α 多样性的测度方法

α 多样性是指在栖息地或群落中的物种多样性，用以测度群落内的物种多样性。 α 多样性的测度方法主要包括物种丰富度（物种数量）、辛普森（Simpson）指数、香农-维纳（Shannon-Wiener）指数和均匀度指数等方法。

B.4.1 辛普森指数

辛普森指数按式 (B.4) 计算。

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2 \quad (\text{B.4})$$

式中： P_i —物种 i 的个体数占群落内总个体数的比例， $i=1, 2, \dots, S$ 。
 S —物种种类总数，个。

B.4.2 香农-维纳指数 (H) 按式 (B.5) 计算:

$$H = - \sum P_i \frac{\ln P_i}{\ln S} \quad (\text{B.5})$$

式中: P_i —物种 i 的个体数占群落内总个体数的比例, $i=1, 2, \dots, S$ 。

S —物种种类总数, 个。