

ICS 65.150
CCS B 50

DB4505

北海市地方标准

DB4505/T 0009—2023

岛礁石斑鱼资源养护技术规范

Technical specification for resource conservation of reef-inhabiting groupers

地方标准信息服务平台

2023 - 03 - 08 发布

2023 - 04 - 08 实施

北海市市场监督管理局 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	2
5 调查与评估	2
6 养护方法	2
6.1 鱼种选择	2
6.2 亲鱼的投放	2
6.3 苗种投放	3
7 监测	3
7.1 水环境监测	3
7.2 渔业资源监测	3
7.3 环境 DNA 监测	3
8 效果评估	3
8.1 环境要素	3
8.2 生物要素	3
8.3 生态压力	3
8.4 渔业生产要素	3
9 管理	4
附录 A（资料性） 环境 DNA 的调查方法	5
A.1 抽样	5
A.2 运输	5
A.3 保藏	5
A.4 DNA 提取	5
A.5 鱼类物种鉴定	5
参考文献	8

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。

本文件由北海市海洋局提出并归口。

本文件起草单位：中国科学院南海海洋研究所、中山大学、广东海洋大学、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、夏军红、王学锋、李广丽、周永灿、陈廷、吴小易、李文笙、孙彩云、陈偿、罗鹏、柯志新、田昌绪、李建龙、姜发军、宋建强、陈文林。

地方标准信息服务平台

岛礁石斑鱼资源养护技术规范

1 范围

本文件规定了岛礁石斑鱼资源养护的海域选择和资源调查与评估要求，描述了资源养护、监测与效果评估的方法，提供了石斑鱼资源养护管理的指导意见。

本文件适用于北海市辖区内岛礁石斑鱼的资源养护。

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 12763.9 海洋调查规范 第9部分：海洋生态调查指南
- GB/T 18654.2 养殖鱼类种质检验 第2部分：抽样方法
- SC/T 9401.4 水生生物增殖放流技术规程 第4部分：水域条件
- SC/T 9401.6 水生生物增殖放流技术规程 第6部分：放流物种质量
- SC/T 9401.7 水生生物增殖放流技术规程 第7部分：检验
- SC/T 9401.11 水生生物增殖放流技术规程 第11部分：投放
- SC/T 9403.5 海洋渔业资源调查规范 第5部分：海洋渔业资源调查
- SC/T 9405.5 岛礁水域生物资源调查评估技术规范 第5部分：礁栖性鱼类资源调查
- SC/T 9405.7 岛礁水域生物资源调查评估技术规范 第7部分：渔业生产调查
- SC/T 9417.4 人工鱼礁资源养护效果评价技术规范 第4部分：调查
- SC/T 9417.5 人工鱼礁资源养护效果评价技术规范 第5部分：评估

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

礁栖石斑鱼 reef-inhabiting grouper

自然栖息于珊瑚礁或岩礁海域的石斑鱼亚科鱼类。

3.2

生物资源养护 biological resource conservation

通过修复和改善生物的栖息地环境，对资源受损的某种或多个物种进行种群重建，增加生物多样性和增强生态系统的稳定性，以保护和恢复生物资源。

3.3

石斑鱼生物量 Grouper biomass

栖息于某一岛礁海域的石斑鱼数量。

3.4

环境 DNA environmental DNA

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 养护礁栖石斑鱼资源的岛礁海域应符合国家和地方的国土空间规划、旅游规划、渔业发展规划和生态红线要求，不与自然保护区相冲突。

4.2 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结果，针对不同种类的石斑鱼，选择合适的资源养护海域。

4.3 养护海域应符合 SC/T 9401.4 的规定，且满足下述条件：岛礁为岩礁，水流较缓且附近底质起伏而又多石砾；溶解氧 ≥ 5 mg/L，盐度 22~35。

5 调查与评估

5.1 按照 SC/T 9405.5 规定的方法对拟进行资源养护海域的石斑鱼生物量进行调查和评估。

5.2 按照 SC/T 9417.5 规定的方法和内容对拟进行资源养护海域的底质和水文状况等环境要素进行调查和评估。

5.3 按照 GB/T 12763.9 规定的方法对拟进行资源养护海域的海洋生物群落结构、海洋生态系统功能和海洋生态压力进行评估。

6 养护方法

6.1 鱼种选择

根据目标海域的功能定位和海域环境，选择目标海区及其周边海区现有或历史上存在的石斑鱼种类为养护目标种类。可选择斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、棕点石斑鱼 (*E. fuscoguttatus*) 和豹纹鳃棘鲈 (*Plectropomus leopardus*) 为目标种类。

6.2 亲鱼的投放

6.2.1 亲鱼来源要求

应捕自天然海区或是原种场保种的石斑鱼原生种。

6.2.2 亲鱼质量要求

按照 SC/T 9401.7 规定的方法对亲鱼进行检疫，除满足不携带病原的条件之外，还需达到以下要求：

- a) 体色正常、体格健壮、无外伤、无畸形；
- b) 性腺发育良好、雌性亲鱼腹部膨大且柔软，轻压雄性亲鱼腹部能流出乳白色精液；
- c) 反应灵敏、活力好。

6.2.3 亲鱼投放方法

按照 SC/T 9401.11 规定的方法在养护海域进行亲鱼投放。

6.3 苗种投放

6.3.1 苗种来源要求

培育苗种的亲鱼应捕自天然海区或是原种场保种的原生种繁殖的F1代，不得使用近亲繁殖亲鱼的后代。

6.3.2 苗种质量评价

按照SC/T 9401.6和SC/T 9401.7规定的方法进行检验，评价苗种质量。

6.3.3 投放方法

按照SC/T 9401.11规定的方法进行石斑鱼苗种投放。

7 监测

7.1 水环境监测

按照SC/T 9417.4规定的方法对养护海域的水环境进行监测。

7.2 渔业资源监测

按照SC/T 9403.5和SC/T 9405.5规定的方法和要求，对养护海域石斑鱼资源进行样品采集和监测，监测内容包括石斑鱼种类组成、数量、群体结构和生物学特征。

7.3 环境DNA监测

按照附录A的方法对放流海域的环境DNA进行调查和分析，鉴定放流海域存在的石斑鱼种类和相对丰度，进而评价石斑鱼资源养护效果。

8 效果评估

8.1 环境要素

按照本文件5.2中环境要素的调查和评估方法对石斑鱼资源养护海域的底质和水文状况等环境要素进行评估。

8.2 生物要素

对SC/T 9417.5中表2所列的生物要素进行评估。

8.3 生态压力

按照本文件5.3中的评估方法对石斑鱼资源养护海域的海洋生物群落结构、海洋生态系统功能和海洋生态压力进行评价。

8.4 渔业生产要素

按照SC/T 9405.7规定的方法对各类作业的努力量、渔获量、单位动力量渔获量、产值和成本等渔业生产要素进行评估。

9 管理

应定期巡查石斑鱼资源养护海域，防止非法捕捞养护区的石斑鱼资源。

地方标准信息服务平台

附录 A (资料性) 环境 DNA 的调查方法

A.1 抽样

按照GB/T 18654.2规定的抽样方法执行。每个区域至少设置3个取样点，在每个取样点贴近海底沉积物处取1 L海水，重复取样3次，1 L去离子水作为对照。

A.2 运输

样品在运输过程中，辅以干冰或冰块，将容器内的温度控制在25℃以下。

A.3 保藏

样品运送至实验室后，采用孔径为0.22 μm的醋酸纤维素过滤膜进行过滤。过滤后的滤纸装进试管，保存于-80℃，直至DNA抽提。

A.4 DNA 提取

按照常规酚-氯仿法提取总DNA。DNA放入-80℃或-20℃低温冰箱长期保存。

A.5 鱼类物种鉴定

A.5.1 用于鱼类鉴定的条形码

用于鱼类属、种鉴定的条形码为12S rRNA基因，片段长度为163 bp~185 bp。

A.5.2 PCR引物

A.5.2.1 第1轮 PCR 扩增鱼类通用引物序列

MiFish-U-F:

5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGTCGGTAAAACTCGTGCCAGC-3'

MiFish-U-R:

5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATAGTGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'

在上述两条引物中，前面的33个和34个核苷酸(nt)部分为高通量测序引物的结合位点，随后的6个随机引物(NNNNNN，如AAGGTT)用于促进测序平台流动池(flowcell) DNA簇的分离，最后的21个和25个碱基序列为12S rRNA基因通用引物序列。

A.5.2.2 第2轮扩增通用引物

Forward:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT-3'

Reverse:

5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGATXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'

在上述两条引物中，8个连续X碱基代表Illumina测序技术通用的Index序列，可以用于区分不同样本；连续X碱基前面的5'端序列允许扩增产物与测序平台流动池(flowcell)的寡核苷酸进行特异结合，连续X碱基后面的3'端序列是Illumina测序引物结合位点，该引物组合为Illumina测序建库专用引物。

A. 5. 3 PCR扩增

A. 5. 3. 1 第一轮 PCR 扩增

PCR反应在热循环仪器（如Model 9700）中进行，PCR体系的反应体积为12 μL，其中包括4.6 μL双蒸水、6 μL 2×HiFi HotStart ReadyMix、0.2 μL正向引物（10 μM）、0.2 μL反向引物（10 μM）和1.0 μL总DNA模板（50 ng/μL）。PCR热循环条件：95 °C高温预变性3 min；95 °C变性20 s，65 °C退火15 s，72 °C延伸15 s，共30个循环；72 °C再延伸5 min。

A. 5. 3. 2 第二轮 PCR 扩增

将第一轮PCR产物稀释10倍作为第二轮PCR模板，PCR体系的反应体积为12 μL，包括6.0 μL 2×HiFi HotStart ReadyMix、0.7 μL正向引物（5 μM）、0.7 μL反向引物（5 μM）、3.6 μL双蒸水和1.0 μL模板。PCR热循环条件：95 °C预变性3 min；98 °C变性20 s，65 °C退火15 s，72 °C延伸15 s；72 °C再延伸5 min。

A. 5. 4 PCR产物检测

利用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。取5 μL PCR产物，上样后在120 V恒压下电泳25 min。采用DNA凝胶成像系统观察扩增情况，目标基因序列约为370 bp。

A. 5. 5 测序

切胶纯化PCR产物，送测序服务公司进行Illumina高通量测序。

A. 5. 6 石斑鱼属、种鉴定

A. 5. 6. 1 序列聚类

采用生物信息学软件FastQC、Cutadapt和USEARCH，对原始测序数据质量进行分析并去除低质量数据。采用QIIME2分析软件，在97%的序列相似水平下，对高质量的eDNA测序序列数据进行聚类，去除冗余序列，获得所有序列的分类单元（OTU）。

A. 5. 6. 2 物种注释

通过序列比对方法，将所有的分类单元数据与已知物种的核糖体RNA序列数据库进行序列比对，从而获得每个分类单元的物种注释数据。

A. 5. 6. 3 分类鉴定

基于物种注释数据，鉴定eDNA样本中的石斑鱼属和种。

A. 5. 7 特定石斑鱼属、种的相对丰度计算

A. 5. 7. 1 特定石斑鱼属的相对丰度为特定石斑鱼属序列条数占全部鱼类序列条数的百分比，计算见公式（A. 1）：

$$R_g = (G_n/T_n) \times 100\% \dots\dots\dots (A. 1)$$

式中：

- R_g ——特定石斑鱼属相对丰度，用%表示；
- G_n ——特定石斑鱼属的序列条数，单位为条；
- T_n ——全部鱼类序列条数，单位为条。

A.5.7.2 特定石斑鱼种的相对丰度为特定石斑鱼种序列条数占全部鱼类序列条数的百分比，计算见公式 (A.2)：

$$R_s = (S_n/T_n) \times 100\% \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

R_s ——特定石斑鱼种相对丰度，用%表示；

S_n ——特定石斑鱼种的序列条数，单位为条；

T_n ——全部鱼类序列条数，单位为条。

地方标准信息服务平台

参 考 文 献

[1] M. Miya, Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh, and W. Iwasaki. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. open sci.*, 2015, 2(7): 150088.

地方标准信息服务平台