



国家基因库
CHINA NATIONAL
GENEBANK

华大基因—国家基因库系列

后基因组时代 鱼类样本库建设与实践

孙 颖 石 琼◎主编



科学出版社

华大基因-国家基因库系列

后基因组时代鱼类样本库 建设与实践

孙 颖 石 琼 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书围绕鱼类样本库建设这个中心论点,回答为什么(鱼类种质资源保存和利用)、现状如何(国内外现状及现今的挑战和机遇)、怎样做(标准规范和最佳实践)、怎么用(配套数据库)等几个关键性问题,囊括鱼类样本库建设的几乎所有内容,阐述相关的生命伦理、质量控制、标准规范等重点论题,并且从鱼类样本的采集、处理、储存到基于样本的核酸提取、序列分析等均有详细的说明和指导,同时介绍鱼类样本库配套的生物信息数据库建设及模块化解决方案,让读者对鱼类样本库建设有一个全面而深入的认识。

作为“华大基因-国家基因库系列”丛书中的一本,本书可作为深圳华大基因学院的研究生教材,也可供动物学、水生生物学、鱼类学有关专业的高年级本科生、研究生及从事生物样本库和信息数据库建设的相关学者参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

后基因组时代鱼类样本库建设与实践/孙颖,石琮主编. —北京:科学出版社, 2017.1

(华大基因-国家基因库系列)

ISBN 978-7-03-051169-0

I.①后… II.①孙… ②石… III. ①鱼类-基因组-信息-数据库 IV.①Q959.403

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 319172 号

责任编辑:夏 梁 / 责任校对:郑金红

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2017 年 1 月第一次印刷 印张:12 1/2

字数:282 000

定价:88.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



《后基因组时代鱼类样本库建设与实践》编委会

主 编 孙 颖 石 琼

编 委 黄 玉 赵晓萌 王 敏 徐 跑 徐军民

刘 凯 徐钢春 陈松林 邵长伟 徐东坡

前 言

鱼类资源是全球生物资源的重要组成部分。据权威机构（世界鱼类数据库 FishBase，又名鱼库）记载，全世界鱼类多达 33 100 种，占有脊椎动物种类数的一半以上。它们是最古老的脊椎动物，不仅物种数目庞大，多样性也极其丰富，体现在基因、表型、行为、生理生化等众多方面，是生物学家眼中炙手可热的研究对象。鱼类和人们的生活也密切相关，鱼肉是一种优质的动物蛋白，是日常生活中常见的餐桌美食，鱼粉、鱼油、鱼类活性蛋白这些添加剂、保健品、药品等也在人们生活中发挥着无法替代的巨大作用。

2013 年，生物样本库（biobank，又称生物银行）被美国《时代》杂志誉为“改变世界的十大规划”之一，近几年来受到各国政府、科研机构的广泛关注和高度重视，高水平、高质量的生物样本库是种质资源的保护中心，更成为疾病研究、药物研发、临床诊断等核心技术研究的宝贵资源。

鱼类样本库建设早在 19 世纪就已开始，虽然当时“生物样本库”这一概念尚未明朗，但鱼类样本的收集、处理和保存工作已在全球各地展开。传统鱼类样本库建设以浸制标本为主，存在局限性，在这个基因测序技术、生物信息分析技术、大数据处理技术高速发展的后基因组时代，浸制标本无法满足提取高质量 DNA 和 RNA 的需求。因此，传统鱼类样本库纷纷向以低温和超低温技术为支撑的组学级别的鱼类样本库转型。超低温冰箱、干冰、液氮被用于长期保存或运输冻存样本，样本类型也从全鱼、骨架扩展到各部位组织、血液、细胞系、生殖细胞、肠道排泄物，以及提取的 DNA、RNA、蛋白质等生物大分子物质，这些高质量样本能有效应用于基因组、宏基因组、转录组、蛋白质组的测序和分析，产生信息量巨大的组学“大数据”，并最终实现样本资源和数据资源的价值最大化，为鱼类基础研究、遗传多样性保护、种质资源的开发利用、疾病防控等众多领域提供强大支撑。

随着基因组学技术的快速发展，越来越多的水生生物被用作全基因组测序的对象，相应生物学特性的分子机制被逐步揭示出来，而且部分数据已用于产业化应用（如分子育种、海洋药物研发等）。为了应对后基因组时代水生生物样本库的建设和发展问题，我们特别编写本书。以鱼类样本库的建设与实践为代表，我们期待为系统和科学地构建我国的水生生物基因库提供技术参考。

本书围绕鱼类样本库建设这个中心论点，回答为什么（鱼类种质资源保存和利用）、现状如何（国内外现状及现今的挑战和机遇）、怎样做（标准规范和最佳实践）、怎么用（配套数据库）等几个关键性问题，囊括鱼类样本库建设的几乎所有内容，阐述相关的生命伦理、质量控制、标准规范等重点论题，并且从鱼类样本的采集、处理、储存到基于样本的核酸提取、序列分析等均有详细的说明和指导，同时介绍鱼类样本库

配套的生物信息数据库建设及模块化解决方案,让读者对鱼类样本库建设有一个全面而深入的认识。

本书的第三部分为全书的核心部分,详细阐述了基于标准操作规程(SOP)和最佳实践(best practice)的鱼类样本库综合管理体系,以国内外重要文献为资料来源,结合我们多年在鱼类样本库建设方面的经验教训,力求详细地、精确地、完整地介绍鱼类样本库建设的各个环节和步骤,从鱼类样本的采集和解剖、DNA/RNA的制备、储存、运输和出入库管理、样本信息的储存和共享等多个方面提供了极其详尽的说明和指导,让读者能身临其境,一步一步地掌握鱼类样本库建设的精髓,同时让本书成为一本真正具有指导意义和重要借鉴意义的样本库建设类参考书籍。

本书的出版得到深圳市科技计划深港创新圈项目(SGLH20131010105856414)、深圳市未来产业专项(JSGG20141020113728803)、广东省海洋经济动物分子育种重点实验室(广东省省部产学研专项 2013B090800017)和深圳国家基因库的经费支持。华大基因是全球最大的基因组学研究中心,其旗下深圳市华大海洋研究院、深圳华大基因研究院、深圳国家基因库和深圳华大水产科技有限公司等部门的部分同事参与了本书的编写和校对;外单位涉及中国水产科学研究院淡水渔业研究中心和中国水产科学研究院黄海水产研究所,在此一并致以诚挚的谢意。

作为“华大基因-国家基因库系列”丛书中的一本,本书可用作深圳华大基因学院的研究生教材。本书的主要内容涉及鱼类种质资源样本的采集与保存、样本库建设的标准规范与最佳实践、配套生物信息数据库的建设和模块化解决方案等领域,并以正在实施的国际合作项目“千种鱼转录组计划”为操作案例来提供参考。附录部分包括实际应用中的表格表单汇总,以及为初学者提供详细指导的词汇表。

由于编者水平有限,本书不足之处在所难免,敬请大家批评指正。

孙 颖 石 琼

2016年8月15日

目 录

前言

第一部分	鱼类种质资源概述	1
第一章	我国主要水域的鱼类资源现状	3
第二章	鱼类种质资源面临的主要问题及对策	7
第三章	鱼类种质资源的应用前景	11
第二部分	鱼类样本库建设沿革与发展现状	15
第一章	生物样本库概述	17
第二章	传统鱼类样本库的建设概况	21
第三章	后基因组时代鱼类样本库面临的挑战	24
第四章	下一代测序技术催生组学级别的样本库建设	28
第五章	组学级别鱼类样本库的建设概况及展望	31
第三部分	鱼类样本库建设标准规范及最佳实践	41
第一章	伦理道德规范	43
第二章	样本库机构设置和人员培训	51
第三章	标准规范制定	57
第四章	鱼类样本采集规范	59
第五章	鱼类样本解剖规范	63
第六章	样本前处理	68
第七章	样本制备	72
第八章	样本储存	85
第九章	样本出入库管理	89
第十章	样本包装和运输	96
第十一章	质量控制	98
第十二章	文件控制	100
第十三章	仪器管理维护	104
第十四章	安全管理	114
第四部分	配套生物信息数据库建设	125
第一章	生物信息数据库	127
第二章	国内外鱼类信息数据库	129

第三章	千种鱼转录组数据库及网站建设	134
第五部分	模块化解决方案	143
第一章	样本野外采集模块	145
第二章	运输模块	148
第三章	样本库模块	150
第四章	鱼类精子冷冻保存模块	152
第五章	基因组学模块	154
第六部分	依托 Fish-T1K 项目建设的鱼类样本库和数据库	157
第一章	Fish-T1K 项目简介	159
第二章	标准操作规程	162
第三章	Fish-T1K 当前进展	167
第四章	Fish-T1K 样本库及数据库的应用及展望	171
附录 1	表格表单	177
附录 2	词汇表	187

第一部分 鱼类种质资源概述

第一章 我国主要水域的鱼类资源现状

我国幅员辽阔,不同地域地形和气候的差异极大,境内大小河流、湖泊纵横交错,组成独具我国特色的水系网系统,尤其是以长江中下游为中心的东南部,水系更为密集。由于我国各水系均深处内陆,因此属于江河水系,主要包括长江水系、黄河水系、珠江水系及海河水系等。其中长江是我国的第一大河流,水系十分庞大,全长约 6300 km,共有支流 700 余条,流域覆盖 20 余个省(市)。得益于优越的水域环境条件,长江流域渔业资源十分丰富,自古以来就盛产“四大家鱼”(青草鲢鳙)、长吻鮠、刀鲚、暗纹东方鲀、鲂及鳊鲴等众多经济鱼类。相对于长江而言,黄河及珠江水系的流域面积和水量均较小,鱼类物种数量及资源量也显著低于长江。

长江水系现有鱼类 370 余种,分别隶属于 17 目 52 科 178 属,其中鲤科鱼类占物种总数的一半左右。所有鱼类中纯淡水鱼类共 294 种,咸淡水鱼类 22 种,海淡水洄游性鱼类 9 种,海水鱼类 45 种^[1]。黄河水系调查获得的土著鱼类总计 87 种,分别隶属于 13 目 23 科^[2]。珠江水系在 20 世纪 80 年代初调查发现共有 385 种鱼类,几乎占了我国淡水鱼类的“半壁江山”^[3],主要盛产“四大家鱼”、鳊、鲂、鲈、鳊等经济鱼类。对于长江入海口及杭州湾的近海区而言,长江水域冲淡水及台湾暖流等自然因素对其海流水系的影响至关重要,而近海渔业资源在东海渔业上具有举足轻重的地位。该水域饵料生物相当丰富,是多种洄游性鱼类及河口鱼类的产卵场和索饵场,主要经济物种包括带鱼、大黄鱼、小黄鱼、银鲳、龙头鱼和海鳗等^[4],渔业产量及产值均相对较高。

1 渔产量变化

我国主要的江河水域地形差异较大,水系众多,鱼类物种多样性及资源量差异较大且各具特色。但是,近几十年以来,各大水系无一例外地受到水域生态环境恶化、过度捕捞以及涉水工程大量兴建等外界扰动的影响,导致渔业捕捞量均呈现急剧下降的趋势。

渔产量是某一特定水域所能产出的所有鱼类的物种数和资源量,用来衡量该特定水域的相对捕捞产值及其经济效益。天然水域捕捞量的变化在一定程度上反映了该水域渔业资源量的变化趋势。20 世纪 90 年代以后,随着捕捞网具的改进、捕捞技术的提升及捕捞强度的增大,长江流域渔业捕捞量大幅下降。20 世纪 80 年代,长江流域年均渔获量约为 20 万 t,到 21 世纪初期已减少为 10 万 t^[1]。在此背景下,长江流域各江段渔业资源均出现了不同程度的下降:长江上游江段渔业资源显著衰退,捕捞量相比 80 年代下降 50%^[5]。湖北省是“四大家鱼”鱼苗的主要产区,在 50 年代年均产苗 40 亿尾,60

年代年均产苗 83.8 亿尾, 70 年代年均产苗 29.6 亿尾, 80 年代年均产苗 20.7 亿尾, 90 年代年均产苗 6.6 亿尾, 目前这一衰退趋势仍在延续^[1]。

黄河流域渔业资源衰退的趋势同样十分显著, 20 世纪五六十年代, 河流生态环境状况保持良好, 鱼类资源丰富, 产量最高。该时期初步估计黄河干流渔业产量可达 1.5×10^6 kg, 渔获物组成以黄河鲤为主, 个体相对较大, 一般均重在 1000 g 以上, 10~15 kg 的个体在渔获物中出现的频率较高。随着水电设施的不断增多和下游水质污染的不断加剧, 加之河道周期性断流和调水挖沙的影响, 黄河鱼类种群数量呈急剧下降趋势。从 70 年代开始, 渔业资源同样出现显著下降, 80 年代的渔业产量相比 50 年代下降 80%~85%^[2, 6]。该时期渔获物中黄河鲤的优势体重降至 700 g 左右, 比例达到 44.7%^[7]。由于受到黄河渔业资源锐减的影响, 专业渔民数量减少, 渔业捕捞功能不断退化。目前, 人类的活动强度仍在不断加强, 水域生态环境进一步恶化, 黄河流域渔业资源的衰退逐年加剧, 鱼类资源分布范围日益缩减, 土著鱼类种群数量呈下降趋势, 个体趋于小型化。

与长江和黄河相似, 在受到人类活动加剧及涉水工程建设等诸多负面因素的影响下, 珠江水系的渔业资源也呈现出显著的衰退趋势。在各类渔获物中, 衰退最为明显的是鲮。20 世纪 80 年代初期, 珠江鲮的年捕捞量还有数百吨, 而目前珠江鲮已经销声匿迹。近几年调查表明, 珠江水系“四大家鱼”的资源量也日益衰竭, 青鱼及草鱼的产量极低, 同时广东鲂、鲮、鳊和花鲢等重要经济鱼类的捕获规格均呈下降趋势。

近年来, 与内陆水域渔业资源普遍衰退的趋势相近, 由于传统拖网作业和高强度的捕捞量及水域环境污染加重, 海洋渔业资源的衰退趋势也越来越显著。一些经济鱼类的渔获物品质下降, 个别物种如大黄鱼等已经基本上处于绝迹的状态, 严重影响了海洋渔业的持续、稳定发展。长江口近海鱼类多样性相比于 20 世纪 80 年代有所下降。研究证明, 高强度的捕捞和近海环境污染是造成鱼类群落多样性降低的主要原因^[4, 8], 并且赤潮的发生与近岸环境的污染给近岸产卵场带来严重的危害, 可导致鱼类的大面积死亡, 给鱼类的多样性也带来负面影响^[9], 从而使渔业资源受到严重威胁。

2 经济鱼类物种资源的变化

传统意义上的经济鱼类, 主要是指在渔获物中占有较高比重, 按市场价格出售可以成为渔民主要渔业收入的鱼类品种。而某一水域经济鱼类的物种数量和资源量代表着该水域水体的生产能力。

长江水域盛产草鱼、青鱼、鲢、鳙、鳊、鲂、鲤、鲫、铜鱼、圆口铜鱼、长吻鮠、鮡、黄颡鱼、刀鲚、凤鲚和银鱼等数十种经济鱼类。近半个世纪, 长江上游主要经济鱼类物种数量经历了持续减少的过程: 20 世纪 60 年代中期, 主要经济鱼类有 50 多种, 以平原鱼类占绝对优势, 其中产漂流性卵和半漂流性卵的半洄游性鱼类在渔获物中占有相当比重; 70 年代中期, 主要经济鱼类减少到 30 种; 80 年代初期, 主要渔业对象减至 20 种, 减少的种类主要为鳊、鳙、鳊、赤眼鳟、青鱼、铜鱼、胭脂鱼及鳊鲌等大中型洄游性经济鱼类^[1, 5]。以湖北省宜昌江段为例, 70 年代, 该江段渔获物中“四大家鱼”渔获

尾数占总渔获物的比例为 6%，渔获重量占比则为 34%；圆口铜鱼尾数和重量占比分别为 32%和 9%；长吻鲢尾数和重量占比分别为 6%和 10%。20 世纪 90 年代以后，宜昌江段渔获物中“四大家鱼”渔获尾数比例降至 3%，渔获重量比例降至 10%；圆口铜鱼尾数和重量占比分别降至 3%和 1%；长吻鲢尾数和重量占比分别降至 2%和 3%^[1]。湖北省是整个长江“四大家鱼”的产苗基地，“四大家鱼”天然资源的衰退，将影响整个长江水系的渔业产量。同时，由于受到三峡水库及葛洲坝水库的影响，不同水体水文结构对经济鱼类的分布也有至关重要的作用。在 20 世纪 70 年代，巴南和万州江段铜鱼和圆口铜鱼捕捞量约占总渔获物的 70%^[10]，20 世纪 90 年代末，上述两种鱼类捕捞量比例分别降至 46.87%和 16.76%^[11]，而目前这两种铜鱼在巴南和万州仅分别占渔获物总重的 35.7%和 8.46%，在秭归至巫山江段捕捞量已极低^[12]。

黄河鲤是黄河水系最主要的经济鱼类，但在覆盖黄河上游磴口、中游龙门和下游花园口的调查中发现，在黄河主要断面的渔获物中黄河鲤并不占据绝对优势，一些经济价值不高的小型鱼类如鲃亚科鱼类和鲮科鱼类在数量上占有相对优势，主要经济鱼类产量下降，性成熟年龄偏晚，鱼类生长缓慢，逐渐趋于小型化^[13]。在 20 世纪 60 年代，黄河鲤占各河段渔获物的 50%~70%，而在随后的 20 年逐年递减，到 80 年代仅为 20%左右，而鲃和黄颡鱼占到了 30%~70%^[14]。据统计，80 年代黄河河南段鲤 500~1000 g 的个体占 67.2%，而目前花园口河段鲤平均体重均不超过 100 g。50 年代黄河磴口河段每船日捕捞量可达 20~65 kg，目前仅有 1~3 kg，已经丧失了捕捞价值，许多专业渔民靠捕鱼已基本无法维持生计^[15]。

20 世纪 80 年代初期调查发现，珠江水系主要经济鱼类如鲈、鳊等捕捞产量较高，沿岸渔民捕捞效益良好。但到了 21 世纪初期，珠江水系的经济鱼类捕捞产量逐年下降，种类也随之减少，渔获物呈现出低龄化和小型化的趋势。据 2004 年广东省海洋与渔业局的统计资料显示，西江广东江段总捕捞产量为 5955 t，其中鱼类捕捞量为 4445 t，较 1982 年下降 46.5%，经济鱼类的衰退现象十分严重^[3]。2006 年对西江肇庆江段渔业资源的调查结果显示：重要经济鱼类如鲮、三线舌鲷、鳊、大眼鲈等逐渐减少并有绝迹的趋势，“四大家鱼”资源量日趋衰竭，广东鲂、鲮、鳊和花鲢等鱼类的捕获规格明显下降^[4]。

河口近海渔获物主要以洄游性鱼类为主，如刀鲚、凤鲚、前颌间银鱼、鲢、暗纹东方鲀、鳊等。20 世纪 70 年代，鲢、凤鲚、刀鲚、前颌间银鱼、中华绒螯蟹构成河口近海区主要渔汛。90 年代以后，鲢、前颌间银鱼渔汛已基本消失，刀鲚、凤鲚、中华绒螯蟹捕捞量锐减，鳊苗和蟹苗产量大幅度下降，几乎形不成渔汛。长江口是鳊苗和蟹苗的主产区，20 世纪 90 年代鳊苗年均捕捞量为 2992.3 kg，2002 年降至 1724 kg；蟹苗 80 年代年均捕捞量为 11 773.8 kg，90 年代年均捕捞量降至 2305.9 kg，2002 年捕捞量仅为 40 kg，苗汛几近消失。凤鲚一直是长江口最为重要的渔业对象之一，历史上最高捕捞量曾超过 5000 t。90 年代以后捕捞量大幅波动，总体呈下降趋势，最高年份达 3252 t（1995 年）；2003 年以后捕捞量持续下滑，至 2015 年降至 3.2 t，相比于 1995 年下降 99.90%。随着凤鲚资源的急剧衰退，渔民捕捞产值大幅下滑，2015

年单船全汛捕捞产值仅为 7800 元,不足最高年份的 15%,出航捕捞的收入已经不足以覆盖捕捞成本,渔民捕捞积极性低下,单船全汛作业天数从 1997 年的 58.5 天降至 2015 年的 11 天。

3 鱼类群落结构的变化

鱼类群落结构是指在一定时间和一定地理区域内,生活在同一环境下具有相互联系的不同鱼类种群的联合体。鱼类群落结构在一定程度上反映出某一水域内的鱼类物种数、物种资源量、物种之间的生长及繁殖差异等。长江流域水流量巨大,鱼类物种资源相对丰富,部分鱼类需要借助特定水文结构的水域才能完成其生活史。整体来说,长江水域支流流域的鱼类多样性小于干流,其次是大型一级支流,如岷江、沱江、嘉陵江等。但近几十年以来,长江水域尤其是上游江段的物种多样性逐渐降低。1997~2003 年中国科学院水生生物研究所在长江上游干流调查到鱼类 78~114 种,其中特有鱼类 22~28 种;而 2005 年长江上游干流仅采集到 51 种鱼类,与历史的 164 种相比,物种多样性变化十分明显^[5]。

同样,由于受到环境污染和过度捕捞等因素的影响,黄河水域的鱼类种群多样性发生了显著变化。黄河港口段 20 世纪 60 年代鲤占渔获物的 72%;80 年代鲇占 41.5%,黄颡鱼占 26.3%,鲤占 21%;目前鲤占总重量的 26.4%,鲇占总重量的 18.3%,乌鳢占总重量的 4.7%。鱼类群落结构表现出杂食性鱼类占优—肉食性鱼类占优—杂食性鱼类占优。同时,主要经济鱼类种群小型化趋势明显^[16]。

2004 年对长江口近海水域鱼类资源的调查发现,较之 1960 年,长江口近海的鱼类优势种组成和结构特征均发生了较大的变化。在 20 世纪 60 年代,优势种的分布较为均匀,主要以底层优质鱼类为主。到了 2004 年,除了带鱼、小黄鱼等少数绝对优势种外,鱼类群落中种类组成变为以中上层鱼类和小型低质杂鱼为主;即使在群落中占有绝对优势的带鱼、小黄鱼等传统经济鱼类,其种群结构也表现出个体小型化、生长速度加快、性成熟提前等种群明显衰退的生物学现象^[17, 18]。在持续高强度捕捞和水域污染的影响下,长江口近海原有的鱼类群落结构基本解体,逐渐被新成长的次生生物群落或食物链中的次级、初级消费者替代^[19],鱼类群落组成也由 60 年代的以底层中型鱼类为主转变为以中上层小型鱼类为主^[8]。

第二章 鱼类种质资源面临的主要问题及对策

1 鱼类种质资源

种质资源 (germplasm) 又称遗传资源 (genetic resource)。广义上讲, 种质资源指含有物种遗传信息的任何个体、组织、细胞或细胞提取物等, 是动植物繁殖、育种及其他科学研究的重要物质基础。鱼类种质资源的存在形式多种多样, 可以是生长在良种场或水族馆里的活鱼活虾, 可以是冷冻在细胞库中的一个卵子或者精子, 也可以是密封在 Eppendorf 管 (EP 管) 里经特殊环境保存的核酸和蛋白质等生命大分子物质。目前, 鱼类种质资源可以根据不同的样本类型分成以下几种表现形式。

活体。鱼类活体种质资源不仅包括生活在自然水体中的野生鱼类, 还包括在种质资源保护区、良种场、养殖场、水族馆等人工条件下饲养的鱼类。活体保存有就地保护和易地保护 (狭义) 两种方式。就地保护是指在生物繁殖、生长、进化的原栖息地, 通过直接保护其生存环境而间接保护鱼类种群的方法。易地保护是指在物种原栖息地外的人工环境下, 对个体或群体给予静态型的保护。活体形式是保存一个物种种质资源最优但也是最难的保存方式, 保存一个物种的鲜活雌雄个体就意味着保存了该物种的一切, 可以通过自然或人工繁殖等手段恢复出一个种群。

标本。鱼类标本通常有“干”和“湿”两种保存方法。“干”即干制标本, 先剔除目标鱼类内脏和肌肉, 确保鱼皮、鱼鳞、鱼鳍完整, 经过固定、风干、填充、补色、上油和喷塑封闭等步骤制成^[20]。干制标本能完整地保存样本的外在形态特征, 观赏价值较高, 也用于传统的形态学鉴定, 但其科研价值相对较低, 样本易腐易变质。“湿”即浸制标本, 通常采用甲醛对整条鱼进行固定, 然后浸泡于含有添加剂、保护剂的 70% 乙醇溶液中保存^[21]。浸制标本能完整保存个体的所有组织和器官, 形态保存效果较好, 能有效减缓标本变质速度, 但对颜色的保护效果不理想, 样本也会发生部分降解。

组织。鱼类组织保存方法常见的有三种, 分别为浸泡法、石蜡切片法和冷冻保存法。浸泡法同浸制标本制作方法类似, 用甲醛固定后长期保存于乙醇溶液中。石蜡切片法是将组织切成薄片, 经固定、包埋、染色、复染、封固等步骤制成玻璃装片^[22], 常用于正常或病理结构的局部组织显微观察。冷冻保存法是将组织样本直接浸泡于液氮, 或冷冻在 -80°C 的超低温冰箱中, 该法能有效防止 DNA、RNA 的降解, 从而确保从冷冻样品中提取出高质量的核酸, 是后基因组时代公认的高质量样品保存方法。

细胞系。自 1962 年世界上第一株鱼类细胞系 (虹鳟细胞系 RTG2) 建立以来^[23], 已有 280 余株不同的鱼类细胞系相继被建立^[24], 并被广泛应用于鱼类病毒的分离鉴定、病毒与宿主细胞的相互作用机理等研究, 在生理学、病毒学、肿瘤及基因工程等多个领

域发挥重要作用。细胞系可通过不断传代进行保存,但更多的是通过加入保护剂,装入冻存管,放入液氮中冻存起来。

配子及胚胎。另一类极其重要且急需保存的细胞是配子细胞及胚胎,它们对鱼类遗传育种研究、养殖、种质资源保护有重大意义。鱼类精子冷冻保存技术已相对成熟,多数文献记载的冷冻鱼类精子复苏后受精率为65%~85%^[25-27],有的则更高,如复苏后的马苏大麻哈鱼精子受精率最高可达94.5%~96.2%^[28],也有的相对较低,如非洲鲇则低至36%^[29]。鱼卵和胚胎由于体积大(直径1~6 mm)、含水量多、卵膜通透性差、卵黄含量高等,其冻存、复苏后的存活率较低,一直是科学家需要克服的瓶颈。有研究显示,鲤科鱼类胚胎低温保存在-100℃可获得10%左右的成活率^[30],2010年挪威Cryogenetics公司成功开发出鱼卵冷冻在-130℃的保存方法,为鱼类卵细胞和胚胎冷冻保存提供了新的途径^[31]。

生命大分子物质及小分子代谢物。随着基因组学、蛋白质组学、代谢组学的发展,核酸、蛋白质及小分子代谢物等越来越受到种质资源保护者的重视。核酸和蛋白质的保存技术已经相当成熟,可在-80℃冰箱中长期稳定保存,一些常温保存试剂如RNAlater^[32, 33]、GenTegra^[34]等在很大程度上减缓了RNA在长途运输和转移时的降解速度,为保存高质量的样本提供保障。目前,小分子代谢物的保存在人类样本库中十分常见^[35, 36],但在鱼类中暂未得到广泛应用。

2 鱼类种质资源现状

鱼类种质资源是全球生物资源的重要组成部分。根据Joseph S. Nelson于2006年编写的第四版*Fishes of the world*一书的报道,保守估计,全世界共有鱼类27 977种,占脊椎动物种数(54 711种)的一半以上^[37]。近年来,随着物种鉴定技术和深海探测技术的发展,这一数目仍在不断增加,截至目前(2015年7月),FishBase上记载的鱼类共33 100种,相比于2006年的统计数据增长了5123种,增长率为18.3%。

鱼类无论其规格、数目还是生物学特性、栖息环境等都表现出十分丰富的多样性。从成鱼体长仅8~10 mm的鰕虎鱼到体长15 m的鲸鲨,从细长圆滑如蛇的鳗鲡到扁平浑圆如盘的珍珠缸,从通体透明的银鱼到色彩斑斓的盘丽鱼,鱼类形态结构多种多样。鱼类的栖息环境也不尽相同,从淡水到海水,从南极冰盖下接近冰点的水层到近乎沸腾的温泉,从水域的表层到压力达1000 atm^①的10 000 m以上的大洋深处,都有鱼类活动的身影。鱼类是最古老、数量最大、最为多样的类群,其总数超过了其他脊椎动物的总和,是生物从无脊椎到有脊椎的重要过渡形态,是脊椎动物起源和进化的重要类群^[38-40]。但是,除了群体间的竞争外,外部环境因素及人为干扰的不断增加,使得鱼类种群多样性逐年降低,鱼类种质资源受到严重威胁。例如,长江过去被人们誉为我国淡水渔业种质资源库,该水域自然分布着26种淡水养殖对象,其中“四大家鱼”被公认为是我国所有水系中最优的,人工养殖鱼苗、繁殖所用亲鱼都取自长江,其他珍贵

① 1 atm=1.013 25×10⁵ Pa

鱼类如鳊、长吻鮠、南方鲇、胭脂鱼等都是近 20 年以来开发养殖的新品种。而黄颡鱼、中华倒刺鲃、岩原鲤、黑尾近红鲌等是近 10 年开发的养殖品种^[41]。20 世纪 60 年代, 长江干流“四大家鱼”鱼苗径流量在 1000 亿尾左右, 位于宜昌江段的产卵场是长江所有 36 个产卵场中最大的一个, 产卵规模占整个长江水域的 5%~7%, 而如今, 整个宜昌产卵场的产卵规模只有数千万粒^[42]。造成长江流域种质资源减少和衰退的原因多种多样, 主要归结为以下几个方面: ①栖息地被大量占用; ②水域生态环境持续恶化; ③涉水工程大量兴建; ④持续高强度渔业捕捞; ⑤外来物种入侵加剧; ⑥自身遗传多样性水平降低。

这些最终导致鱼类种质资源减少和衰退的因素大部分都是可控的, 或者可以通过人为挽救来改善种质资源群落结构及种群资源量。但其遗传多样性的变化, 相对于其他影响因素来说, 可调控性较低, 不确定性较强, 对种质资源的潜在危害较大。鱼类的遗传性-表型关系不同于哺乳类、鸟类等陆生型动物, 其具有较高的表型变异能力, 但其遗传能力很低, 因而测定鱼类遗传多样性的变化及原因比温血动物更难。在自然界, 鱼类天然杂交现象要比其他动物多得多, 尤其是硬骨鱼类, 具有非常强的杂交能力, 这使得鱼类种质资源问题更加复杂。除此之外, 近亲交配对于种质资源的遗传群体存在重大影响。20 世纪七八十年代, 我国杂交鲤一代利用曾风靡一时, 先后有 6 个杂交组合在生产上广泛应用。可是, 大量杂交鲤进入天然水体后, 给我国野生鲤种质资源带来了无法弥补的混乱和损害。因此, 鱼类种质资源的保护对于其开发、利用具有极其重要的战略意义。

3 种质资源的保护

随着我国渔业生态环境脆弱化、鱼类种群结构简单化、经济物种单一化等导致的渔业资源衰退和种质资源减少的趋势逐渐加剧, 保护种质资源显得异常迫切, 挽救鱼类种质资源刻不容缓。

(1) 加强渔政管理。健全渔政管理机构 and 执法队伍建设, 完善禁渔制度建设, 规范渔政执法行为, 加强渔政执法力度。同时, 在群众中大力开展渔业相关法律、法规的学习和宣传工作, 增强广大人民群众对生态环境、野生水生动植物的保护意识, 防止周边环境污染给当地鱼类造成灭绝性危害。

(2) 加强保护区及人工救护站建设。尽快查清相关水域生态现状和土著鱼类资源现状, 确定急需保护鱼类的种类和分布范围, 加快鱼类种质资源保护区及必要的人工救护站建设。

具体保护措施如下。

1) 就地保护

就地保护是指在生物繁殖、生长、进化的原栖息地, 通过对生态系统和栖息环境的保护来保护生物群体, 乃至群落。这是一种在群落水平上的遗传保护, 是一种动态型的保护。在生物的天然资源尚未遭到严重破坏, 其种群大小还能够维持其在自然界繁衍,