

中国大鲵幼体的性别分子鉴定与性腺形态

龙群妹^{①②③} 唐志哲^④ 唐家兴^{②⑤} 张海成^⑥ 罗庆华^{①③*} 王杰^{②*}

① 吉首大学生物资源与环境科学学院, 大鲵资源保护与综合利用湖南省工程实验室 吉首 416000;

② 中国科学院成都生物研究所 成都 610299; ③ 长沙学院生物与化学工程学院 长沙 410022;

④ 四川省成都市玉林中学 成都 610041; ⑤ 四川师范大学生命科学学院 成都 610101;

⑥ 陕西汉中多成大鲵开发有限公司 略阳 724305

摘要: 为探明中国大鲵 (*Andrias davidianus*) 雌雄幼体的性腺发育特征, 确定适合的性别分子鉴定方法, 对 15 尾 5 月龄和 17 尾 17 月龄养殖个体进行形态测量、解剖观察、性腺组织切片及 PCR 扩增雌性特异 DNA 片段。结果发现, 引物 adf225 和 adf340 的扩增效果好, 判定 5 月龄个体 8 雌 7 雄; 17 月龄个体 8 雌 9 雄, 与依据性腺形态结构区分的结果一致。体视显微镜下 5 月龄幼体中肾腹侧有两条半透明细条状的原始生殖嵴; 组织切片显示生殖细胞形态分化不明显。17 月龄卵巢波浪状弯曲, 有颗粒感, 精巢呈光滑的白条状, 形态分化明显; 组织切片显示, 卵巢分化出体积较大的卵母细胞, 同时保留原始卵泡, 精巢分化出生精小叶和精原细胞、支持细胞。外形测量显示, 5 月龄与 17 月龄性二型不明显, 不能根据外形判断性别。本研究确定了大鲵幼体性别分子鉴定的最佳引物, 可用于养殖过程中雌雄选配, 以节约资源。

关键词: 中国大鲵; 幼体; 性腺; 分子鉴定; 解剖学实验

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2024) 02-217-08

Molecular Sex Identification and Gonadal Morphology of *Andrias davidianus* Juveniles

LONG Qun-Mei^{①②③} TANG Zhi-Zhe^④ TANG Jia-Xing^{②⑤} ZHANG Hai-Cheng^⑥
LUO Qing-Hua^{①③*} WANG Jie^{②*}

① College of Biology and Environmental Sciences, Hunan Engineering Laboratory for Chinese Giant Salamander's Resource Protection and Comprehensive Utilization, Jishou University, Jishou 416000; ② Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610299; ③ Changsha College of Biological and Chemical Engineering, Changsha 410022;

④ Yulin Middle School in Chengdu, Chengdu 610041; ⑤ College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101;

⑥ Shaanxi Hanzhong Duocheng Salamander Development Co., Ltd, Lueyang 724305, China

Abstract: [Objectives] The Chinese Giant Salamander *Andrias davidianus* is the largest amphibian on earth.

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32170435, 32060238, E1J1040001);

* 通讯作者, E-mail: lqh700930@126.com, wangjie@cib.ac.cn;

第一作者介绍 龙群妹, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生态学; E-mail: lqm_162@163.com。

收稿日期: 2023-07-31, 修回日期: 2023-11-27 DOI: 10.13859/j.cjz.202423155

Although its captive population has exceeded 10 million individuals, it is listed as Critically Endangered on *The IUCN Red List of Threatened Species*. Sexual identification of giant salamanders has long been challenging, although it is crucial to captive breeding and conservation. Consequently, the development of molecular markers targeting female-specific DNA fragments could offer a dependable method for distinguishing between males and females. **[Methods]** In this study, 15 5-month-old and 17 17-month-old individuals from an artificial breeding farm in Hanzhong, Shaanxi were randomly selected and dissected. The gonad was utilized for tissue section and Hematoxylin and Eosin staining. DNA was extracted from each individual and the female-specific DNA fragments were amplified using four pairs of primers. **[Results]** The primers adf225 and adf340 yielded the best amplification results, which were consistent with the morphological analysis of gonads (Fig. 1). In both male and female 5-month-old juveniles, the gonads were undifferentiated, appearing as slender, semi-transparent stripes (Fig. 2a, b). In contrast, 17-month-old juveniles displayed obvious differentiation in gonads, with granular ovaries or smooth, and white testes (Fig. 2c, d). Tissue section analysis revealed no significant morphological differences in germ cells between male and female 5-month-old individuals (Fig. 3a, b). However, in the 17-month-old individuals, ovarian cells had differentiated into larger oocytes, while still maintaining the primordial follicles (Fig. 3c). Additionally, sperm nests of testes had differentiated into spermatogonia lobules composed of spermatogonia and sertoli cells (Fig. 3d). Interestingly, there were no visible morphological differences between male and female 5-month-old or 17-month-old juveniles, indicating that external morphology alone is insufficient for sex determination (Fig. 4). **[Conclusion]** This study successfully identified molecular primers that are highly effective in determining the gender of juveniles. This significant finding provides a practical solution to the challenges posed by sex allocation and holds promising implications for the conservation and management of this species.

Key words: Chinese Giant Salamander, *Andrias davidianus*; Juvenile; Gonads; Molecular identification; Anatomical experiments

中国大鲵 (*Andrias davidianus*) 是现存最大的有尾两栖动物, 性状独特、进化历史悠久且处于淡水生态系统食物链顶级, 具有重要的生态与科研价值; 其营养与药用价值高, 也是重要的经济动物。大鲵曾广布于我国华中、华南及华北 18 个省、直辖市、自治区的山涧溪流, 然而, 过去半个世纪的盗猎收购与栖息地退化和破坏, 使其野生资源锐减 (刘国钧 1989, 章克家等 2002, Turvey et al. 2018)。1988 年大鲵被列为国家二级重点保护野生动物, 2004 年被中国生物多样性红色名录和世界自然联盟 (IUCN) 列为极危级物种。2021 年, 《国家重点保护野生动物名录》修改, 仅大鲵野外种群为国家二级重点保护野生动物, 人工养殖大鲵可以合法利用。

阳爱生等 (1981) 依据细胞形态学特征, 对大鲵性腺发育的时相进行了划分。张育辉等 (1999) 与罗亚平等 (2003) 结合光学显微镜和电镜结果分析了成年大鲵卵子与精子不同月份的发育情况。艾为明等 (2006) 在人工养殖的 3 龄大鲵性腺中观察到数个不同发育阶段的性腺细胞, 推测大鲵的性腺发育不同步, 据此提出定向培育以使其每年多次产卵和排精。实际上大鲵每年仅产卵一次, 卵子在水中同步受精 (梁刚等 2010, Luo et al. 2018)。郭利伟等 (2013) 应用组织切片技术发现大鲵幼体出膜 28~49 d 出现原始生殖腺, 175 d 分化出原始卵泡, 但 259~343 d 才分化出生精小叶。然而, Hu 等 (2019a) 认为大鲵性腺分化的起始时间为出膜 98 d 左右。

截至 2014 年底, 全国有 2 622 家大鲵养殖场, 1 249 万尾养殖个体(全国水生野生动物保护分会 2015)。虽然人工养殖规模庞大, 但大鲵的性别鉴定一直是公认的难题。通过泄殖孔的形态识别繁殖期成熟个体的性别是一个有效办法, 但养殖条件下成熟个体的比例较低, 且非繁殖期雌雄泄殖孔形态差异不明显, 因此这种方法的应用受到较大的限制。欧东升等(2007)提出依据外观进行性别鉴定: 头部大、头宽大于体宽的是雄性; 反相, 头宽明显小于体宽的是雌性。然而, 体宽不是一个可以准确测量的指标, 会随着动物的运动形态、营养状况发生较大的变化。还有学者提出利用 B 超或激素检测等方法鉴定性别(Li et al. 2010, 汤亚斌等 2012), 但这些方法不适合幼体, 对动物易造成伤害, 且操作不便。

大鲵的性别通常为基因决定型, 即雄性性染色体同型(ZZ)、雌性性染色体异型(ZW, Hime et al. 2019)。水温和环境激素能影响大鲵的性比: 高水温(28 °C)条件下, 幼体性腺雄性化的比例高(66%); 在 17- α 雌二醇作用下, 幼体性腺雌性化的比例超过 81% (Hu et al. 2019a)。目前已经开发出一些分子标记, 希望通过检测雌性特有 DNA 片段的有无来识别性别, 但只在部分养殖场进行了测试(曲彬 2015, Hu et al. 2019b)。

大鲵遗传多样性丰富, 不同地理种群存在明显的遗传背景差异(Wang et al. 2017, Yan et al. 2018, Liang et al. 2019), 最近从中国大鲵中识别出 3 个独立的物种, 分别是华南大鲵(*A. sligoi*) (Turvey et al. 2019)、江西大鲵(*A. jiangxiensis*) (Chai et al. 2022) 和祁门大鲵(*A. cheni*) (龚宴安等 2023)。亲本培育是大鲵养殖的关键, 如何区分性别并开展针对性的培养, 以及合理的性别配比是大鲵繁育的核心问题, 因此有必要对更多的群体及幼体开展性别的分子鉴定研究。研发分子手段准确鉴定幼体的性别, 能为大鲵的人工繁育、科学的研究和资源保护提供强有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验材料为原生态人工养殖子二代大鲵。获得中国科学院成都生物研究所实验动物伦理委员会同意后, 在具备驯养繁殖许可证的陕西汉中养殖场选取健康、体型大小一致的幼体, 其中 5 月龄 15 尾, 17 月龄 17 尾, 运送到实验室后分开单独饲养, 每天晚上给 5 月龄个体喂食红虫, 给 17 月龄个体喂食剪碎的新鲜鸭肝。正常喂养两周后, 于 2023 年 4 月进行解剖实验。

1.2 性别的分子鉴定

通过非损伤方法(拣取皮肤脱落物)取样(王金秀等 2022), 用 FastPure 血液/组织 DNA 提取试剂盒(Vazyme Biotech Co., Ltd.)提取 DNA, 用 Hu 等(2019b)设计的 4 组引物扩增雌性特有 DNA 片段(表 1)。反应体系 15 μ l, 包含 2 \times Rapid *Taq* Master Mix 7.5 μ l (Vazyme Biotech Co., Ltd.), 10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ l, DNA 模板 1 μ l (10 mg/L), 超纯水 4.5 μ l。扩增后取 3 μ l 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳。在凝胶成像仪 (JS-680D, 上海培清科技有限公司) 内观察, 若有目标条带, 则为雌性个体, 若无, 则为雄性个体。

1.3 形态测量、性腺解剖和组织切片制备

首先用 MS-222 (0.6 g/L) 麻醉动物, 称量体重后依据费梁等(2005)的方法用直尺(得力集团有限公司 No.8463, 量程 0~30 cm, 精确到 0.1 cm) 测量全长、头体长及头长等 10 个性状指标。然后, 从泄殖孔沿腹中线剖开体腔, 在莱卡 DFC450C 体视解剖镜下剥离中肾, 使用 A6400 索尼相机拍摄性腺形态。

剪取 17 月龄性腺组织和 5 月龄细线状的原始生殖嵴, 在 4% 多聚甲醛中固定 24 h。再用不同浓度的酒精梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 连续切片 3 张(厚 4 μ m); 苏木精-伊红染色后用 B302 奥特光学显微镜观察。

2 结果

2.1 性别分子鉴定引物扩增效果的比较

分子鉴定结果显示, 5月龄幼体8雌7雄, 17月龄幼体8雌9雄。其中, 17月龄分子鉴定结果与性腺的形态特征一致。引物adf225和adf340的效果最好, 两者的扩增结果与形态判定结果一致; 而另两对引物adf318和adf431

出现杂带, 并且雌雄个体的条带非常相似, 因此不能区分性别(图1)。

2.2 雌雄性腺形态的比较

5月龄雌雄幼体在体视镜下都观察到2条原始生殖腺, 形态相似, 为半透明细线状, 沿中肾腹侧的中部前后行走, 但主要位于中肾的前半部(图2a, b)。17月龄雌性幼体在体视镜下可观察到两条明显的淡黄色卵巢, 呈扁平波

表1 中国大鲵性别分子鉴定引物(扩增雌性特有片段)(引自 Hu et al. 2019b)

Table 1 Primers to amplify the female-specific DNA fragments of giant salamanders (from Hu et al. 2019b)

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物长度 Product size (bp)
adf318a	TATGTCAGGGTGATCAAACCTTCA	60	266
adf318s	CTAGAACGACGTGGTGGCCATG		
adf225a	CCATGCCCTGTACATTGCG	60	162
adf225s	CCGTGAACATGGAGGGTTT		
adf340a	GGTTTAGGGCGGCTCTGATT	60	251
adf340s	TTAACGGCCCTAACACCCAGG		
adf431a	TCCAGAATGAAGTCCTGGCCT	60	178
adf431s	CGAGCCTCCATTGTGCCTT		

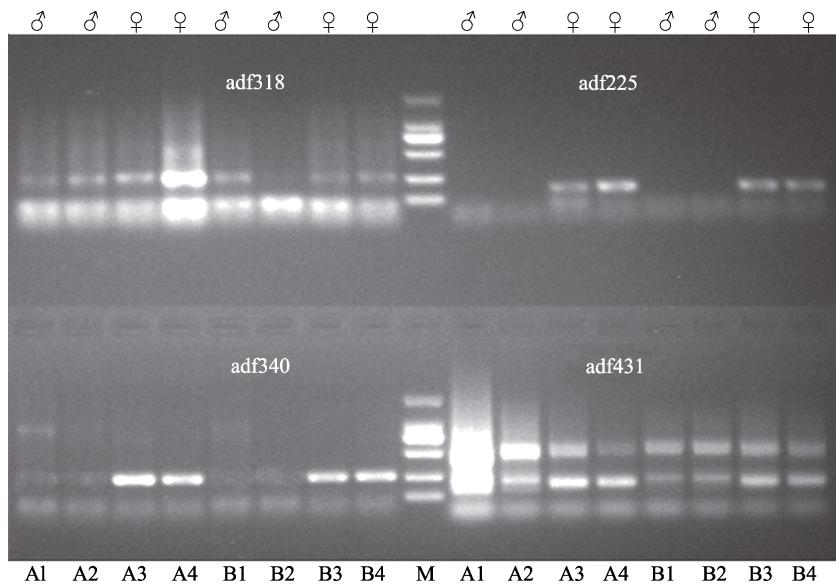


图1 4种性别分子鉴定引物的扩增效果比较

Fig. 1 Amplification of four primers that target female-specific DNA fragments

M. DNA分子量标准, 从上至下分别为2 000、1 000、750、500、250、100 bp; 编号以A开头为5月龄个体, 以B开头为17月龄个体。

A1、A2、B1、B2为雄性(♂); A3、A4、B3、B4为雌性(♀)。

M. DNA marker, showing lengths of 2 000, 1 000, 750, 500, 250 and 100 bp from up to down. The individuals with code A were 5 months old, whereas B were 17 months old after hatching. A1, A2, B1, and B2 were males (♂); A3, A4, B3 and B4 were females (♀).

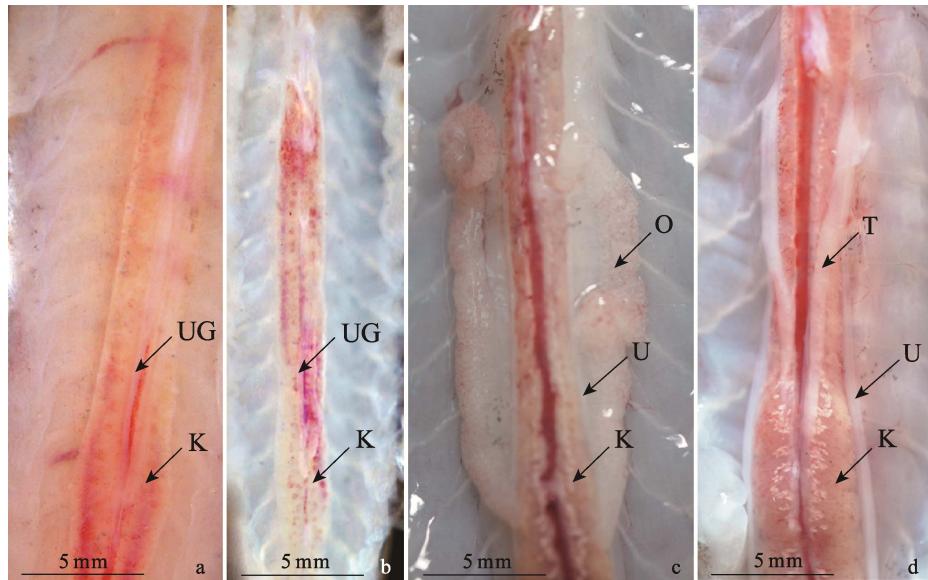


图 2 中国大鲵 5 月龄和 17 月龄幼体雌雄性腺的形态

Fig. 2 Gonadal morphology of female and male *Andrias davidianus* juveniles aged 5 months or 17 months

a. 5 月龄雌性; b. 5 月龄雄性; c. 17 月龄雌性; d. 17 月龄雄性。K. 肾; O. 卵巢; T. 精巢; U. 输尿管; UG. 未分化的性腺

a. 5-month-old females; b. 5-month-old males; c. 17-month-old females; d. 17-month-old males. K. Kidney; O. Ovary; T. Testis; U. Ureter; UG. Undifferentiated gonad

浪状弯曲, 对称分布于肾腹侧, 通过系膜连接于肾表面(图 2c)。卵巢表面不光滑, 有颗粒感, 上面分布的许多小颗粒为卵泡。雄性的精巢左右对称, 呈乳白色圆滑的长条状, 两端稍细, 中间稍粗(图 2d)。

2.3 性腺的组织切片观察

5 月龄大鲵雌雄幼体生殖腺的外形极为相似, 组织切片显示生殖腺的分化不明显, 可看到体积较大的圆形生殖细胞, 周围分布着深色扁平状体细胞(图 3a, b)。17 月龄大鲵卵巢横截面长椭圆形, 边缘为长条状体细胞, 排列紧密, 中间为大小不一的卵泡, 中央的卵母细胞较大, 细胞质丰富、分布均匀且嗜酸性, 卵泡与体细胞之间还分布不少原始卵泡(图 3c)。精巢截面近椭圆形, 被疏松的结缔组织分隔为若干个腔隙明显的生精小叶, 小叶内可见较大的精原细胞和少量的支持细胞, 精原细胞呈圆形, 细胞核大而圆, 染色质多呈颗粒状分散; 支持细胞长梭形, 细胞核为杆状, 强嗜碱性,

染色深且均匀(图 3d)。

2.4 大鲵的形态特征

形态测量显示, 17 月龄个体的 11 项身体形态指标都显著大于 5 月龄(图 4); 并且各形态指标的个体差异比 5 月龄个体大, 但同龄雌雄个体间各指标的差异不明显。

3 讨论

3.1 性别分子鉴定引物的设计

Hu 等(2019b)设计的性别鉴定引物 *adf225* 和 *adf340* 均能扩增出理想的效果, 而 *adf318* 和 *adf431* 扩增的效果差, 有杂带, 且雌雄条带相似, 不能得出正确的结论。Hu 等(2019b)实验的大鲵来自浙江和山东, 而本实验的大鲵来自陕西汉中。过去全国各地的大鲵被认为是一个种, 实际上属于不同的遗传支系(Wang et al. 2017, Yan et al. 2018, Liang et al. 2019), 甚至属于不同的物种(Turvey et al. 2019, Chai et al. 2022, 龚宴安等 2023), 因此在引物结合

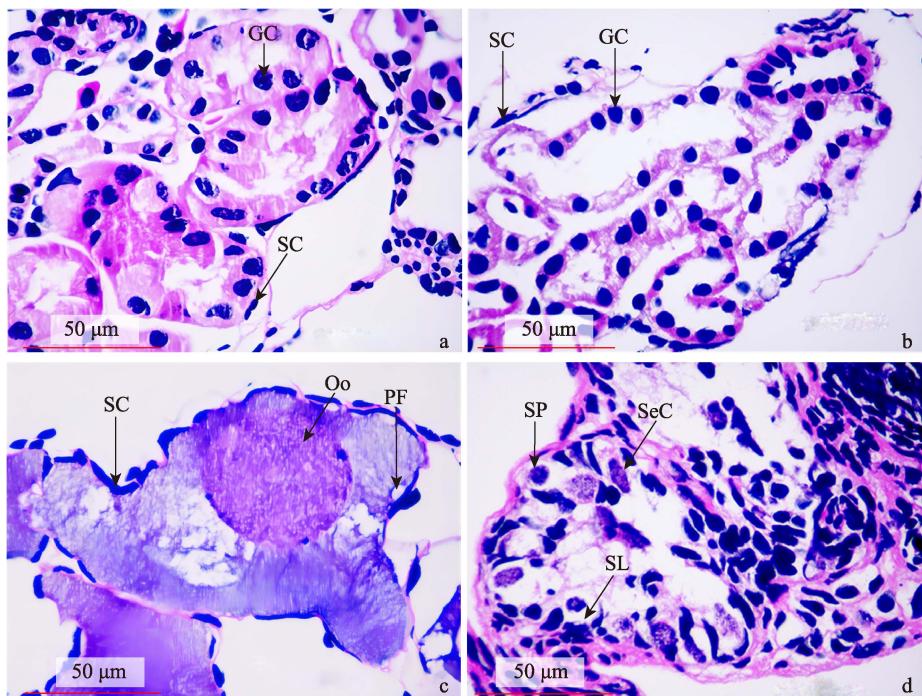


图 3 中国大鲵 5 月龄和 17 月龄雌雄幼体生殖腺切片 (H.E 染色, 40 ×)

Fig. 3 Schematic diagram of gonad tissue sections of female and male *Andrias davidianus* juveniles aged 5 months or 17 months (H.E staining, 40 ×)

a. 5 月龄雌性; b. 5 月龄雄性; c. 17 月龄雌性; d. 17 月龄雄性。GC. 生殖细胞; Oo. 卵母细胞; PF. 原始卵泡; SC. 体细胞; SeC. 支持细胞; SL. 生精小叶; SP. 精原细胞

a. 5-month-old females; b. 5-month-old males; c. 17-month-old females; d. 17-month-old males. GC. Germ cell; Oo. Oocyte; PF. Primordial follicle; SC. Somatic cell; SeC. Sertoli cell; SL. Seminiferous lobule; SP. Spermatogonia

的位置上存在突变, 可能是实验结果差异的原
因之一。鉴定雌性特有片段的引物只能结合到
雌性的 W 染色体上, 不能结合到常染色体和 Z
染色体上。目前不能确定 *adf318* 和 *adf431* 是
否存在于 W 染色体上, 需等待大鲵基因组解析
后确定。最理想的性别鉴定引物应能同时结合
到 Z 和 W 性染色体上, 但扩增片段的长短不
一样。如没有任何目标片段, 则表明所使用的
模板质量不佳或实验操作不当, 可直接排除假
阳性或假阴性的情况 (王杰等 2011)。

3.2 大鲵形态的差异

大鲵的体重、全长等形态指标随年龄增长
而增加, 但个体之间的指标差异变大。养殖大
鲵的生长受到水温、饵料和遗传因素的影响(王

启军等 2012), 一般水温越高, 生长速度越快
(邓捷等 2016)。本研究显示, 相同发育阶段
的大鲵雌雄幼体在体重、全长、头体长等 11
项形态指标方面差异不明显, 与葛荫榕等
(1994) 通过外形无法判断大鲵雌雄个体的结
论一致。

3.3 大鲵的性别分化

两栖动物性别分化过程复杂, 不但受遗传
因素的调控, 还受到温度和性激素等环境因素
的影响 (Eggert 2004, Tompsett et al. 2013)。
大鲵幼体在正常水温 (18 ~ 25 °C) 下, 性比保
持平衡, 水温升至 28 ~ 31 °C 或降至 8 ~ 16 °C,
将出现幼体性比偏雄或偏雌 (杨干荣等 1990,
Hu et al. 2019b)。但这种温度影响性腺分化的

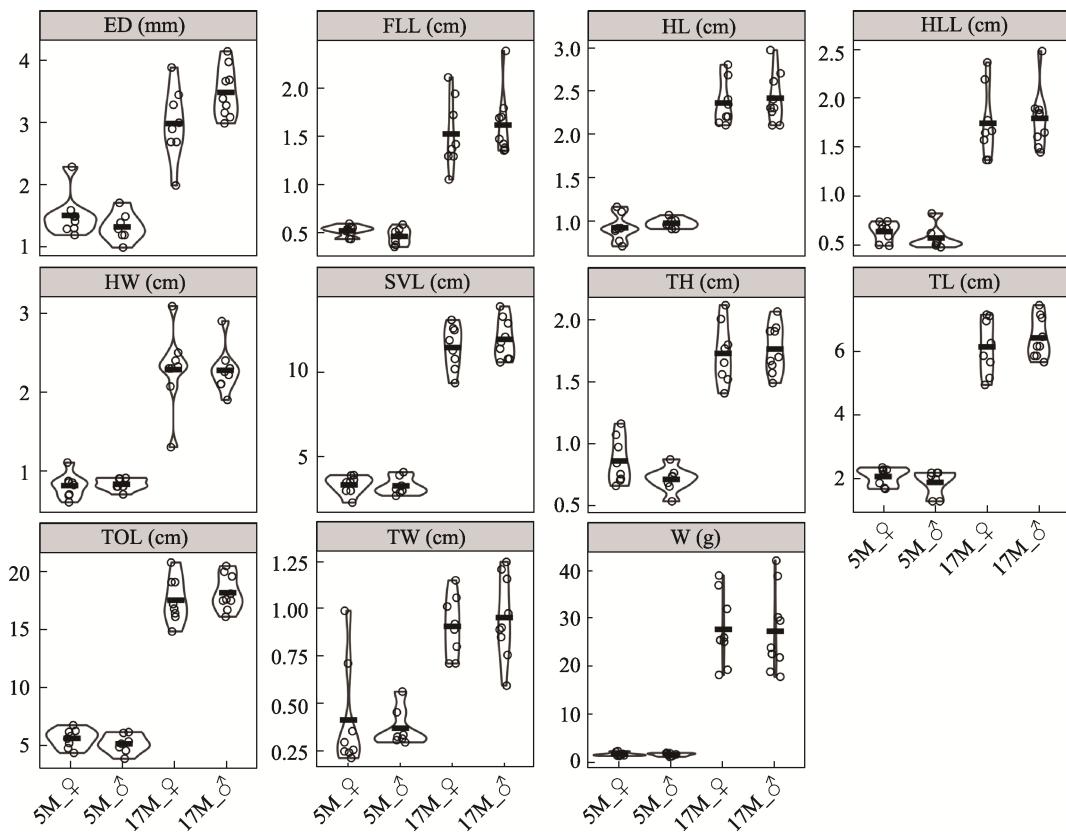


图4 中国大鲵5月龄(5M)和17月龄(17M)雌(♀)雄(♂)幼体的形态指标

Fig. 4 Morphological measurements of female (♀) and male (♂) *Andrias davidianus* juveniles aged 5 months (5M) or 17 months (17M)

ED. 眼径; FLL. 前肢长; HL. 头长; HLL. 后肢长; HW. 头宽; SVL. 头体长; TH. 尾高; TL. 尾长; TOL. 全长; TW. 尾宽; W. 体重
 ED. Diameter of eye; FLL. Length of foreleg; HL. Head length; HLL. Length of hind leg; HW. Head width; SVL. Snout-vent length; TH. Tail height; TL. Tail length; TOL. Total length; TW. Tail width; W. Weight

趋势并不绝对, 存在物种间差异。Sakata等(2005)对滞育小鲵(*Hynobius retardatus*)的研究发现, 水温升至28℃时反而促使性腺雌性化。郭利伟等(2013)发现大鲵出膜28~49 d出现原始生殖腺, 且雌性的分化时间早于雄性。但Hu等(2019a)认为大鲵性腺分化的起始时间为出膜98 d左右。本研究随机选取的大鲵雌雄性比基本平衡, 养殖温度控制在19℃左右, 水温较低, 可能导致其性腺分化的时间较晚, 因此出膜5月还观察不到明显的性腺分化。

致谢 感谢张美华、霍佳鑫、贺佳璐、高文杰、杨涵等在样品制备和分子实验中的帮助。

参 考 文 献

- Chai J, Lu C Q, Yi M R, et al. 2022. Discovery of a wild, genetically pure Chinese Giant Salamander creates new conservation opportunities. *Zoological Research*, 43(3): 469–480.
- Eggert C. 2004. Sex determination: the amphibian models. *Reproduction Nutrition Development*, 44(6): 539–549.
- Hime P M, Briggler J T, Reece J S, et al. 2019. Genomic data reveal conserved female heterogamety in giant salamanders with gigantic nuclear genomes. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 9(10): 3467–3476.
- Hu Q, Chang C, Wang Q, et al. 2019b. Genome-wide RAD

- sequencing to identify a sex-specific marker in Chinese Giant Salamander *Andrias davidianus*. *BMC Genomics*, 20(1): 415.
- Hu Q, Tian H, Xiao H. 2019a. Effects of temperature and sex steroids on sex ratio, growth, and growth-related gene expression in the Chinese giant salamander *Andrias davidianus*. *Aquatic Biology*, 28: 79–90.
- Li P Q, Zhu B C, Wang Y F, et al. 2010. Sex identification of Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*) by Doppler B-ultrasound. *Journal of Biology*, 27(1): 94–96.
- Liang Z Q, Chen W T, Wang D Q, et al. 2019. Phylogeographic patterns and conservation implications of the endangered Chinese Giant Salamander. *Ecology and Evolution*, 9(7): 3879–3890.
- Luo Q H, Tong F, Song Y J, et al. 2018. Observation of the breeding behavior of the Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*) using a digital monitoring system. *Animals*, 8(10): 161.
- Sakata N, Tamori Y, Wakahara M. 2005. P450 aromatase expression in the temperature-sensitive sexual differentiation of salamander (*Hynobius retardatus*) gonads. *The International Journal of Developmental Biology*, 49(4): 417–425.
- Tompsett A R, Wiseman S, Higley E, et al. 2013. Effects of exposure to 17 α -ethynodiol during larval development on growth, sexual differentiation, and abundances of transcripts in the liver of the Wood Frog (*Lithobates sylvaticus*). *Aquatic Toxicology*, 126: 42–51.
- Turvey S T, Chen S, Tapley B, et al. 2018. Imminent extinction in the wild of the world's largest amphibian. *Current Biology*, 28(10): R592–R594.
- Turvey S T, Marr M M, Barnes I, et al. 2019. Historical museum collections clarify the evolutionary history of cryptic species radiation in the world's largest amphibians. *Ecology and Evolution*, 9(18): 10070–10084.
- Wang J, Zhang H X, Xie F, et al. 2017. Genetic bottlenecks of the wild Chinese Giant Salamander in Karst caves. *Asian Herpetological Research*, 8(3): 174–183.
- Yan F, Lü J C, Zhang B L, et al. 2018. The Chinese giant salamander exemplifies the hidden extinction of cryptic species. *Current Biology*, 28(10): R590–R592.
- 艾为明, 敖鑫如. 2006. 人工繁殖大鲵性腺组织学观察. *水利渔业*, 27(5): 37–38, 109.
- 邓捷, 王启军, 赵虎, 等. 2016. 池养成年大鲵体重和性别发育与水温的相关性研究. *基因组学与应用生物学*, 35(9): 2342–2346.
- 费梁, 叶昌媛, 江建平, 等. 2005. 中国两栖动物检索及图解. 成都: 四川科学技术出版社, 4–5.
- 葛荫榕, 郑合勋. 1994. 大鲵的自然繁殖周期. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 22(2): 67–70.
- 龚宴安, 许竟成, 黄松, 等. 2023. 中国安徽省祁门县大鲵属一新种(两栖纲: 隐鳃鲵科). *动物学杂志*, 58(5): 651–657.
- 郭利伟, 王中乾, 刘巧巧, 等. 2013. 中国大鲵生殖腺胚胎后发育的形态学观察. *动物学杂志*, 48(3): 457–464.
- 梁刚, 吴峰. 2010. 中国大鲵的活动节律及繁殖行为描述. *动物学杂志*, 45(1): 77–82.
- 刘国钧. 1989. 我国的稀有珍贵动物——大鲵. *动物学杂志*, 24(3): 43–45.
- 罗亚平, 姜国诚, 孙艳香, 等. 2003. 中国雄性大鲵生殖系统的解剖学和组织学研究. *广西师范大学学报: 自然科学版*, 21(2): 83–87.
- 欧东升, 邓智勇. 2007. 如何判断中国大鲵的性别. *内陆水产*, 34(7): 33–34.
- 曲彬. 2015. 中国大鲵性别特异性 DNA 标记的鉴定及雌雄性腺差异表达基因的分析. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文.
- 全国水生野生动物保护分会. 2015. 全国大鲵驯养繁殖和经营利用调查报告. *中国水产*, (3): 23–26.
- 汤亚斌, 马达文, 易翀, 等. 2012. 大鲵亲本性别鉴定的几种方法. *中国水产*, (10): 67.
- 王杰, 杨陈, 朱磊, 等. 2011. 微卫星位点 TUT1 的性别连锁检验. *应用与环境生物学报*, 17(3): 404–406.
- 王金秀, 兰香英, 罗庆华, 等. 2022. 中国大鲵非损害性 DNA 取样及提取方法的比较研究. *动物学杂志*, 57(5): 641–652.
- 王启军, 赵虎, 张红星, 等. 2012. 人工养殖大鲵全长与体重关系的回归分析. *基因组学与应用生物学*, 31(4): 381–384.
- 阳爱生, 卞伟, 刘运清. 1981. 大鲵性腺发育的组织学观察. *动物学报*, 27(3): 240–247.
- 杨干荣, 金立成. 1990. 大鲵(娃娃鱼)性别控制试验初报. *淡水渔业*, 20(2): 9–10.
- 章克家, 王小明, 吴巍, 等. 2002. 大鲵保护生物学及其研究进展. *生物多样性*, 10(3): 291–297.
- 张育辉, 刘全宏, 任耀辉, 等. 1999. 中国大鲵卵母细胞发育的显微和超微结构. *动物学报*, 45(1): 15–22.