

# 多物种养殖鲟鱼早期性别鉴定通用 DNA 分子标记方法的建立及应用

麦浩霆<sup>1,2</sup> 张秀娟<sup>2\*</sup> 吴文化<sup>3</sup> 刘凯伟<sup>1,2</sup> 臧莹安<sup>1\*</sup> 陈金平<sup>2</sup>

1 仲恺农业工程学院动物科技学院 广州 510225; 2 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室 广州 510260; 3 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150076

**摘要:** 鲟鱼 (*Acipenser* spp.) 作为古老的鱼类类群, 在生物进化研究中具有重要意义, 同时也是我国重要的经济养殖鱼类, 其鱼子酱具有极高的经济价值。由于鲟鱼雌雄个体无明显第二性征, 形态学上难以鉴别性别, 因此实现早期精确性别鉴定对养殖业至关重要。本研究开发了一种新的基于鲟鱼雌性特异性表达基因片段 ZXJAscF418 的 DNA 分子标记, 以浙江已知性别鲟鱼样本 110 尾[施氏鲟 (*A. schrenckii*) 20 尾、达氏鲟 (*Huso dauricus*) 20 尾、达氏鲟 (*H. dauricus*) ♀ × 施氏鲟 (*A. schrenckii*) ♂ 杂交子一代 20 尾、俄罗斯鲟 (*A. gueldenstaedtii*) 20 尾、西伯利亚鲟 (*A. baerii*) 10 尾、西伯利亚鲟 (*A. baerii*) ♀ × 施氏鲟 (*A. schrenckii*) ♂ 杂交子一代 10 尾、欧洲鲟 (*H. huso*) 10 尾]和黑龙江未知性别幼龄鲟鱼样本 45 尾[达氏鲟 10 尾、达氏鲟 ♀ × 施氏鲟 ♂ 杂交子一代 10 尾、西伯利亚鲟 4 尾、小体鲟 (*A. ruthenus*) 11 尾、Bester 鲟 (欧洲鲟 ♀ × 小体鲟 ♂) 10 尾]为研究对象, 建立了基于该标记的 PCR 检测方法, 验证了其在多物种养殖鲟鱼中的性别鉴定准确性, 并探究了其在低龄个体中的应用潜力。结果显示, 该 DNA 分子标记的引物 (Asc418F: 5'-CAG AAA CCC AGA TAA CAA GA-3'; Asc418R: 5'-CCA TGA AAA TTT GGG GCC CA-3') 扩增特异性良好, 退火温度 45 ~ 59 °C 均有效; 同时, 具有较高灵敏度, 最低可检测的 DNA 模板浓度达  $6.55 \times 10^{-6}$  mg/L。运用该方法对浙江已知性别施氏鲟、达氏鲟、达氏鲟 ♀ × 施氏鲟 ♂ 杂交子一代和俄罗斯鲟 4 种鲟鱼样本的性别鉴定准确率达 100%; 对黑龙江 5 种未知性别低龄鲟鱼样本的性别预测结果显示, 潜在雌性与雄性比例为 1.25 : 1。本研究为鲟鱼养殖和鱼子酱生产提供了可靠的早期性别鉴定 DNA 分子标记, 有助于提升产业经济效益, 同时也为濒危鲟鱼种群的保护与恢复提供了关键技术支持。

**关键词:** 鲟鱼; 早期性别鉴定; DNA 分子标记

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2026) 01-114-11

## Establishment and application of a DNA molecular marker method for early sex identification of multiple farmed sturgeons

MAI Hao-Ting<sup>1,2</sup> ZHANG Xiu-Juan<sup>2\*</sup> WU Wen-Hua<sup>3</sup> LIU Kai-Wei<sup>1,2</sup> ZANG Ying-An<sup>1\*</sup>

**基金项目** 广东省自然科学基金项目 (No. 2023A1515011429);

\* 通信作者, E-mail: zhangxj67@giz.gd.cn, 1134580900@qq.com;

**第一作者介绍** 麦浩霆, 男, 硕士研究生; 研究方向: 兽医学; E-mail: 2102229328@qq.com.

收稿日期: 2024-12-20, 修回日期: 2025-08-04 DOI: 10.13859/j.cjz.202624291 CSTR: 32109.14.cjz.202624291

CHEN Jin-Ping<sup>2</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225; 2 Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260;

3 Heilongjiang River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150076, China

**Abstract: [Objectives]** Sturgeons are evolutionarily significant and economically important fish in China, particularly valued for caviar production. Due to the lack of distinct secondary sexual characteristics between sexes, sex identification of farmed sturgeons remains challenging with conventional methods. This study aims to develop a minimally invasive DNA-based molecular marker for accurate early sex identification in farmed sturgeons, providing a solution that is minimally invasive, rapid, accurate, species-versatile, and beneficial for both sturgeon aquaculture and conservation efforts. **[Methods]** A total of 155 sturgeon samples were collected from Zhejiang and Heilongjiang provinces. The 110 samples from Zhejiang, with known sex information, served as standard controls, while the 45 samples from Heilongjiang were juvenile sturgeons of unknown sex. DNA was extracted from the dorsal fin tissue via a commercial kit. An ultra-trace nucleic acid protein analyzer was used to measure the DNA purity and concentration. Specific primers (Asc418F/Asc418R) were designed by Primer Premier 5.0 software based on the genome resequencing data from 3-year-old *Acipenser schrenckii*. Temperature gradient PCR (45 ~ 62 °C) was performed to optimize the annealing temperature, and the primer sensitivity was verified via a 10-fold serial dilution of plasmid DNA. **[Results]** The female-specific 418-bp DNA fragment (designated ZXJAscF418) was successfully amplified only in female sturgeon samples. The results demonstrated that the primers for this DNA marker exhibited excellent amplification specificity, with an effective annealing temperature range of 45 ~ 59 °C (Fig. 1). The optimal annealing temperature was 56 °C, as band intensity decreased above 58 °C and became undetectable at 62 °C. The primers exhibited high sensitivity, reliably detecting DNA concentrations as low as  $6.55 \times 10^{-6}$  mg/L, with complete loss of visible bands at a  $10^{-8}$  dilution (Fig. 2). Application of this molecular marker achieved 100% accuracy in sex identification for four sturgeon species (*A. schrenckii*, *Huso dauricus*, *H. dauricus* ♀ × *A. schrenckii* ♂ F1, and *A. gueldenstaedtii*) from Zhejiang (Fig. 3). For the juvenile sturgeons of unknown sexes from Heilongjiang, the method predicted a female-to-male ratio of 1.25 : 1 (Fig. 4). **[Conclusion]** This study developed a DNA-based molecular marker assay for sex identification in farmed sturgeons. The assay demonstrated minimally invasive sampling, operational simplicity, high rapidity, and high accuracy across multiple sturgeon species. This approach enables reliable early sex identification, with significant implications for sturgeon health management, cost saving, and conservation efforts. It may serve as a critical tool for restoring endangered sturgeon populations through artificial breeding.

**Key words:** Sturgeon; Early sex identification; DNA molecular marker

鲟鱼 (*Acipenser* spp.) 是一类古老而独特的鱼类, 自中生代白垩纪时期以来就已存在, 其在漫长的演化过程中积累了丰富的生物进化信息, 常被称为“活化石” (张颖等 2017, 刘

雪等 2024)。作为研究脊椎动物 (尤其是硬骨鱼类) 起源与演化的重要材料, 鲟鱼在地球生物进化史上占据关键地位 (Bemis et al. 1997, Birstein et al. 1997)。然而, 受水利工程建设、

过度捕捞、水污染等人类活动影响，天然水域鲟鱼资源持续衰退 (Zhou et al. 2020)。为应对资源减少的挑战，同时满足市场对高附加值鱼子酱产品的需求 (Tavakoli et al. 2021)，全球鲟鱼养殖产业迅速发展，我国已成为全球重要的鲟鱼养殖产地。

由于鲟鱼个体大、性成熟周期长，且雌雄个体无明显第二性征，形态学上难以区分性别。传统性别鉴定方法如微创手术鉴定法 (Munhofen et al. 2014)、超声鉴定法 (王斌等 2009)、血液生化鉴定 (Zhang et al. 2014) 等虽能提供一定性别信息，但存在显著局限性与潜在伤害。例如，超声波检测虽无创，但其准确性受鱼体大小、性腺发育阶段及操作技术影响；手术探查和穿刺取样会直接损伤鱼体，可能引发感染或死亡，且不适用于大规模养殖操作 (赵峰等 2009)。更重要的是，这些方法需在鲟鱼生长至一定阶段后才能实施，难以满足早期性别鉴定需求。

近年来，基于 DNA 分子标记的鲟鱼性别鉴定研究已有相关报道 (Lopez et al. 2020, Kanefsky et al. 2022, Panagiotopoulou et al. 2023)。例如，有研究将鲟科鱼类的 PCR 基因分型测试扩展到湖鲟 (*A. fulvescens*)，通过对密歇根州黑河种群的研究，利用 AllWSex2 引物进行 PCR 扩增及测序分析，验证了其在湖鲟性别鉴定中的有效性 (Scribner and Kanefsky 2021)；另有研究通过比较斑石鲟 (*Oplegnathus punctatus*) 雌雄基因组，识别出雄性特异性片段插入标记，设计引物并利用 PCR 技术开发了遗传性别鉴定方法 (Li et al. 2020)。尽管部分研究借助高通量测序及 PCR 技术在鲟鱼性别特异性 DNA 序列鉴定方面取得一定进展 (Ruan et al. 2021)，但这些方法在部分物种中无法实现性别鉴定，普适性有待提升，对鲟鱼养殖产业的指导作用有限，仍需进一步完善。

本研究旨在建立一种新型养殖鲟鱼早期性别鉴定 DNA 分子标记，克服现有方法的局限性，实现快速、准确、微创的早期性别鉴定，

为鲟鱼养殖和鱼子酱产业提供技术支持，推动鲟鱼养殖产业健康可持续发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

本研究共采集 155 尾来自浙江和黑龙江地区的鲟鱼样本，涵盖 9 个物种。

**1.1.1 已知性别样本** 在衢州鲟龙科技有限公司采集 110 尾已知性别鲟鱼样本，包括施氏鲟 (*A. schrenckii*)、俄罗斯鲟 (*A. gueldenstaedtii*)、达氏鳇 (*Huso dauricus*) ♀ × 施氏鲟 (*A. schrenckii*) ♂ 杂交子一代 (以下简称 Hd × As 杂交 F1)、达氏鳇 (*H. dauricus*)、西伯利亚鲟 (*A. baerii*)、西伯利亚鲟 (*A. baerii*) ♀ × 施氏鲟 (*A. schrenckii*) ♂ 杂交子一代 (以下简称 Ab × As 杂交 F1) 和欧洲鳇 (*H. huso*) (表 1)，作为性别鉴定的标准对照，用于验证 DNA 分子标记的性别鉴定准确性。采集背部鳍条组织 (约 1 cm × 1 cm)，浸泡于 95% 乙醇中，经液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱，供后续 DNA 提取使用。

**1.1.2 幼龄鲟鱼样本** 在黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站随机采集性别未知的幼龄鲟鱼样本 (5~6 月龄)，包括小体鲟 (*A. ruthenus*)、Hd × As 杂交 F1、达氏鳇、Bester 鲟 (欧洲鳇 ♀ × 小体鲟 ♂) 和西伯利亚鲟 (表 2)，样本采集方法同 1.1.1。

### 1.2 DNA 提取

准备 2 ml 离心管并加入离心珠，在超净台中剪取 1~10 mg 鳍条样品放入管中，加入 500 μl PBS 缓冲液，使用碾磨机 (KZ-III-F, 塞维尔生物科技有限公司) 碾磨至组织充分破碎。采用通用型 DNA 抽提试剂盒 (D3018, 美基生物科技有限公司) 提取 DNA。提取的 DNA 样本用超微量光度计 (nano-800+, 上海嘉鹏技术有限公司，核酸检测量程 2~38 880 mg/L) 测定纯度和浓度，于 -20 °C 保存。

### 1.3 引物设计

前期以 3 龄施氏鲟为研究对象，选取 10

表 1 已知性别鲟鱼样本信息

Table 1 Information of sturgeon samples with known sex information from Zhejiang

物种 Species	性别 Sex	编号 Number	年龄 Age	数量 (ind) Quantity
达氏鲟 <i>Huso dauricus</i>	雌性 Female	AF1 ~ AF10	12	10
	雄性 Male	AM1 ~ AM10	24	10
达氏鲟♀ × 施氏鲟♂杂交子一代 Hybrid species ( <i>H. dauricus</i> ♀ × <i>Acipenser schrenckii</i> ♂) F1	雌性 Female	BF1 ~ BF10	11	10
	雄性 Male	BM1 ~ BM10		10
俄罗斯鲟 <i>A. gueldenstaedtii</i>	雌性 Female	CF1 ~ CF10	10	10
	雄性 Male	CM1 ~ CM10	11	10
施氏鲟 <i>A. schrenckii</i>	雌性 Female	DF1 ~ DF10	9	10
	雄性 Male	DM1 ~ DM10		10
西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	雌性 Female	EF1 ~ EF10	12	10
西伯利亚鲟♀ × 施氏鲟♂杂交子一代 Hybrid species ( <i>A. baerii</i> ♀ × <i>A. schrenckii</i> ♂) F1	雌性 Female	FF1 ~ FF10	7	10
欧洲鲟 <i>H. huso</i>	雌性 Female	GF1 ~ GF10	9	10
共计 Total				110

表 2 幼龄鲟鱼样本信息

Table 2 Sample information of juvenile sturgeons

物种 Species	编号 Number	数量 (ind) Quantity
达氏鲟 <i>Huso dauricus</i>	DSH1 ~ DSH10	10
达氏鲟♀ × 施氏鲟♂杂交子一代 Hybrid species ( <i>H. dauricus</i> ♀ × <i>Acipenser schrenckii</i> ♂) F1	DZ1 ~ DZ10	10
西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	XB1 ~ XB4	4
小体鲟 <i>A. ruthenus</i>	XT1 ~ XT11	11
Bester 鲟 (欧洲鲟♀ × 小体鲟♂) Bester ( <i>H. huso</i> ♀ × <i>A. ruthenus</i> ♂)	Be1 ~ Be10	10
共计 Total		45

尾雌性和 10 尾雄性个体的合格基因组 DNA 样本进行基因组重测序, 以小体鲟为参考基因组, 经 Map 比对发现施氏鲟性别差异短片段 (张秀娟等 2024)。基于此, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 Asc418F (5'-CAG AAA CCC AGA TAA CAA GA-3') 和 Asc418R (5'-CCA TGA AAA TTT GGG GCC CA-3'), 预期 PCR 扩增产物大小为 418 bp, 用于鲟鱼性别鉴定。

## 1.4 引物特异性检验

### 1.4.1 已知性别样本的引物特异性验证 基

于 110 尾已知性别的鲟鱼 DNA 样本, 采用上述引物 Asc418F 和 Asc418R 进行 PCR 扩增。反应体系: 模板 DNA 约 20 ng, PCR 预混反应体系 (TaKaRa Taq 2.0 Plus Dye, 货号: RR901, 宝日医生物技术有限公司) 12.5  $\mu$ l, 上下游引物 (0.4  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ l。扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 雌性样本应出现 418 bp 特异条带, 雄性无扩增条带, 并将扩增产物送天一辉远生物 (广州) 股份有限公司测序, 确认扩增片段正确性。

### 1.4.2 引物最佳退火温度特异性与 DNA 模板灵敏度检测

为确定最佳退火温度并验证检测灵敏度, 采用梯度 PCR 与质粒 DNA 稀释法进行优化。将目标 DNA 片段 (418 bp) 克隆至 pBM23 载体 (广州欣凯莱生物技术有限公司), 转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选阳性克隆并提取质粒核酸 (MagEn 通用型 DNA 抽提试剂盒, D3018)。经超微量光度计 (上海嘉鹏技术有限公司, nano-800+) 测定, 质粒浓度  $A_{260}/A_{280}$  为 1.87, 通过 10 倍系列稀释法构建梯度浓度模

板 (65.472 mg/L 至  $6.547 \times 10^{-6}$  mg/L)。各稀释梯度 DNA 模板按最佳退火温度进行 PCR 扩增, 反应体系与程序同 1.4.1, 扩增产物经电泳检测, 明确引物可稳定扩增的最低 DNA 浓度阈值。基于 Asc418F/Asc418R 引物特性, 设置退火温度梯度范围为 45 °C 至 62 °C (间隔 1 °C) 进行梯度 PCR 扩增, 反应体系同 1.4.1。扩增程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 梯度温度退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 通过条带亮度与特异性筛选最佳退火温度。

### 1.5 幼龄鲟鱼样本的性别检测

基于已验证的引物及优化条件, 对 45 尾性别未知的幼龄鲟鱼样本进行性别鉴定。按 1.2 所述方法提取 DNA 后, 采用 1.4.1 所述体系进行 PCR 扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

## 2 结果

### 2.1 DNA 提取与质量评估

从鲟鱼鳍条组织中提取的基因组 DNA 经纯化后, 紫外分光光度计检测显示  $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.8 ~ 2.1, 符合 PCR 扩增对 DNA 纯度与质量的要求。将样本浓度稀释至 20 mg/L, 用于后续 DNA 扩增实验。

### 2.2 PCR 条件优化及验证

雌性样本可稳定扩增出 418 bp 的雌性特异性条带 (ZXJAscF418), 雄性样本无扩增产物。引物在退火温度 45 °C 至 59 °C 范围内均能有效扩增 (图 1); 退火温度超过 58 °C 时, 条带亮度显著下降, 62 °C 时完全消失, 最终确定 56 °C 为最佳退火温度。灵敏度测试显示, 该方法最低可检测  $6.55 \times 10^{-6}$  mg/L 的 DNA 模板 (图 2)。上述结果表明, 该分子标记兼具高度特异性与灵敏度, 为后续性别鉴定提供了可靠技术支持。

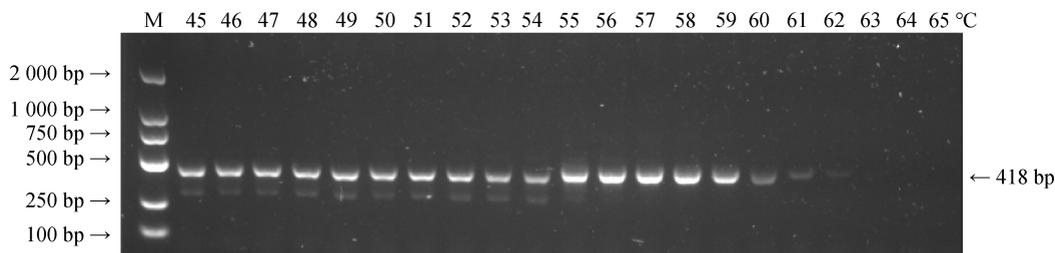


图 1 退火梯度温度 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of PCR amplification with gradient annealing temperatures

M. DL 2 000 DNA 分子量标准。M. DL 2 000 DNA marker.

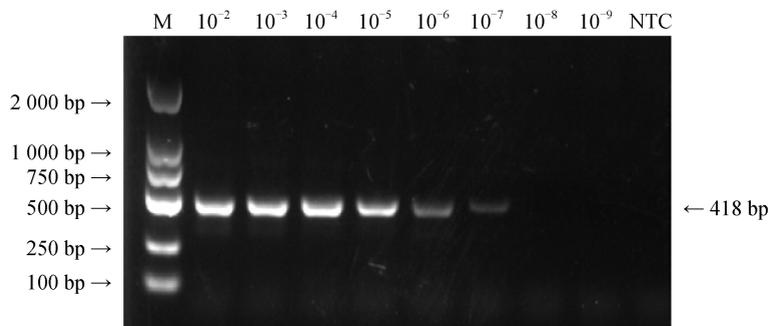


图 2 不同浓度 DNA 的阳性 PCR 扩增结果

Fig. 2 Positive PCR amplification results at different DNA concentrations

M. DL 2 000 DNA 分子量标准; NTC. 无 DNA 模板对照。M. DL 2 000 DNA marker; NTC. No DNA template control.

### 2.3 已知性别样本准确性验证

按照最佳 PCR 反应体系和条件对浙江已知性别鲟鱼样本的合格 DNA 进行 PCR 扩增,

所有雌性鲟鱼 DNA 样本在 418 bp 处均出现扩增特异条带, 雄性鲟鱼无扩增条带 (图 3), 与已知性别信息一致。

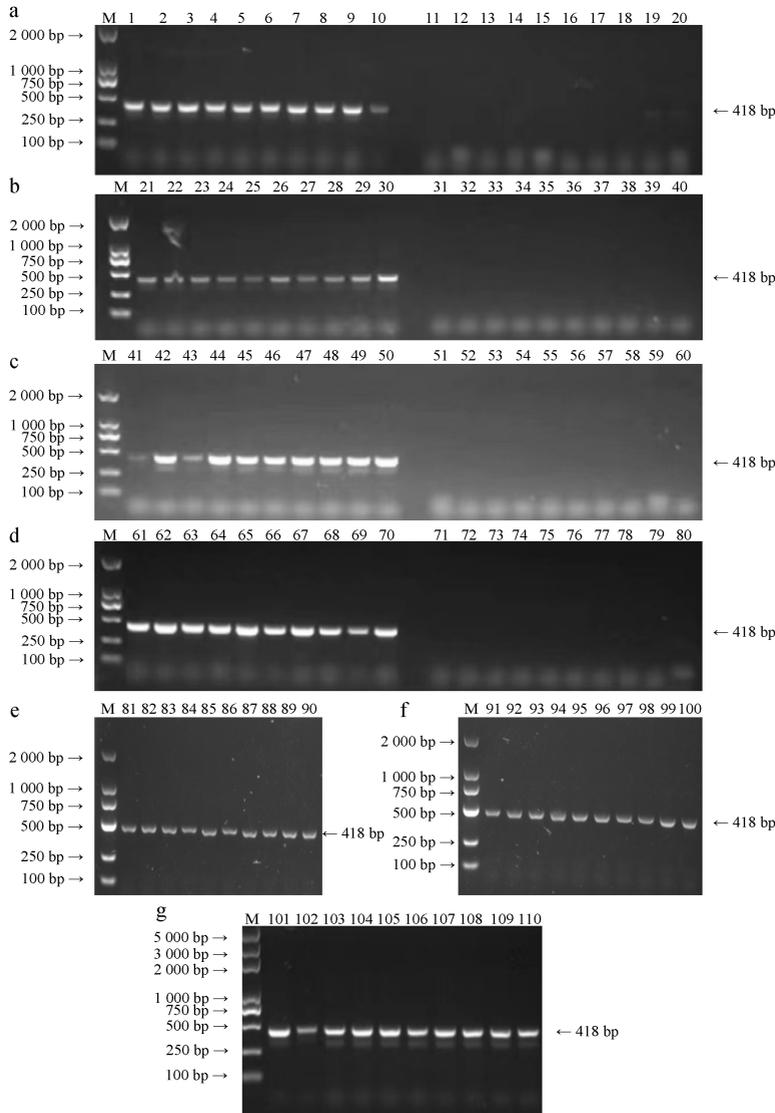


图 3 已知性别鲟鱼样本 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification results of sturgeon samples with known sex information

M 为 DNA 分子量标准 (a~f: DL 2 000; g: DL 5 000); a. 1~10: 达氏鲟雌性 (AF1~AF10), 11~20: 达氏鲟雄性 (AM1~AM10); b. 21~30: 达氏鲟♀×施氏鲟♂杂交子一代雌性 (BF1~BF10), 31~40: 达氏鲟♀×施氏鲟♂杂交子一代雄性 (BM1~BM10); c. 41~50: 俄罗斯鲟雌性 (CF1~CF10), 51~60: 俄罗斯鲟雄性 (CM1~CM10); d. 61~70: 施氏鲟雌性 (DF1~DF10), 71~80: 施氏鲟雄性 (DM1~DM10); e. 81~90: 西伯利亚鲟雌性 (EF1~EF10); f. 91~100: 西伯利亚鲟♀×施氏鲟♂杂交子一代雌性 (FF1~FF10); g. 101~110: 欧洲鲟雌性 (GF1~GF10)。

M represents DNA molecular weight marker (a~f: DL 2 000; g: DL 5 000); a. Lanes 1~10: Female *Huso dauricus* (AF1~AF10); Lanes 11~20: Male *H. dauricus* (AM1~AM10); b. Lanes 21~30: Female hybrid F1 (*H. dauricus* ♀ × *Acipenser schrenckii* ♂) (BF1~BF10); Lanes 31~40: Male hybrid F1 (*H. dauricus* ♀ × *A. schrenckii* ♂) (BM1~BM10); c. Lanes 41~50: Female *A. gueldenstaedtii* (CF1~CF10); Lanes 51~60: Male *A. gueldenstaedtii* (CM1~CM10); d. Lanes 61~70: Female *A. schrenckii* (DF1~DF10); Lanes 71~80: Male *A. schrenckii* (DM1~DM10); e. Lanes 81~90: Female *A. baerii* (EF1~EF10); f. Lanes 91~100: Female hybrid F1 (*A. baerii* ♀ × *A. schrenckii* ♂) (FF1~FF10); g. Lanes 101~110: Female *H. huso* (GF1~GF10).

该 DNA 分子标记对施氏鲟、达氏鳇、Hd × As 杂交 F1 和俄罗斯鲟 4 种鲟鱼的性别鉴定准确率达 100%。由于渔场现有资源限制，西伯利亚鲟、Ab × As 杂交 F1 和欧洲鳇未采集到相应雄性样本，因此未进行雄性样本验证，雌性样本鉴定准确。

#### 2.4 幼龄鲟鱼样本性别检验

在验证引物特异性和准确性的基础上，探讨该 DNA 分子标记在黑龙江未知性别低龄鲟鱼样本中的可用性。对黑龙江样本提取的合格 DNA 按最佳 PCR 反应体系和条件进行扩增，经琼脂糖凝胶电泳检测显示，达氏鳇、Hd × As 杂交 F1、西伯利亚鲟、小体鲟和 Bester 鲟 5 个鲟鱼物种中，部分样本扩增出 418 bp 特异条带，部分样本无扩增条带。具体而言，10 尾达氏鳇中 5 尾扩增出特异条带，5 尾未扩增；10 尾 Hd × As 杂交 F1 中 8 尾扩增出特异条带，2 尾未扩增；4 尾西伯利亚鲟中 2 尾有特异条带，2 尾无扩增；11 尾小体鲟中 5 尾出现特异条带，6 尾无条带；10 尾 Bester 鲟中 5 尾有特异条带，5 尾无条带。各物种潜在雌（出现特异条带）雄（无特异条带）性比分别为：达氏鳇 5 : 5，Hd × As 杂交 F1 8 : 2，西伯利亚鲟 2 : 2，小体鲟 5 : 6，Bester 鲟 5 : 5（图 4）。整体样本（ $n = 45$ ）中雌性占比 55.6%。

### 3 讨论

本研究针对鲟鱼养殖和鱼子酱产业健康可持续发展的技术需求，建立了一种用于快速鉴定鲟鱼早期性别的新型 DNA 分子标记。相较于传统鲟鱼性别鉴定方法（如超声波法、腹腔外侧手术法、腹部穿刺法）及现有分子生物学方法，基于基因片段 ZXJAscF418 的分子标记方法优势显著。

超声波法用迈瑞 dp-6600 及 7.5 Hz 探头，检测前需停食并对鱼腹侧检测，仅能识别性腺发育二期以上个体，虽操作简便且无伤害，但早期准确率有限；腹腔外侧手术法需借助工具和药物，通过开口观察性腺，准确率高但损伤

大；腹腔穿刺法操作简单快速，却易出现取不到性腺或难以分辨性别的情况（鲁宏申等 2019）。现有分子生物学方法中，ALLWSex2 标记在短吻鲟（*A. brevirostrum*）、海湾鲟（*A. oxyrinchus desotoi*）和大西洋鲟（*A. oxyrinchus*）中验证显示，与表型数据的一致性达 97% ~ 100%，但存在少量因 PCR 扩增失败或结果模糊导致的例外（< 3%），需结合重复检测或优化条件以提高可靠性（Sard et al. 2024）；SSM4 标记可用于部分鲟物种的性别鉴定，在欧洲鲟（*A. sturio*）和大西洋鲟及短吻鲟中已有应用（Pozveh et al. 2024）。此外，还有通过性腺转录组和血清代谢组分析辅助性别鉴定的方法，例如发现施氏鲟不同性腺在转录组 mRNA 基因和小分子非编码 RNA 基因表达上存在显著性别差异（Zhang et al. 2018, Yuan et al. 2019, Zhang et al. 2020）；另有研究通过构建施氏鲟精巢和卵巢差减 cDNA 文库，筛选出性别差异表达的 EST 序列，为解析性腺分化分子机制提供了重要线索（陈金平等 2006）；在鲟鱼性腺发育过程中，也可通过分析相关基因和代谢物变化推断性别（Leng et al. 2019, Zhu et al. 2020）。

本研究开发的基于雌性特异性表达基因片段 ZXJAscF418 的 DNA 分子标记，在对浙江地区 110 尾已知性别的养殖鲟鱼进行标准对照实验时，鉴定结果与已知表型数据完全一致，准确率达 100%。该分子标记法具有微创性，可有效避免对鱼体的进一步损伤；更重要的是，其引物具有高特异性和极微量 DNA 检测能力，未来有望开发基于皮肤拭子等完全无创采样方式的鲟鱼性别鉴定方法。

性腺分化是鱼类生活史的重要事件，鱼类早期性别分化同时涉及细胞学和解剖学层面：细胞学上表现为雌性/雄性生殖细胞向卵原细胞/精原细胞和卵母细胞/精母细胞的减数分裂分化；解剖学上则体现为卵巢和精巢的结构变化（如卵巢腔、输精管原基、精细小管及微血管位置等），这些是性别分化的重要标志。不

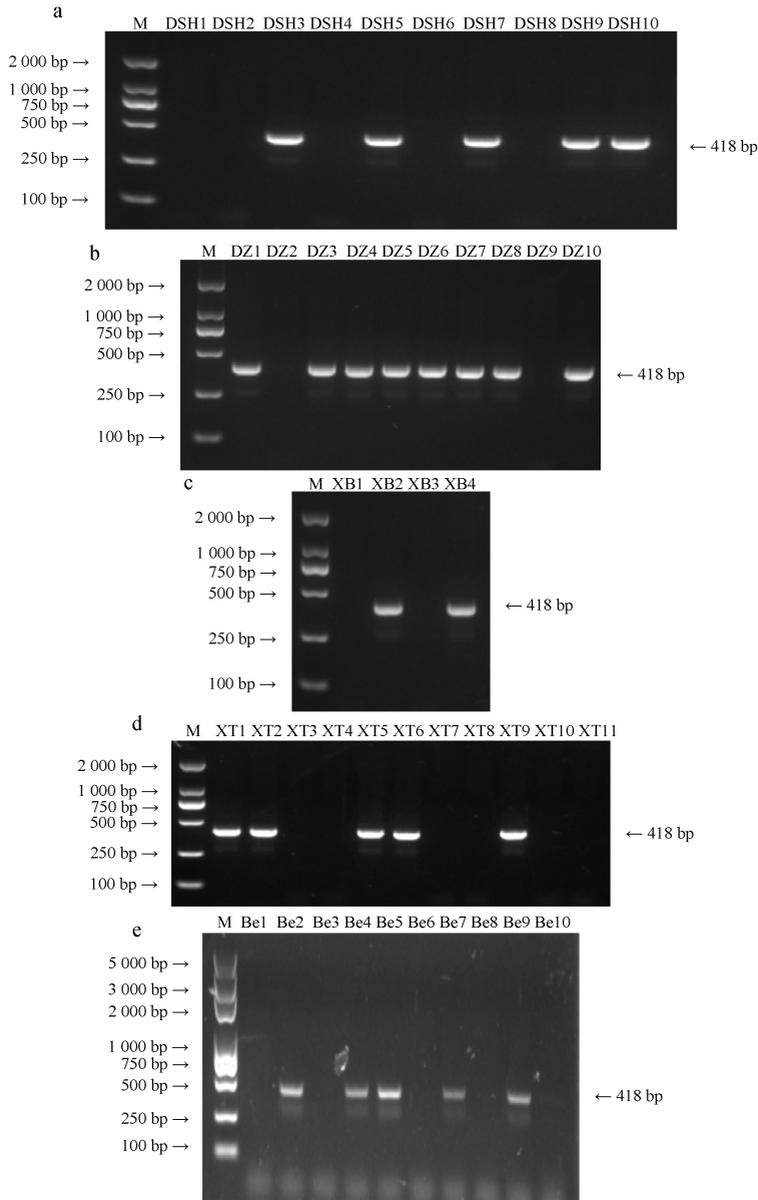


图 4 幼龄鲟鱼样本性别鉴定结果

Fig. 4 Sex identification results of juvenile sturgeon samples

M 为 DNA 分子量标准 (a~d: DL 2 000; e: DL 5 000); a. DSH1~DSH10 为达氏鲟样本; b. DZ1~DZ10 为达氏鲟♀×施氏鲟♂杂交子一代样本; c. XB1~XB4 为西伯利亚鲟样本; d. XT1~XT11 为小体鲟样本; e. Be1~Be10 为 Bester 鲟样本。

M represents DNA molecular weight marker (a~d: DL 2 000; e: DL 5 000); a. DSH1~DSH10: *Huso dauricus* individuals; b. DZ1~DZ10: Hybrid F1 (*H. dauricus* ♀×*Acipenser schrenckii* ♂) individuals; c. XB1~XB4: *A. baerii* individuals; d. XT1~XT11: *A. ruthenus* individuals; e. Be1~Be10: Bester (*H. huso* ♀×*A. ruthenus* ♂) individuals.

同鱼类性别分化时间差异显著, 例如半滑舌鲟 (*Cynoglossus semilaevis*) 在 2 月龄开始性别分化, 6 月龄完成 (马学坤等 2006); 鲟科鱼类

原始性腺的形态学特征是其性别分化的标志, 精巢性腺生殖上皮呈光滑型, 卵巢则呈皱褶或具有生殖上皮沟。施氏鲟幼鱼在 6 月龄时出现

两种不同生殖褶的组织学结构, 标志着性别分化启动(张颖等 2012)。不同鲟鱼物种的性别分化时间存在差异, 施氏鲟与纳氏鲟(*A. naccarii*)、短吻鲟大致相同, 但早于西伯利亚鲟(7月龄)和中华鲟(*A. sinensis*) (9月龄)(陈细华等 2004, Grandi and Chicca 2008, Rzepkowska et al. 2014, Zhang et al. 2022)。

在黑龙江地区 45 尾未知性别的不同种类养殖鲟鱼样本检测中, 本研究采用活体采样(仅取鳍条), 未采集内脏组织进行性腺切片——由于所采鲟鱼均在 6 月龄以下, 从性别分化进程来看, 此时大部分鲟鱼性腺尚未形成形态差异, 无法通过性腺切片验证性别, 而本实验旨在探究该分子标记在早期性别鉴定中的可用性。检测结果显示, 45 尾低龄养殖鲟鱼样本中雌性占比约 55.6%, 该比例仅反映本次样本的性别分布, 可能受养殖群体人工干预、样本量有限或物种差异影响, 不宜直接等同于自然种群的繁殖性别比。例如, 中华鲟在长江中的自然繁殖群体性别比约为 1:1 (王鲁海等 2018), 但不同鲟鱼物种的性别比例可能受遗传、环境及养殖条件影响而存在差异。本研究中, 该分子标记成功在低龄个体(5~6月龄)中区分潜在雌雄性, 初步表明其适用于早期性别鉴定。不过, 目前收集的样品数量相对有限, 尚未全面涵盖各种可能的基因型和环境条件, 后续需扩大样本量并开展更多实验, 以进一步验证引物的有效性、稳定性、准确性和可靠性, 为拓展其在鲟鱼性别控制与遗传改良中的应用奠定基础。

在鲟鱼养殖及鱼子酱生产中, 基于该分子标记的早期性别鉴定技术可实现幼鱼阶段的快速分选, 从而减少两年半以上的养殖成本, 显著降低鱼子酱的综合生产成本。同时, 该技术也为濒危野生鲟鱼的保护与增殖放流提供关键支撑: 在人工群体中保留更多雌性可提升繁育效率; 将雌性后代大规模放流, 有望快速补充野外繁殖资源, 加速种群恢复。

综上, 本研究成功开发出一种用于多物种

养殖鲟鱼早期性别鉴定的新型 DNA 分子标记, 为养殖鲟鱼的早期性别鉴定提供了微创、便捷快速且准确性高的方法, 不仅有助于鲟鱼健康养殖和产业经济效益提升, 也为濒危鲟鱼种群的保护与恢复提供了关键技术支持。

## 参 考 文 献

- Bemis W E, Findeis E K, Grande L. 1997. An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of fishes*, 48(1): 25–71.
- Birstein V J, Hanner R, DeSalle R. 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches // Birstein V J, Waldman J R, Bemis W E. *Sturgeon Biodiversity and Conservation. Developments in Environmental Biology of Fishes*, Dordrecht: Springer: 127–155.
- Grandi G, Chicca M. 2008. Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, Acipenseriformes, Chondrostei). *Journal of Morphology*, 269(10): 1238–1262.
- Kanefsky J, Smith S, Scribner K T, et al. 2022. Real-time PCR-based method for sex determination in Lake Sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Diversity*, 14(10): 839.
- Leng X Q, Zhou H, Tan Q S, et al. 2019. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses suggest that high dietary lipid levels facilitate ovary development through the enhanced arachidonic acid metabolism, cholesterol biosynthesis and steroid hormone synthesis in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *The British Journal of Nutrition*, 122(11): 1230–1241.
- Li M, Xu H, Xu W T, et al. 2020. Isolation of a male-specific molecular marker and development of a genetic sex identification technique in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*). *Marine Biotechnology*, 22(4): 467–474.
- Lopez A, Vasconi M, Bellagamba F, et al. 2020. Sturgeon meat and caviar quality from different cultured species. *Fishes*, 5(1): 9.
- Munhofen J L, Jiménez D A, Peterson D L, et al. 2014. Comparing ultrasonography and endoscopy for early gender identification of juvenile Siberian sturgeon. *North American Journal of Aquaculture*, 76(1): 14–23.
- Panagiotopoulou H, Marzecki K, Gawor J, et al. 2023. Extensive

- search of genetic sex markers in Siberian (*Acipenser baerii*) and Atlantic (*A. oxyrinchus*) sturgeons. *Aquaculture*, 573: 739517.
- Pozvezh H S T, Dorafshan S, Benfey T J, et al. 2024. First attempt to validate multiplex PCR with sex markers SSM4 and ALLWSex2 in long-term stored blood samples of eastern North American shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *bioRxiv*, 2024.10.31.621305.
- Ruan R, Feng T, Li Y, et al. 2021. Screening and identification of female-specific DNA sequences in octaploid sturgeon using comparative genomics with high-throughput sequencing. *Genomics*, 113(6): 4237–4244.
- Rzepakowska M, Ostaszewska T, Gibala M, et al. 2014. Intersex gonad differentiation in cultured Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon. *Biology of Reproduction*, 90(2): 31.
- Sard N M, Kreiser B R, Pendleton R M, et al. 2024. Validation of a molecular sex marker in three sturgeons from eastern North America. *Conservation Genetics Resources*, 16(2): 173–177.
- Scribner K T, Kanefsky J. 2021. Molecular sexing of lake sturgeon. *Journal of Great Lakes Research*, 47(3): 934–936.
- Tavakoli S, Luo Y K, Regenstein J M, et al. 2021. Sturgeon, caviar, and caviar substitutes: from production, gastronomy, nutrition, and quality change to trade and commercial mimicry. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(4): 753–768.
- Yuan L H, Li L M, Zhang X J, et al. 2019. Identification and differential expression of piRNAs in the gonads of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *PeerJ*, 7: e6709.
- Zhang L Z, Zhang T, Zhuang P, et al. 2014. Discriminant analysis of blood biochemical parameters at different developmental gonad stages and gender identification for controlled breeding of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*, Brandt, 1869). *Journal of Applied Ichthyology*, 30(6): 1207–1211.
- Zhang X J, Li L M, Jiang H Y, et al. 2018. Identification and differential expression of microRNAs in testis and ovary of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Gene*, 658: 36–46.
- Zhang X J, Wu W H, Zhou J B, et al. 2022. MiR-34b/c play a role in early sex differentiation of Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Frontiers in Zoology*, 19(1): 23.
- Zhang X J, Zhou J B, Li L M, et al. 2020. Full-length transcriptome sequencing and comparative transcriptomic analysis to uncover genes involved in early gametogenesis in the gonads of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Frontiers in Zoology*, 17: 11.
- Zhou X F, Chen L, Yang J, et al. 2020. Chinese sturgeon needs urgent rescue. *Science*, 370(6521): 1175.
- Zhu Y H, Wu J M, Leng X Q, et al. 2020. Metabolomics and gene expressions revealed the metabolic changes of lipid and amino acids and the related energetic mechanism in response to ovary development of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *PLoS One*, 15(6): e0235043.
- 陈金平, 王斌, 吴文化, 等. 2006. 施氏鲟精巢和卵巢差减 cDNA 文库的构建和差异表达 EST 的筛选. *中国水产科学*, 13(1): 8–12. [Chen J P, Wang B, Wu W H, et al. 2006. Cloning and screening of differentially expressed genes from testis and ovary of Amur sturgeon. *Journal of Fishery Sciences of China*, 13(1): 8–12.]
- 陈细华, 危起伟, 杨德国, 等. 2004. 养殖中华鲟性腺发生与分化的组织学研究. *水产学报*, (6): 633–639. [Chen X H, Wei Q W, Yang D G, et al. 2004. Histological studies on gonadal origin and differentiation of cultured *Acipenser sinensis*. *Journal of Fisheries of China*, (6): 633–639.]
- 刘雪, 刘丽, 刘锋, 等. 2024. 地热温泉鲟鱼养殖技术及效益分析. *当代水产*, 49(6): 77–78. [Liu X, Liu L, Liu F, et al. 2024. Cultivation technology and benefit analysis of sturgeon in geothermal hot springs. *Current Fisheries*, 49(6): 77–78.]
- 鲁宏申, 李文龙, 王云山, 等. 2019. 三种鲟鱼性别鉴定技术简述. *河北渔业* (3): 58–60. [Lu H S, Li W L, Wang Y S, et al. 2019. Brief introduction of sex identification technology of three sturgeons. *Hebei Fisheries*, (3): 58–60.]
- 马学坤, 柳学周, 温海深, 等. 2006. 半滑舌鲟性腺分化的组织学观察. *海洋水产研究*, 27(2): 55–61. [Ma X K, Liu X Z, Wen H S, et al. 2006. Histological observation on gonadal sex differentiation in *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 27(2): 55–61.]
- 王斌, 于冬梅, 师伟, 等. 2009. 利用超声波技术鉴定幼龄鲟鱼的性别. *动物学杂志*, 44(2): 57–63. [Wang B, Yu D M, Shi W, et al. 2009. Determination of sex and maturity by using ultrasonography in large-scale cultivation of young sturgeon. *Chinese Journal of Zoology*, 44(2): 57–63.]
- 王鲁海, 黄真理, 任家盈, 等. 2018. 基于年龄结构的中华鲟资源量

- 估算方法. 水产学报, 42(8): 1263–1272. [Wang L H, Huang Z L, Ren J Y, et al. 2018. An age-structured population model of the Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Fisheries of China*, 42(8): 1263–1272.]
- 张秀娟, 陈金平, 吴文化, 等. 2024. 用于鲟鱼性别鉴定的基因组 DNA 片段, PCR 引物, LAMP 引物及其应用: ZL202410028698. 1. CN117925852B. [Zhang X J, Chen J P, Wu W H, et al. 2024. Genomic DNA fragments, PCR primers, LAMP primers for sturgeon sex identification and their applications: ZL202410028698. 1. CN117925852B.]
- 张颖, 孙大江, 王斌, 等. 2017. 杂交鲟“鲟龙 1 号”. 中国水产, (5): 62–67. [Zhang Y, Sun D J, Wang B, et al. 2017. Hybrid sturgeon “sturgeon No.1”. *China Fisheries*, (5): 62–67.]
- 张颖, 孙慧武, 刘晓勇, 等. 2012. 施氏鲟的性腺分化及养殖水温对其性腺分化的影响. 中国水产科学, 19(6): 1008–1017. [Zhang Y, Sun H W, Liu X Y, et al. 2012. Histological observation of gonadal differentiation and effect of rearing temperature on sex differentiation in Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 19(6): 1008–1017.]
- 赵峰, 章龙珍, 庄平, 等. 2009. 鲟科鱼类性别鉴别技术的研究进展及其应用. 海洋渔业, 31(2): 215–220. [Zhao F, Zhang L Z, Zhuang P, et al. 2009. Research progress and application of sex identification techniques in sturgenos. *Marine Fisheries*, 31(2): 215–220.]