

基于血液生化指标判别分析西伯利亚鲟性别及卵巢发育时期

张涛¹, 章龙珍¹, 赵峰¹, 庄平¹, 王斌², 冯广朋¹, 黄晓荣¹

(1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090; 2. 杭州千岛湖鲟龙科技开发有限公司, 浙江 杭州 311700)

摘要:利用微创手术检查的方法对人工养殖西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 的性别和卵巢发育期进行鉴别, 根据性别和卵巢发育期将西伯利亚鲟分为性成熟雄鱼 (M)、雌鱼 III 期、IV 期和 V 期共 4 个组。对 4 个组的 22 个血液生化指标进行分析。结果表明, 西伯利亚鲟雄鱼总胆固醇 (CHOL)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 含量显著高于雌鱼 ($P < 0.05$); 随着雌鱼卵巢的发育, 血浆中总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、钙离子 (Ca^{2+}) 和无机磷 (P) 水平均表现为“先上升, 后下降”的趋势, 血糖 (GLU) 水平的变化趋势与之相反, 而血液淀粉酶 (AMY) 和球蛋白 (GLB) 水平则是在 V 期出现明显下降, 其他指标变化不明显; 利用逐步判别分析法, 对 24 个血液生化指标进行筛选, 得到 CHOL、ALT、GLB 和甘油三酯 (TRIG) 4 个参数作为判别雌雄的指标参数, 并建立了 2 个性别判别函数; 得到 AMY、 Ca^{2+} 、肌酐 (CREA) 和 GLU 4 个参数, 并建立了雌鱼性腺发育时期判别函数。雌雄判别准确率为 84%, 对雌鱼性腺发育时期判别准确率为 100%。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 236–243]

关键词: 西伯利亚鲟; 性别判别; 卵巢发育; 血液生化指标

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)02–0236–08

西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 属鲟科 (Acipenseridae) 鲟属 (*Acipenser*), 是现存 26 种鲟类中的一种, 主要分布于俄罗斯西部的额毕河至东部的科雷马河之间的西伯利亚各河流之中^[1]。西伯利亚鲟由于其生长速度快、适应性强、肉质好、鱼籽酱品质高等优点, 已推广至德国、法国和匈牙利等国进行人工养殖^[2–3]。中国自 1996 年首次引进西伯利亚鲟, 现在西伯利亚鲟的养殖量仅次于施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*), 居中国鲟鱼养殖产量的第 2 位^[4]。

随着鲟鱼养殖规模化、产业化发展, 苗种供应不足和养殖效益降低已成为限制产业发展的主要因素。进行全人工繁殖和增加鲟鱼高附加值产品—鱼籽酱 (Caviar) 的生产是实现鲟鱼养殖可持续发展的有效途径。由于西伯利亚鲟性成熟时间长, 人工养殖条件下需要 6~7 年^[2, 4–5], 且第二性征不明显, 难以从外型区分未成熟鱼的性别^[6–7]。因此, 如何快速准确的判断后备亲鱼的性别, 以及繁殖亲鱼性腺成熟度, 是亟待解决的重要问题。国外学者利用

内窥镜^[8]、超声波检查^[9]、血液中性类固醇含量^[10]、卵黄蛋白原 (Vitellogenin, Vtg) 和碱性磷酸酶 (ALP) 含量^[11]测定等方法来鉴别鲟鱼的性别和性腺发育期, 虽然都取得了一定的效果, 但存在着操作复杂、对检测者要求高、价格昂贵等问题。

鱼类血液生化指标能反应鱼类的物种特征及其生理状态, 如健康状况、营养水平等, 还能为繁殖和病理研究等提供重要的参考依据^[12]。已有的研究表明, 血液中 Ca^{2+} 、P、蛋白质等含量的变化能够反应鱼类的性别和性腺发育时期^[13–22], 但对于西伯利亚鲟血液生化指标和性别及性腺发育期关系的研究未见报道。本实验通过比较研究不同性别和性腺发育期西伯利亚鲟血液生化指标上的差异, 找出特异性较高的指标参数, 建立相应的判别方程, 旨在为生产提供一种快速有效的鉴别方法, 这对于鲟鱼养殖, 尤其是全人工繁殖和生产鱼籽酱等高附加值产品均有着重要的指导作用。

收稿日期: 2006–07–27; 修订日期: 2006–09–18.

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目 (2004AA603110); 国家“十五”重点科技攻关计划项目 (2004BA526B0114); 上海高校水产养殖学 E-研究院建设项目 (E03009)。

作者简介: 张涛 (1976–), 男, 助理研究员, 主要从事鱼类生态学研究. E-mail: zhangtaoefi@citiz.net

通讯作者: 章龙珍. E-mail: longzhen2885@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

本次实验所用的西伯利亚鲟均为1999年人工繁殖培育所得,在杭州千岛湖鲟龙科技发展有限公司千岛湖养殖基地进行网箱养殖。实验用雄鱼为6龄(均已性成熟),雌鱼为7龄。实验前3个月,利用微创手术检查的方法,对杭州千岛湖鲟鱼养殖基地的西伯利亚鲟进行性别和卵巢发育期鉴定,根据鉴定结果分箱饲养。

1.2 分组及样品采集

根据手术检查的结果,随机抽取10尾性成熟雄鱼(M)。雌鱼性腺成熟度按Le Menn等对西伯利亚鲟的性腺分期方法^[23],即根据卵子颜色和直径将雌鱼卵巢发育分为Ⅲ期(白色, $\phi < 1\text{ mm}$)、Ⅳ期(灰色, $1\text{ mm} < \phi < 2.6\text{ mm}$)和Ⅴ期(黑色, $\phi > 2.6\text{ mm}$),每组雌鱼各取5尾。取样前先用丁香油(0.1 g/L)麻醉,避免因捕捞而引起的应激反应。

样品采集前24 h禁食。鱼体被完全麻醉后,用5 mL一次性无菌注射器于臀鳍下方尾静脉采血,采用7号针头,取完血后,将5 mL血液注入肝素锂抗凝的玻璃采血管中。将血样4℃下4 000 r/min离心15 min,取血浆用于血液生化成分分析。

1.3 样品分析

本次实验共测定22项指标,包括总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLB)、甘油三酯(TRIG)、总胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血糖(GLU)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、血液淀粉酶(AMY)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总胆红素(TBIL)、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、P和 Mg^{2+} 。其中血浆中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 采用上海讯达XD-683电解质分析仪测定,方法为电极电位法;其他生化指标均用东芝TBA-40FR型全自动生化分析仪测定,酶类采用速率法,其他为终点法^[21-22]。

1.4 数据处理

实验结果采用SPSS(Version 13.0)统计软件进行处理分析,利用单因子方差分析(One-way ANOVA)来检验各实验组生化指标间的显著性,用Duncan's进行多重比较检验,取 $P < 0.05$ 作为显著性标准,数值以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示。用逐

步判别法建立西伯利亚鲟4种性别和性腺发育时期的判别函数,再据此对所有样本进行判别,判别准确率(%) = 判别正确个体数/实测个体数 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 蛋白质组成

西伯利亚鲟不同性别和性腺发育时期血液生化指标测定结果见表1。雌、雄间TP、ALB、GLB等血浆蛋白质组分无显著性差异($P > 0.05$)。雌鱼血浆中TP、ALB、GLB均随性腺发育呈“先上升,后下降”的趋势,白蛋白/球蛋白比值(ALB/GLB)则逐渐上升。其中雌鱼Ⅳ期TP、ALB和GLB含量较Ⅲ期显著上升,TP与其余各组差异显著($P < 0.05$);Ⅲ期ALB含量显著低于其余各组($P < 0.05$);Ⅴ期TP和GLB含量均较低,且与Ⅳ期差异显著($P < 0.05$)。

2.2 血脂组成

西伯利亚鲟雌雄间CHOL和LDL-C含量差异显著($P < 0.05$)。各实验组间TRIG、LDL-C含量差异不显著;雌鱼Ⅴ期CHOL、HDL-C、LDL-C含量均较低,且HDL-C与其余各组差异显著($P < 0.05$)。

2.3 血浆酶类

ALT、AST含量雌雄间差异显著($P < 0.05$)。ALP和LDH各组间无显著性差异;雌鱼中Ⅲ期AST、AST/ALT和AMY含量均较高;Ⅴ期ALT、AST/ALT、AMY与Ⅳ期差异显著($P < 0.05$)。

2.4 血糖及代谢产物

西伯利亚鲟GLU及BUN、CREA和TBIL雌雄间差异不明显;雌鱼Ⅳ期GLU显著下降($P < 0.05$),BUN、CREA和TBIL各组间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.5 无机离子组成

雌雄间血浆无机离子的含量无显著性差异($P > 0.05$)。随着雌鱼性腺的发育进程,Ⅴ期 K^+ 含量上升, Na^+ 下降,且均与Ⅳ期有显著性差异($P < 0.05$);Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ期各组间P含量差异极显著($P < 0.01$),Ⅳ期 Ca^{2+} 含量显著上升($P < 0.01$),随着雌鱼性腺发育的进程,血浆中 Ca^{2+} 和P均表现为先上升,在Ⅳ期时达到最大值,Ⅴ期时下降的趋势;各组间 Cl^- 、 Mg^{2+} 含量基本保持稳定。

表1 不同性别和卵巢发育阶段西伯利亚鲟血液生化指标

Tab.1 Blood biochemical indices of males and females in different ovarian development stages in <i>A. baerii</i> $\bar{X} \pm SD$					
指标 Index	雄性 Male, 6 ⁺ (<i>n</i> = 10)	发育期 (雌, 7 ⁺) Development stage (female, 7 ⁺) <i>n</i> = 5			平均 Average
		III	IV	V	
TP/(g·L ⁻¹)	^a 40.68 ± 4.77 ^a	40.84 ± 5.56 ^a	49.64 ± 7.49 ^b	35.56 ± 8.36 ^a	^a 42.01 ± 9.00
ALB/(g·L ⁻¹)	^a 19.08 ± 1.66 ^{ab}	13.48 ± 2.27 ^c	21.90 ± 3.63 ^a	18.36 ± 2.98 ^b	^a 17.91 ± 4.53
GLB/(g·L ⁻¹)	^a 21.60 ± 4.85 ^a	27.38 ± 3.55 ^b	27.76 ± 3.98 ^b	17.20 ± 5.45 ^a	^a 24.11 ± 6.50
ALB/GLB	^a 0.93 ± 0.26 ^{ab}	0.49 ± 0.05 ^c	0.79 ± 0.05 ^a	1.12 ± 0.24 ^b	^a 0.80 ± 0.30
TRIG/(mmol·L ⁻¹)	^a 8.60 ± 4.12 ^a	8.21 ± 2.66 ^a	8.14 ± 2.71 ^a	8.30 ± 2.79 ^a	^a 8.22 ± 2.52
CHOL/(mmol·L ⁻¹)	^a 10.51 ± 4.65 ^a	6.51 ± 6.69 ^{ab}	6.23 ± 1.16 ^{ab}	4.79 ± 1.48 ^b	^a 5.84 ± 3.80
HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	^a 4.35 ± 2.03 ^a	5.84 ± 2.09 ^a	5.89 ± 0.31 ^a	2.02 ± 0.64 ^b	^a 4.58 ± 2.22
LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	^a 3.70 ± 3.72 ^a	1.98 ± 4.42 ^a	0.20 ± 0.44 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	^a 0.73 ± 2.55
GLU/(mmol·L ⁻¹)	^a 3.54 ± 1.10 ^a	3.25 ± 0.50 ^a	1.89 ± 0.66 ^b	3.46 ± 0.29 ^a	^a 2.87 ± 0.86
ALT/(U·L ⁻¹)	^a 76.77 ± 28.93 ^a	54.12 ± 18.84 ^{ab}	44.28 ± 11.32 ^b	67.20 ± 16.41 ^a	^a 55.20 ± 17.59
AST/(U·L ⁻¹)	^a 673.27 ± 218.56 ^a	564.36 ± 185.86 ^{ab}	428.64 ± 95.92 ^b	419.40 ± 144.78 ^b	^a 470.80 ± 152.29
AST/ALT	^a 9.18 ± 2.82 ^a	10.61 ± 2.18 ^a	9.77 ± 0.68 ^a	6.22 ± 1.44 ^b	^a 8.87 ± 2.44
ALP/(U·L ⁻¹)	^a 96.73 ± 49.59 ^a	61.91 ± 35.74 ^a	87.95 ± 19.55 ^a	100.20 ± 46.93 ^a	^a 83.36 ± 37.10
LDH/(U·L ⁻¹)	^a 575.10 ± 527.21 ^a	732.04 ± 330.61 ^a	566.18 ± 95.03 ^a	395.60 ± 151.00 ^a	^a 564.61 ± 246.05
AMY/(U·L ⁻¹)	^a 97.05 ± 60.02 ^a	150.53 ± 1.97 ^b	148.83 ± 11.64 ^b	45.40 ± 18.43 ^c	^a 114.92 ± 52.22
BUN/(mmol·L ⁻¹)	^a 0.29 ± 0.22 ^a	0.32 ± 0.19 ^a	0.22 ± 0.09 ^a	0.43 ± 0.25 ^a	^a 0.32 ± 0.20
CREA/(μmol·L ⁻¹)	^a 37.62 ± 30.50 ^a	22.94 ± 9.59 ^a	15.23 ± 1.02 ^a	35.84 ± 18.01 ^a	^a 24.67 ± 14.02
TBIL/(μmol·L ⁻¹)	^a 4.48 ± 1.87 ^a	4.84 ± 2.25 ^a	3.35 ± 1.16 ^a	2.99 ± 1.21 ^a	^a 3.73 ± 1.72
K ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	^a 1.92 ± 0.50 ^a	2.25 ± 0.61 ^{ab}	1.84 ± 0.52 ^a	2.68 ± 0.44 ^b	^a 2.26 ± 0.60
Na ⁺ /(mmol·L ⁻¹)	^a 138.63 ± 1.22 ^{ab}	140.61 ± 3.42 ^a	147.77 ± 6.80 ^c	136.00 ± 0.94 ^b	^a 141.50 ± 6.47
Cl ⁻ /(mmol·L ⁻¹)	^a 110.70 ± 5.38 ^a	110.78 ± 1.28 ^a	109.27 ± 3.55 ^a	110.12 ± 2.48 ^a	^a 110.06 ± 2.50
Ca ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	^a 2.82 ± 0.35 ^a	2.42 ± 0.15 ^a	5.90 ± 1.47 ^b	3.25 ± 0.38 ^a	^a 3.86 ± 1.74
P/(mmol·L ⁻¹)	^a 2.98 ± 0.68 ^a	3.45 ± 0.30 ^a	4.47 ± 0.47 ^b	2.26 ± 0.30 ^c	^a 3.39 ± 0.99
Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	^a 1.32 ± 0.28 ^a	1.00 ± 0.06 ^b	1.47 ± 0.21 ^a	1.58 ± 0.12 ^a	^a 1.35 ± 0.29

注:同一行中数字字母上标不同代表有显著性差异 ($P < 0.05$);左上角为雌雄间比较,右上角为各组间比较。

Note: The different letters on the parameters in one row stand for significant difference ($P < 0.05$). Upper left corner for comparing between male and female; right corner for comparing between every group.

2.5 判别分析

根据血液生化指标对25尾被测西伯利亚鲟的性别和性腺发育时期分别进行判别分析。由于血液生化检测指标较多,其中有些指标组间差异不显著,所以采用逐步判别分析方法,对24个血液生化指标进行了筛选,表2为指标筛选的结果。在决定指标选入

还是剔除时采用 F 统计量,采用向前选择的方式,选入指标的显著水平为 $F > 3.84$,剔除的标准是 $F < 2.71$ 。通过筛选,判别性别共保留了4个指标,根据 Wilks' Lambda 值判定鉴别能力大小依次为 CHOL、ALT、GLB 和 TRIG;判别雌鱼性腺发育时期保留了4个指标,依次为 AMY、Ca²⁺、CREA 和 GLU。

表2 逐步判别筛选结果

Tab.2 Result of stepwise discriminant analysis						
项目 Item	步骤 Step	引入变量 Entered variable	F	P	Wilks' Lambda	鉴别能力 Discriminating ability
性别 Sex	1	CHOL	22.541	0.000	0.752	0.752
	2	ALT	12.171	0.002	0.545	0.207
	3	GLB	5.064	0.036	0.452	0.093
	4	TRIG	4.621	0.044	0.367	0.085
雌鱼性腺发育时期 Ovarian development stages of female	1	AMY	113.466	0.000	0.050	0.050
	2	Ca ²⁺	47.659	0.000	0.011	0.039
	3	CREA	45.450	0.000	0.005	0.006
	4	GLU	45.105	0.000	0.002	0.003

利用从 24 个血液生化指标中筛选出的 CHOL、ALT、GLB 和 TRIG 这 4 个指标建立了 2 个性别判别函数;筛选出 AMY、Ca²⁺、CREA 和 GLU 等 4 个指标建立了雌鱼性腺发育时期的判别函数。

性别判别函数如下:

$$Y_M = -17.181 + 0.493GLB + 0.012TRIG + 0.616CHOL + 0.199ALT$$

$$Y_F = -14.140 + 0.781GLB + 0.558TRIG - 0.173CHOL + 0.088ALT$$

雌鱼性腺发育时期判别函数如下:

$$Y_{III} = -183.373 + 29.434GLU + 2.264AMY - 1.804CREA - 12.587Ca^{2+}$$

$$Y_{IV} = -131.217 + 17.721GLU + 1.827AMY - 1.382CREA - 4.103Ca^{2+}$$

$$Y_V = -31.466 + 14.275GLU + 0.373AMY - 0.181CREA + 0.278Ca^{2+}$$

将检测对象相关指标的数值代入上述公式中,计算出相应的函数值,被判别的个体归属于函数值最大的判别函数所对应的性别和性腺发育阶段。为验证判别公式的实用性,对测定的 25 个样本按上述判别公式进行分类预测,结果见表 3。判别结果表明,性别判别准确率为 84%,其中对雌、雄的判别准确率分别为 80% 和 90%;对雌鱼性腺发育时期的判别准确率为 100%,具有较好的判别效果。

表 3 不同性别和性腺发育期西伯利亚鲟判别分析结果

Tab.3 Results of sex and ovarian development stages discriminating analysis in *A. baerii*

项目 Item		预测结果 Predicted result		准确率 /% Accuracy	总准确率 /% Total accuracy
		正确 True	错误 False		
性别 Sex	♂ (10)	9	1	90	84
	♀ (15)	12	3	80	
雌鱼性腺发育期 Ovarian development stage of female	III (5)	5	0	100	100
	IV (5)	5	0	100	
	V (5)	5	0	100	

注:括号中数字为实测个体数。

Note: The figure in brackets means observed sample number.

3 讨论

3.1 人工养殖西伯利亚鲟血液生化指标的特点

在正常情况下,鱼体血液中的生化指标值保持相对稳定,能够反应其物种特性及生理状况等^[12]。本研究显示西伯利亚鲟血液中 GLU 平均浓度为 (3.14 ± 1.00) mmol/L, 较草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) (8.84 ± 1.43) mmol/L^[24]、额河银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) (24.19 ± 6.70) mmol/L^[25]等淡水鱼类低,与高首鲟 (*Acipenser transmontanus*) (3.61 ± 0.06) mmol/L^[26]和野鲤 (*Cyprinus carpio*) (3.39 ± 0.65) mmol/L^[27]较为接近。由于血糖值受栖息环境、活动性、投饵等许多因素的影响,一般来说运动活泼的鱼类较运动迟缓或底栖性的鱼类血糖值高,流水环境较静水高^[28],西伯利亚鲟较低的血糖与其生活的环境(水库网箱养殖)及其生活习性(底栖性,活动较迟缓)是吻合的。人工养殖西伯利亚鲟 TP、ALB、GLB 等与其他鱼类差异不明显;而血液 TRIG 浓度较高,为 (8.37 ±

3.18) mmol/L, 较草鱼 (3.23 ± 0.31) mmol/L^[24]、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) (2.45 ± 0.66) mmol/L^[29]和高首鲟 (4.58 ± 0.18) mmol/L^[26]高出 1~2 倍,这可能与营养状况有着较大的关系,因为在手术检查性别的过程中发现,实验用西伯利亚鲟普遍存在鱼体过肥、体内蓄积脂肪过多现象,可能是饲料中脂肪含量过高或西伯利亚鲟脂肪代谢障碍导致血液中 TRIG 浓度过高;西伯利亚鲟 BUN 浓度为 (0.31 ± 0.20) mmol/L, 较其他鱼类低。

3.2 西伯利亚鲟不同性别间血液生化指标差异的分析

性别和性成熟是影响鱼类血液生化指标的重要因素^[30-31]。对西伯利亚鲟的研究表明,雌雄间血液 CHOL、LDL-C、ALT、AST 浓度差异明显 ($P < 0.05$),其他血液生化指标雌雄间差异不显著 ($P > 0.05$)。

鲟鱼的性腺发育有别于许多硬骨鱼类,在性腺发育早期,脂肪在性腺内大量积累,造成卵巢内

CHOL和卵磷脂(Lecithin, LEC)等脂类物质含量较血液中高,随着性腺发育的进程,脂肪组织逐渐被吸收转化,性腺逐步发育成熟^[2,5]。西伯利亚鲟雄鱼的性成熟时间较雌鱼早,野生西伯利亚雄鲟性成熟时间为10~12龄,而在人工养殖条件下其性成熟年龄会大大提前^[2,4-5]。本次实验中测定的雄鱼年龄为6龄,均已达到性成熟,饲料中的脂肪主要用于提供生长所需能量,精巢中积累量减少。而雌鱼在卵巢发育过程中,自卵黄生成期后,大量的CHOL和LEC在卵巢内积累,造成血脂降低。由于血液中60%~70%的CHOL是由低密度脂蛋白(LDL)携带的^[28],所以血液中CHOL浓度的上升通常伴随着LDL-C浓度的上升,因此造成雄鱼血液中CHOL和LDL-C浓度较雌鱼高。

3.3 西伯利亚鲟雌鱼不同性腺发育时期的血液生化指标差异的分析

西伯利亚鲟雌鱼性腺发育不同时期血液中TP、ALB、Ca²⁺和P的浓度差异显著,从大到小依次为Ⅳ期、Ⅲ期、Ⅴ期,GLU浓度从大到小依次则为Ⅴ期、Ⅲ期、Ⅳ期,AMY和GLB浓度则是在Ⅴ期出现明显下降。鱼类性腺发育过程中,受垂体分泌的促性腺激素作用,卵巢产生雌激素,雌激素进而影响蛋白质、核酸和Ca²⁺等的代谢,肝脏在雌激素的作用下合成卵黄蛋白的前体—卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg),经血液循环到达卵巢,在卵母细胞内积累^[13]。Vtg是雌鱼特有的蛋白质,是一种钙结合脂磷蛋白,含磷量较高,约占1%^[14]。Doroshov等^[13]对高首鲟的研究表明,血浆中Vtg浓度的变化可以用血液中Ca²⁺和P浓度来估计,在性腺发育过程中,Vtg的发生过程伴随着Ca²⁺和P浓度的变化,Ⅳ期时Vtg和Ca²⁺水平均达到最大值(7 mg/mL和4.99 mmol/L),然后在产卵前明显下降。Linares-Casenave等^[15-16]也发现高首鲟性腺发育过程中血浆中Ca²⁺的浓度发生相应的变化,且Vtg与Ca²⁺的含量之间存在着线性关系($C_{Ca^{2+}} = 98.94 + 0.015C_{Vtg}$, $r^2 = 0.95$)。卵黄积累开始前Ⅲ期高首鲟血浆中Ca²⁺浓度很低为(2.45 ± 0.10) mmol/L,随着性腺的发育,Ⅳ期Ca²⁺浓度升高至(4.49 ± 0.50) mmol/L,Ⅴ期卵子成熟时Ca²⁺浓度下降至(4.37 ± 0.32) mmol/L。本研究中,Ⅲ期Ca²⁺浓度为(2.42 ± 0.15) mmol/L,Ⅳ期升高至(5.90 ± 1.47) mmol/L,而Ⅴ期Ca²⁺浓度有所下降为(3.25 ± 0.38) mmol/L,这与对高首鲟的研究结果一致。

李朝军等^[17]对大阪鲫(*Carassius auratus cuvieri*)的研究表明,腹腔注射CaCl₂后卵母细胞卵径增大,卵母细胞的蛋白含量升高,表明Ca²⁺能够促进卵母细胞的发育和蛋白的吸收。李云等^[18]和王友惠等^[19]在对瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)的研究中发现,随着雌鱼性腺的发育,血清中P浓度从Ⅱ期的(0.23 ± 0.10) mmol/L升高到Ⅳ期末的(1.78 ± 0.41) mmol/L,达到最大值,Ⅴ期时降低至(1.29 ± 0.32) mmol/L,雌鱼血清中Ca²⁺浓度从Ⅱ期时的(0.83 ± 0.10) mmol/L逐渐升高,到Ⅳ期末时达到最大值(2.04 ± 1.28) mmol/L,Ⅴ期时含量下降至(1.28 ± 0.35) mmol/L。本研究中西伯利亚鲟雌鱼不同性腺发育期血液中Ca²⁺和P浓度的变化与上述研究结果非常一致。Pottinger等^[11]发现褐鳟(*Salmo trutta*)和大西洋鲑(*Salmon salar*)血浆中ALP和Vtg含量间有着显著的线性相关关系($C_{ALP} = 4.5774 + 0.0016C_{Vtg}$, $r^2 = 0.93$),但ALP对性别判别的准确性很低,只有50%左右。本研究中ALP和Ca²⁺、P浓度的变化趋势并不一致,ALP的浓度随着性腺发育进程逐渐升高,其从大到小依次为Ⅲ期、Ⅳ期、Ⅴ期,但各期间差异不明显($P > 0.05$),在进行逐步判别分析的过程中ALP也未被筛选进入作为性别和雌鱼性腺发育时期的判别参数。

鱼类随着性腺发育的进程,其血液中的蛋白质含量会发生明显的变化。吴嘉敏等^[20]对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的研究表明,蛋白质在参与性腺发育的过程中,其浓度变化与性腺发育相关,雌性血淋巴TP水平由性成熟前的(99.55 ± 12.06) g/L下降至成熟后的(72.26 ± 17.87) g/L;张海发等^[21]在有关斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的研究中发现,性成熟的亲鱼与1龄幼鱼间有11项指标有显著性差异,其中TP由46.2 g/L升高至59.8 g/L。Folmar等^[22]发现,鲮鱼(*Mugil cephalus*)性成熟前TP和ALB水平最高,繁殖时TP和ALB水平有所降低。由于Ca²⁺、P、TP和ALB等与性腺发育的关系,本实验中其水平的变化趋势反映了卵黄物质的大量积累主要发生在第Ⅲ期到第Ⅳ期末,在卵巢卵黄积累的末期(Ⅳ期末)Ca²⁺、P、TP和ALB等的浓度达最大值时,即将产卵的第Ⅴ期,卵黄蛋白原的合成和运输已开始逐渐减少,Ca²⁺、P、TP和ALB等指标值下降。

3.4 利用血液生化指标判断鲟鱼性别和性腺发育时期的探讨

在鲟鱼养殖中,尽早地区分雌雄是十分必要的,这有利于将雄鱼用于商品鱼的生产,而将雌鱼留下培育用于生产鱼籽酱或进行人工繁殖。但鲟鱼的雌雄鉴别一直是困扰鲟鱼养殖生产的难题。由于鲟鱼从外型上难以区分雌雄,尤其是在性成熟前,所以其性别的鉴定一直是困扰鲟鱼养殖业的难题。对此,国内外学者进行了相关的研究,并开发出了一些新的技术手段。Vecsei等^[7]根据生殖孔的形状对高首鲟、大西洋鲟(*A. oxyrinchus*)、短吻鲟(*A. brevirostrum*)和中吻鲟(*A. medirostris*)等4种北美地区鲟鱼的成熟亲本进行雌雄鉴别。研究发现,雄鱼生殖孔形状呈“Y”形,而雌鱼呈“O”形,鉴别准确率为82%,但在对西伯利亚鲟的检查中并未发现这一特征,且这一方法只能鉴别性成熟亲鱼,对未成熟鲟鱼则无法鉴别,且不能区分性腺发育的时期。Kynard等^[8]利用内窥镜观察短吻鲟的性腺来判断性别和性腺发育时期,但鉴别准确率只有54%左右。Karlsen等^[9]利用超声波检查法对788尾1~6龄大西洋鲟(*Gadus morhua*)的性别进行无损鉴别,鉴别准确率超过了95%。Wildhaber等^[32]同时利用超声波和内窥镜对密西西比铲鲟(*Scaphirhynchus platyrhynchus*)和密苏里铲鲟(*Scaphirhynchus albus*)进行性别鉴定,研究结果表明,密西西比铲鲟内窥镜检查判别准确率(92%)较超声波检查(70%)高,且对雄鱼(93%和75%)的判别准确率高于雌鱼(92%和63%),密苏里铲鲟超声波检查准确率为75%,而内窥镜检查准确率为50%;Doroshov等^[6]和Conte等^[33]采用手术和挖卵检查的方法,取出少量性腺组织,通过肉眼和显微镜来鉴别性别和性腺发育时期;Feist等^[10]等通过检测血浆中睾酮的含量,可以区分21月龄高首鲟的雌雄,鉴别准确率达到96%;Pottinger^[11]利用血浆中ALP和17 β -雌二醇(E₂)对褐鲟和大西洋鲟性别判别的准确率为50%~85%,而使用Vtg判别的准确率达到92%~99%(雄鱼低于10 $\mu\text{g/L}$,雌鱼高于800 $\mu\text{g/L}$)。上述方法虽然都能对鱼类的性别和性腺发育时期进行鉴别,但是鉴别准确率受检查时间、发育情况和个体大小等因素的影响而有较大的变化,且存在着操作复杂、对检测者要求高、设备和检测价格昂贵等问题。

本研究结果表明,人工养殖西伯利亚鲟雌雄间,以及雌鱼不同性腺发育时期间,有些血液生化指标

存在着显著性的差异。利用逐步判别分析方法,通过对检测指标的筛选,选取CHOL、ALT、GLB和TRIG建立性别判别函数,选取AMY、Ca²⁺、CREA和GLU建立雌鱼性腺发育时期判别函数,能够较好的鉴别雌雄和雌鱼的性腺发育时期,对雌雄判别准确率达到84%,对雌鱼性腺发育时期的判别准确率达到100%,均达到了较高的判别准确率。

本研究中由于鲟鱼材料难以取得,所以实验样本较少。通过加大检测的样本量,并结合手术检查等其他鉴别方法,确定不同性别和性腺发育时期阶段血液生化指标的范围,可以提高判别的准确率,这些都有待今后进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] Ruban G I. Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* [J]. *Environ Biol Fishes*, 1997, 48: 221–230.
- [2] Williot P, Brun R, Rouault T, et al. Management of female spawners of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt: first results [C] // *Acipenser*. Bordeaux: CEMAGREF Publ, 1991: 365–379.
- [3] Bronzi P, Rosenthal H, Arlati G, et al. A brief overview on the status and prospects of sturgeon farming in Western and Central Europe [J]. *J Appl Ichthyol*, 1999, 15: 224–227.
- [4] 曲秋芝, 高艳丽. 西伯利亚鲟的人工繁殖 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (4): 492–495.
- [5] Williot P, Brun R. Ovarian development and cycles in cultured Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* [J]. *Aquat Living Res*, 1988, 11: 111–118.
- [6] Doroshov S I, Van Eenennaam J P, Moberg G P. Reproductive management of cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [C] // *High Performance Fish, Proceedings of an International Fish Physiology Symposium*. Vancouver: Fish Physiology Association, 1994: 156–161.
- [7] Vecsei P, Litvak M K, Noakes D L G, et al. A noninvasive technique for determining sex of live adult North American sturgeons [J]. *Environ Biol Fishes*, 2003, 68: 333–338.
- [8] Kynard B, Kieffer M. Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures [J]. *J Appl Ichthyol*, 2002, 18: 505–508.
- [9] Karlsen O, Holm J C. Ultrasonography, a non-invasive method for sex determination in cod (*Gadus morhua*) [J]. *J Fish Biol*, 1994, 44: 965–971.
- [10] Feist G, Van Eenennaam J P, Doroshov S I, et al. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels [J]. *Aquaculture*, 2004, 232: 581–590.

- [11] Pottinger T G, Pulman K T G, Carrick T R, et al. Evaluation of biochemical methods for the nondestructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout [J]. J Fish Biol, 2005, 67: 1 514 – 1 533.
- [12] Danilo W F, Gunther J E, Gilson K. Comparative hematology in marine fish [J]. Comp Biochem Physiol, 1992, 102A: 311 – 321.
- [13] Doroshov S I, Moberg G P, Van Eenennaam J P. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [J]. Environ Biol Fishes, 1997, 48: 265 – 278.
- [14] Specker J L, Sullivan C V. Vitellogenesis in fishes: Status and perspectives [C] // Perspectives in Comparative Endocrinology. Ottawa: National Research Council of Canada, 1994: 304 – 315.
- [15] Linares-Casenave J, Kroll K J, Van Eenennaam J P, et al. Development and application of an enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plasma vitellogenin in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [C] // High Performance Fish, Proceedings of an International Fish Physiology Symposium. Vancouver: Fish Physiology Association, 1994: 165 – 169.
- [16] Linares-Casenave J, Kroll K J, Van Eenennaam J P, et al. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon [J]. Aquaculture, 2003, 221: 645 – 656.
- [17] 李朝军, 刘荣臻, 王浩, 等. 大阪鲫卵黄蛋白原和钙离子关系的初步研究 [J]. 水产学报, 1993, 17 (4): 297 – 303.
- [18] 李云, 李英文, 王友慧, 等. 瓦氏黄颡鱼血清卵黄蛋白原和钙离子以及肝脏 RNA 的变化与性腺发育的关系 [J]. 重庆水产, 1999, 2: 17 – 20.
- [19] 王友慧, 李云. 瓦氏黄颡鱼血清蛋白磷与性腺发育关系的研究 [J]. 水产科学, 2004, 23 (10): 5 – 8.
- [20] 吴敏嘉, 姜耀新. 中华绒螯蟹血淋巴和胰腺腺的总蛋白含量与性早熟的关系 [J]. 水产学报, 2000, 24 (4): 306 – 311.
- [21] 张海发, 王云新, 林鑫, 等. 斜带石斑鱼血液性状及生化指标的研究 [J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 2004, 1: 102 – 107.
- [22] Folmart L C, Moody T, Bonomelli S, et al. Annual cycle of blood chemistry parameters in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) and pinfish (*Lagodon rhomboides* L.) from the Gulf of Mexico [J]. J Fish Biol, 1992, 41: 999 – 1 011.
- [23] Le Menn F, Pelissero C. Histological and ultrastructural studies of oogenesis of the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [C] // *Acipenser*. Bordeaux: CEMAGREF Publ, 1991: 113 – 127.
- [24] 许品诚, 曹萃禾. 湖泊围养鱼类血液学指标的初步研究 [J]. 水产学报, 1989, 13 (4): 346 – 352.
- [25] 贝念湘, 杨红建, 李新平, 等. 额河银鲫血液生化及血液流变学参数 [J]. 中国兽医学报, 1999, 19 (1): 43 – 45.
- [26] Silas S O, Liu W, Li H B. Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus* [J]. Aquaculture, 1997, 151: 357 – 363.
- [27] 魏彬, 贝念湘, 李新平, 等. 新疆野鲤生理生化血液流变学常值研究 [J]. 新疆农业大学学报, 1997, 20 (1): 34 – 38.
- [28] 尾崎久雄. 鱼类血液与循环生理 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [29] 钱云霞, 陈惠群, 孙江飞. 饥饿对养殖鲈鱼血液生理生化指标的影响 [J]. 中国水产科学, 2002, 9 (2): 134 – 137.
- [30] 周玉, 郭广场, 杨振国, 等. 鱼类血液学指标研究的进展 [J]. 上海水产大学学报, 2001, 10 (2): 163 – 165.
- [31] 陈晓耘. 鱼类的血液 [J]. 重庆师专学报, 2000, 19 (3): 70 – 73.
- [32] Wildhaber M L, Papoulias D M, Delonay A J, et al. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to the pallid sturgeon [J]. J Fish Biol, 2005, 67: 114 – 132.
- [33] Conte F S, Doroshov S I, Lutes P B, et al. Hatchery manual for the white sturgeon [M]. CA: University of California Agriculture and Natural Resources, 1988.

Determination of different sexes and ovarian development stages in cultured *Acipenser baerii* based on blood biochemical indices

ZHANG Tao¹, ZHANG Long-zhen¹, ZHAO Feng¹, ZHUANG Ping¹, WANG Bin², FENG Guang-peng¹, HUANG Xiao-rong¹

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China; 2. Hangzhou Qiandaohu Xunlong Technology Development Co., Ltd, Hangzhou 311700, China)

Abstract: Sex and ovarian development stages in cultured *Acipenser baerii* were identified by Minimally Invasive Surgical techniques. The fish were divided into four groups: mature male (M) and female (Stages III, IV and V) by sex and gonadal maturity. Ten males were sampled randomly and 5 females were sampled from each of the three female groups. Twenty-two blood biochemical parameters of four groups were investigated. The results showed that there were significant differences in the concentrations of cholesterol (CHOL), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) between male and female, and the values of male were significantly higher than those of female ($P < 0.05$). With the development of ovary, the concentrations of plasma total protein (TP), Albumin (ALB), Ca^{2+} and P increased, and reached the highest at stage IV, then the parameter values decreased when the eggs became mature at stage V. All the four indices showed the same tendency, but the tendency of GLU concentration was inverse to those of TP, ALB, Ca^{2+} and P; amylase AMY decreased significantly when the ovary developed from stage IV to stage V; the other indices didn't have significant changes. Step-wise discriminant analysis was used to identify sex and ovarian development in *A. baerii* groups. CHOL, ALT, GLB and triglyceride (TRIG) concentrations were filtered from 24 blood biochemical indices to establish two discriminant functions for male and female; the discriminant accuracy was 90% and 80% for male and female and 80% respectively and 84% for total; AMY, Ca^{2+} , creatinine (CREA) and GLU concentrations were filtered to establish four discriminant functions for ovarian development stages in female *A. baerii*, and the total discriminant accuracy was 100%. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (2): 236–243]

Key words: *Acipenser baerii*; sex discrimination; ovarian development; blood biochemical indices

Corresponding author: ZHANG Long-zhen. E-mail: longzhen2885@hotmail.com