

低龄中华鲟外科手术性别鉴定技术

陈细华^{1,2}, 危起伟², 朱永久², 杨德国², 罗刚², 刘筠³

(1. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275; 2. 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术开放实验室, 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北荆州 434000; 3. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南长沙 410006)

摘要:取51尾人工养殖1.5~5.6龄、体重2.6~35.5 kg的中华鲟(*Acipenser sinensis*), 通过腹腔外科手术检查性腺并取得性腺组织材料。5~5.6龄(体重18~35.5 kg)的中华鲟性腺都能通过肉眼分辨雌雄, 是进行性别鉴定的较佳时期。手术时, 水温14.3~30℃, 切口位于腹中线或偏离腹中线1~4 cm, 切口长4~5.5 cm(体重2.6~9.7 kg)或3.8~7.5 cm(13.5~35.5 kg), 切口采用医用丝线行交叉缝合或一针一结缝合, 出池后的全程操作时间20~30 min, 可较圆满完成性腺检查和性腺组织取材, 94.1%(48/51)的受试鱼存活, 伤口在15~40 d愈合, 缝合线自行消失。水温高、切口短、采用一针一结缝合均能加快伤口的愈合。

关键词:中华鲟; 人工养殖; 外科手术; 性别鉴定

中图分类号: Q959.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)04-0371-04

中华鲟(*Acipenser sinensis*)是我国国家一级重点保护动物。在中华鲟人工繁殖的子代中, 培育后备亲鱼, 进而实现中华鲟的全人工繁殖, 是保护中华鲟物种资源的途径之一。在中华鲟人工后备亲鱼培育过程中, 有必要监测其性腺发育状态, 及早地分辨性别以便及时进行分池培育。

在鲟鱼类, 腹腔外科手术常用来进行性腺发育状况的检查及性别鉴定、性腺组织取材和亲鲟活体取卵^[1-5]。在低龄状态下, 鲟鱼的性腺尚未充分发育, 性腺检查及组织取材的难度增加, 会增加手术风险。在我国, 关于鲟鱼类腹腔外科手术的技术研究报道仅见施(史)氏鲟(*A. schrencki*)亲鲟的活体取卵一例, 2尾受试鱼存活1尾, 死亡1尾^[3]。在中华鲟, 除了人工繁殖时用挖卵器通过雌性亲鲟腹部长约1 cm的切口检查卵粒成熟度属于一项常规的生产技术外, 其他形式的腹腔外科手术操作尚未见报道。我国于1997年开始, 从中华鲟人工繁殖的子代中培育后备亲鱼, 为解决中华鲟后备亲鱼培育过程中的性腺检查及性别鉴定和性腺取材问题, 从2001年3月份开始, 先后对51尾、养殖1.5~5.6年的中华鲟, 进行了腹腔外科手术试验, 本研究旨在确定进行性别鉴定的最佳时机(年龄、体重)和手术后的存活条件。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

实验分别于长江水产研究所野生动物繁育救护中心和

福建厦门市中华鲟繁育保护基地进行。前者的实验鱼38尾, 1.5~5.0龄, 体重2.6~30 kg; 后者的实验鱼13尾, 5.0~5.6龄, 体重18~35.5 kg, 其中3尾为纯淡水养殖, 10尾已转入海水(盐度24)养殖1~2年。实验鱼合计51尾, 见表1。实验鱼的孵出日期统一为孵出当年10月中旬, 例如2001年孵出的中华鲟, 2003年5月上旬受试时的年龄计为1.5年。

1.2 腹腔外科手术及性腺取材、性别鉴定

用具有头兜的帆布担架捞取实验鱼, 体重10 kg以下的受试鱼在手术前经25 mg/L的丁香油(clove oil)麻醉10~15 min。将担架置于手术支架上, 鱼呈仰卧姿势, 由鳃部供水。手术器具包括医用手术刀、手术剪、海绵钳、止血钳、弧形缝合针、缝合线(医用丝线)等, 使用前经70%乙醇浸泡1~5 min。在生殖孔前3~6块腹骨板之间的腹中线或偏离腹中线1~4 cm处, 切开长(3.8~7.5) cm的切口。扒开切口观察性腺, 参照文献[6]提出的中华鲟性腺肉眼区分标准, 辨认卵巢与精巢。然后用手术剪等工具取下体积约0.5 cm³的性腺组织材料。切口缝合采用交叉缝合法或一针一结缝合法, 根据切口长度缝3~8针。缝合完毕, 用红霉素软膏涂抹伤口处。每尾受试鱼, 从下刀切口到切口缝合完毕, 耗时4~12 min。从离开培育池到返回培育池或暂养池, 耗时20~30 min。

1.3 术后观察

收稿日期: 2003-08-01; 修订日期: 2003-12-18。

基金项目: 2001~2002年科技部社会公益研究专项资金项目; 2002年农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室资助项目。

作者简介: 陈细华(1962-), 男, 副研究员, 博士生, 主要从事鱼类繁殖生理学研究, E-mail: chensh@yfi.ac.cn

通讯作者: 危起伟, E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

手术后,受试鱼转入小型暂养池中暂养观察(41尾),或经标志后直接返回原培育池观察(10尾)。采用2类标志方法:体外塑料带或标志牌标志和背部肌肉内 PIT (passive integrated transponder) 标志,体外标志用于区分受试鱼与非受试鱼,PIT 标志主要用于长时间的跟踪观察。每天观察受试

鱼的活动情况,4~5 d 后开始检查伤口,每4~7 d 检查1次,伤口即将愈合时每2~3 d 检查1次,直至伤口愈合。伤口愈合以伤口处皮肤闭合,但尚未结痂为准。对于一组受试鱼是同一天(次)完成手术的,该组受试鱼的伤口愈合时间以该组约半数的受试鱼完成伤口愈合的时间为准。

表1 养殖中华鲟腹腔镜外科手术技术条件

Table 1 Surgical treatments on cultured Chinese sturgeon

实验鱼编号 Fish No.	手术日期 Date	年龄 Age	体重/kg Body weight	切口部位 Incision site	切口长度/cm Incision length	缝合方式 Suture pattern	水温/℃ Temperature	盐度 Salinity
1	01-03-16	3.4	17	VM	6	CS	14.3	0
2	01-03-17	3.4	13.5	VM	7.5	CS	14.3	0
3	01-03-17	3.4	21	VM	5.5	CS	14.3	0
4-5	01-03-29	3.4	18-20	VM	5.5	CS	16	0
6	01-04-26	3.5	20	VM	6	SS	23.2	0
7	02-06-16	4.7	30	VM	6	SS	26	0
8	02-06-16	4.7	24	OVM	3.8	SS	26	0
9-10	02-06-21	4.7	20.5-28	VM	5-6.5	SS	29	0
11	02-09-29	5.0	22	OVM	5	SS	30	0
12	02-11-04	5.0	35.5	OVM	5	SS	24	0
13-17	02-11-03	5.0	20.5-24	OVM	4-5	SS	18	24
18-21	03-05-03	3.5	7.7-9.7	OVM	5.5	SS	21	0
22-27	03-05-03	1.5	2.6-4.0	VM	5.5	SS	21	0
28-32	03-05-02	1.5	2.7-4.3	VM	4	SS	21	0
33-38	03-05-06	1.5	2.9-4.1	OVM	4	SS	21	0
39-44	03-05-07	1.5	2.8-4.5	OVM	5.5	SS	21	0
45-49	03-05-11	5.6	27.5-35	OVM	4-5	SS	25	24
50-51	03-05-12	5.6	18-35.3	OVM	5.5	SS	22	0

注:VM-生殖孔前3~6块腹骨板之间的腹中线;OVM-偏离腹中线1~4 cm;CS-交叉缝合法;SS-一针一结缝合法。

Note: VM - ventral midline, 3 to 6 ventral scutes anterior to the genital pore; OVM - 1 to 4 cm off the ventral midline; CS - cruciate suture; SS - single sutures.

2 结果

2.1 中华鲟性别鉴定情况

在本实验的切口长度下,肉眼都能观察到中华鲟腹腔中的性腺,但所有1.5龄中华鲟的性腺,位于不易观察到的深处,由较短的系膜附着在靠近背部的体壁上,此时需从切口处将体壁与肠道撑开,才能观察到性腺,而且性腺只是一条透明略呈白色的带状物,肉眼看不出是卵巢还是精巢。

3.4~5.6龄的大部分个体中,首先显露出的是附着在性腺上的脂肪,而性腺深藏在脂肪之下,此时需扒开脂肪才能观察到性腺,特别是精巢在外观上常与脂肪相混,需仔细辨认。部分3.4~5龄的中华鲟,脂肪缺乏或较少,观察性腺时遇到与1.5龄类似的情况。只有5~5.6龄的部分雌性个体卵巢发育较好,拨开切口后卵巢即显露,容易观察。

3.4~3.5龄的中华鲟,绝大部分性腺肉眼仍分辨不出雌雄,在10尾受试鱼中,只检出2例卵巢。4尾4.7龄的受试鱼中,检出卵巢2例、精巢1例,另有1尾不能通过肉眼确切地断定其性别。所有5.0~5.6龄(共14尾,体重18~

35.5 kg)的中华鲟性腺两性分化明显,均能通过肉眼进行性别鉴定,因此是通过肉眼进行性别鉴定的较佳时期。肉眼检出的卵巢呈淡黄色,表面质地较软,富有皱折和分叶,卵粒隐约可见;精巢白色,表面丰满光滑,质地较硬,呈棒状或块状。附着在精巢上的脂肪所占的比例比卵巢大。

2.2 手术后中华鲟的表现、存活及伤口愈合情况

手术架上的中华鲟,包括没经麻醉的较大个体和经过麻醉的较小个体,一般表现较安静,偶有挣扎,10 min内常挣扎1~2次,但对手术操作影响较小。手术完成,受试鱼进入暂养池后,先后有2尾受试鱼出现短暂的仰卧现象,其他都能立即恢复正常游动状态,但由于水环境的改变,3~10 d后才见摄食;不经暂养直接放回原培育池的受试鱼,没有观察到活动异常的情况。

51尾受试鱼中,发生3尾死亡,其余48尾均顺利康复,存活率94.1%。在手术后数月至2年多的群体养殖过程中,偶发死鱼,但尚未发现带PIT标志或腹部疤痕的死亡鱼体。3尾受试鱼的死亡都发生在暂养过程中,包括第1尾受试鱼(3.4龄)(手术日期2001-03-16),估计是原有外伤加之手术不够熟练又造成严重的尾部外伤所致,暂养10 d

后死亡;另1尾4.7龄受试鱼(手术日期2002-06-21)由暂养池转入原培育池后可能由于体质较弱、暂养池与原培育池之间温差太大,于次日死亡;另有1尾1.5龄(手术日期2003-05-03)受试鱼暂养8d后死亡,死亡时体表呈花斑状,缝合线已全部断开,原因不明。

在48尾已康复受试鱼的伤口愈合过程中,观察到伤口四周发红、伤口处长出绒毛状物以及缝合线提前断裂等现象。伤口发红主要发生在切口较长、缝针较多的受试鱼,缝针较少的受试鱼常在针眼四周出现小范围的皮肤发红现象。2001年3月进行手术的5尾受试鱼(编号1-5),术后7-11d,返回原培育池前,可见伤口处长出灰色的绒毛状物,将伤口遮盖,难以与鱼体组织剥离,此时伤口并未完全愈合。这5尾受试鱼伤口缝合时全部采用了交叉缝合法,缝合线在术后5-10d内部分或全部提前断裂,伤口的中部微呈张开

状,伤口愈合相当缓慢,但最终能愈合;其余43尾受试鱼均采用一针一结缝合法,它们的伤口在愈合过程中,只偶见1-2根缝合线提前断裂的现象,在伤口即将愈合或愈合后,检查发现,缝合线已先后断开、消失,不需拆线。

表2为受试鱼的伤口愈合时间。经比较,发现伤口愈合的速度与水温、切口长度有关。编号为1-5和13-44的受试鱼,手术时水温14.3-21℃,伤口愈合时间为21-40d;其他受试鱼的水温22-30℃,伤口愈合时间15-27d,说明在14.3-30℃水温范围内,水温越高,伤口愈合越快。编号为8、11-17、28-38和45-49的受试鱼,切口长度为3.8-5cm,伤口愈合时间为15-27d;其他各受试鱼的切口长度5-7.5cm,伤口愈合时间21-40d,说明切口越短,伤口愈合越快。

表2 中华鲟腹腔外科手术术后观察到的伤口愈合时间

Table 2 Time observed for incisions to heal after surgery in Chinese sturgeon

实验鱼编号 Fish No.	1-5	6-7, 9-10	8, 11-12	13-17	18-27	28-38	39-44	45-49	50-51
愈合时间/d Time to heal	30-40	21-27	15-20	22	23-30	21-27	25	15	22

3 讨论

3.1 关于鲟鱼类性别鉴定

鲟鱼类没有明显的第二性征,目前,其性别鉴定方法主要有性别DNA鉴定法^[7]、内分泌学检测法^[1]、超声波技术探测法^[8,12]、管道镜(bore scope)观察法^[9]和外科手术性腺检查法^[1-2]。其中,外科手术性腺检查法可以兼顾性腺取材的目的,不需要特殊的仪器设备或试剂,而且一次性操作即可完成性别鉴定和分池培育,是目前人们在生产中普遍采用的方法,其缺点是对鲟鱼产生不同程度的伤害,特别是存在致死风险,要求操作者有一定的熟练程度。通过外科手术性腺检查法鉴定性别,有一个时机的问题,年龄(体重)太小,性腺尚未发育到肉眼可分辨性别的程度;年龄太大,不利于及早分池培育,而且人工操作(如转运等)的难度增加。本研究结果显示,4龄以下的养殖中华鲟不适合进行性别鉴定,5-5.6龄(18-35.5 kg)的养殖中华鲟是进行性别鉴定的较佳时期,所有的性腺能肉眼分辨雌雄。在养殖高首鲟,进行这项操作的时机是3-4龄(7-9 kg)^[12]。

3.2 低龄中华鲟外科手术技术要点和存活条件

- 1) Webb F A H, Feist G W, Foster E P, et al. Classification of sex and stage of maturity white sturgeon (*A. transmontanus*) using blood plasma and mucus indicators [R]. 4th International Sturgeon Symposium, Oshkosh, Wisconsin USA, 2001, July 8-13.
- 2) O'Brien R O, Paul - Murphy J, Steingraeber M. Ultrasonographic gender determination in the paddlefish *Polyodon spathula* [R]. Midwest Fish and Wildl Conf Abstr Milwaukee. WI. USA. 1997.

实验表明,对于体重2.6-35.5 kg的中华鲟,按照本实验的技术要点,施以腹腔外科手术并完成性腺检查和性腺组织取材,是安全可靠的,手术成功率94.1% (48/51)。这些技术要点主要包括手术时水温14.3-30℃,切口位于腹中线或偏离腹中线1-4 cm,切口长3.8-7.5 cm(体重10 kg以上)或4-5.5 cm(体重2.6-9.7 kg),性腺取材约0.5 cm³,切口采用医用丝线行交叉缝合或一针一结缝合,离池后的全程操作时间20-30 min。

在本实验中,下刀部位未经消毒,操作完毕后如直接放回培育池,受试鱼也能正常恢复。Wooster等^[10]认为,用消毒剂擦洗下刀部位可能有损于鱼的皮肤,反而加重皮肤感染。本实验手术后鲟鱼不经“清水”暂养而直接返回原培育池,减少了手术前后环境条件的变化,可以避免第二次转运操作,可能更利于鲟鱼的存活。

在外科手术中,较短的切口无疑有利于伤口愈合,这在本实验中也已观察到。但对于年幼的鲟鱼,要完成性腺检查、性别鉴定和性腺取材,切口长度不能过短,国外鲟鱼专家在进行高首鲟(*A. transmontanus*)性别鉴定时认为采用2.5-3.7 cm长的切口较合适^[12],但中华鲟较其他许多鲟鱼个体为大,在实验中发现,对于中华鲟,如果采取这样的切口,就难以观察到处于早期发育中的性腺,更无法取到性腺组织材料。本实验中,对于体重2.6-9.7 kg的中华鲟,切口长度为4 cm以上。

关于缝合线。医用丝线价廉、易得,是人体及陆生哺乳动物常用的缝合材料,使用时产生的一种临床现象是伤口红肿,伤口愈合后留下针眼结节^[11-12]。实验观察,医用丝线能在中华鲟伤口愈合过程中自动清除,无需拆线;而缝合线过

早出现断裂可能是由于采取了交叉缝合法,鱼体的游动使交叉处缝合线的相互摩擦所致。

致谢:本实验得到长江水产研究所水生野生动物繁育救护中心李罗新、厦门市中华鲟繁育保护基地林炳德等同仁的大力协助,谨表谢忱。

参考文献:

- [1] Hochleithner M, Gessner J. The sturgeon and paddlefishes of the world: Biology and aquaculture [M]. Aqua Tech Publications, 1999.
- [2] Conte F S, Doroshov S I, Lutes P B, et al. Hatchery manual for the white sturgeon, *A. transmontanus* with application to other north American Acipenseridae [M]. Oakland. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 1988.
- [3] 曲秋芝,孙大江,赵明华,等. 史氏鲟取卵技术的研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(4): 94-96.
- [4] 曲秋芝,孙大江,马国军,等. 施氏鲟全人工繁殖研究初报[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 277-279.
- [5] 章龙珍,庄平,张涛,等. 人工养殖施氏鲟性腺发育的观察[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 321-327.
- [6] 四川省长江水产资源调查组. 长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究[M]. 成都:四川科学技术出版社, 1988. 92-93.
- [7] Van Eenennaam A L, Van Eenennaam J P, Medrano J F, et al. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon[J]. Journal of Heredity, 1999, 90(1): 231-233.
- [8] Moghim M, Vajhi A R, Veshkini A, et al. Determination of sex and maturity in *Acipenser stellatus* by using ultrasonography[J]. J Appl Ichthyol, 2002, 18(4-6): 325-328.
- [9] 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(4-6): 505-508.
- [10] Wooster G A, Hsu H-F, Bowser P R. A manual for nonlethal surgical procedures to obtain tissue samples for use in fish health inspections[M]. Massachusetts: NRAC Publication, 1993. 28-112.
- [11] 童赛雄,姚礼庆,徐俊华,等. 无菌条与丝线关闭手术切口的临床比较[J]. 上海医科大学学报, 1992, 19(5): 474-475.
- [12] 李树明,罗悠儒. 缝线及缝合方法对山羊手术创口愈合的影响[J]. 四川畜牧兽医医学院学报, 1999, 13(4): 70-72.

Surgical techniques of sex determination in young *Acipenser sinensis*

CHEN Xi-hua^{1,2}, WEI Qi-wei², ZHU Yong-jiu², YANG De-guo², LUO Gang², LIU Yun³

(1. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology of Agriculture Ministry of China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 3. Life Science College, Hunan Normal University, Changsha 410006, China)

Abstract: Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, is a large anadromous fish without apparent sexual dimorphism. Sexual maturity in males happened from 8 to 18 years and in females from 14 to 26 years. In the Yangtze River, the spawning migration route was cut in 1981 by the construction of the Gezhouba Dam and its spawning ground is now located below the dam. The artificial spawning has been performed since 1983. In 1997, the aquaculture of this species began on large scale in China, and the offspring at different ages has been grown since then. It is necessary to establish a technique to obtain the gonad tissue samples and quickly determine the sex in the young individuals. In this study, surgical procedures were used to inspect the gonads and obtain their tissue samples ($n=51$), at 1.5-5.6 years old and body weight 2.6-35.5 kg. It showed that the fish at the age of 5 to 5.6 years (18-35.5 kg BW) were good candidates for sexing because all of the gonads at that ages could be sexed by gross examination. When water temperature was 14.3-30 °C in the operation, the incision site was the ventral midline or 1-4 cm off the ventral midline; the incision was 4-5.5 cm long (2.6-9.7 kg BW) or 3.8-7.5 cm long (13.5-35.5 kg BW); about 0.5 cm³ gonad tissue was taken; the incision was closed by cruciate suture or single sutures using silk thread, and the time for operation out of tank was 20-30 min; the gonad could be examined grossly and sampled, and 94.1% (48/51) animals survived, with the incisions healing in 15-40 d and the suture material clearing away. Under the conditions above, the incision healed faster when water temperature was higher and the incision was shorter with single sutures pattern.

Key words: *Acipenser sinensis*; cultured; surgery; sex determination

Corresponding author: WEI Qi-wei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn