

文章编号: 1674-5566(2012)04-0549-05

## 唇鲮肌间小骨的骨化过程

吕耀平<sup>1</sup>, 陈洁<sup>1</sup>, 鲍宝龙<sup>2</sup>, 黄佩佩<sup>1</sup>

(1. 浙江省丽水学院生态学院, 浙江 丽水 323000; 2. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 利用整体骨骼染色的方法, 对唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 早期发育阶段肌间小骨的形态发生进行观察, 结果表明: 在受精后 35 d(dpf) 之前, 除了肌间小骨, 唇鲮所有其它骨骼均已骨化完成。肌间小骨在 35 dpf (相应的体长为 23.67 cm) 开始在尾部区域骨化, 髓弓小骨首先出现在尾部的第 37~41 肌节之间, 脉弓小骨首先出现在尾部的 39~40 肌节之间, 然后依次往前; 到 62 dpf (相应的体长为 30.03 cm) 肌间小骨骨化全部完成。骨化过程中, 唇鲮肌间小骨是从简单的 I 型, 到 T 型, 再到 Y 型, 再分化为各种复杂形态。唇鲮肌间小骨出现的时机和形态形成规律与其它鲤科鱼类相似, 提示鲤科各亚科鱼类肌间小骨的骨化过程可能受同样的遗传机制控制。

**研究亮点:** 目前关于鲤科鱼类肌间小骨骨化模式的研究仅限于鲢亚科的鲢和模式动物斑马鱼, 通过比较其它亚科鱼类肌间小骨的骨化模式, 有助于探讨鲤科鱼类肌间小骨骨化模式的保守性。本文发现鲃亚科唇鲮的肌间小骨骨化模式与鲢非常相似, 提示鲤科肌间小骨的骨化过程可能受同样的遗传机制控制。

**关键词:** 唇鲮; 肌间刺; 骨化; 早期发育

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 属鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲃亚科 (Gobioninae)、鲃属 (*Hemibarbus*)。唇鲮具有体形优美、杂食性、适应性强、肉质细嫩、味道鲜美等优点, 是一种经济价值较高的中小型鱼类, 具有广阔养殖前景<sup>[1]</sup>。唇鲮的人工繁殖已成功突破, 规模化的唇鲮苗种培育技术体系也已建立<sup>[2-3]</sup>, 但和其它鲤科鱼类一样, 唇鲮也具有很多肌间刺, 不利于儿童食用和深度加工, 如果能培育出无肌间刺的唇鲮, 有利于扩大此鱼的养殖规模和经济效益。

肌间刺, 也称肌间小骨, 是指位于肌间隔中的膜性硬骨, 由肌隔结缔组织不经过软骨阶段直接骨化而成。肌间小骨包括髓弓小骨、脉弓小骨和椎体小骨 3 种类型<sup>[4-7]</sup>。不是所有鱼类都有肌间小骨, 在进化上, 只有真骨鱼类出现之后, 才有肌间小骨<sup>[8]</sup>。从骨舌鱼总目到骨鲮总目, 肌间小

骨从简单形态向复杂形态演化, 然后出现退化现象。肌间骨形态在鲤科的鲃亚科最复杂, 从雅罗鱼亚科开始退化, 到鲃亚科进一步退化, 到鲤形目的鳅科更加退化, 到鲈形目髓弓小骨完全消失, 而脉弓小骨仅留少数简单的 I 形; 脉弓小骨形态的复杂性要比髓弓小骨低<sup>[9]</sup>。可见, 在进化进程中, 唇鲮的肌间小骨形态复杂性是处于开始退化的阶段, 唇鲮中已不存在形态最为复杂的树枝形髓弓小骨。因此, 需要对唇鲮个体发育过程中肌间小骨骨化模式作进一步的了解。到目前为止, 对于真骨鱼类个体发生过程中肌间小骨骨化模式的研究非常少, 国内外仅对鲤、斑马鱼和鲢等极个别真骨鱼类个体发育过程中的肌间刺形态发生进行过调查<sup>[10-12]</sup>。鲢个体发育过程中肌间刺骨化时间在孵化后 40~60 d 之间, 其骨化模式是从尾部向躯体前部依次骨化, 各种形态的肌间刺小骨都是从最简单的 I 形发展而来的<sup>[12]</sup>。目

收稿日期: 2011-11-03 修回日期: 2011-12-13

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y3110477)

作者简介: 吕耀平 (1967—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为水生生物学。E-mail: yaopinglv@126.com

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

前国内外还没有关于唇鳍肌间小骨骨化过程的研究,本研究通过对鲤科鲟亚科唇鳍肌间小骨骨化过程的观察,来探讨鲤科中不同亚科鱼类肌间小骨骨化过程是否存在一定的保守性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

唇鳍仔、稚鱼样本取自浙江省丽水学院实训基地一鱼类良种场。唇鳍的繁殖在 2011 年 4 月上旬,筛选成熟度较好的亲鱼进行人工繁殖实验。从受精后 29 d (day of fertilization, dpf) 开始,每隔 3 d 取样一次,用体积分数为 10% 的甲醛固定,一直取到受精后 65 d,共取样 360 尾。

### 1.2 仔、稚鱼整体骨骼染色

主要依据柯中和等<sup>[12]</sup>的方法。先用去离子水漂洗唇鳍样本 3 次,每次 30 min,以去除甲醛;用 TBST (50 mmol/L Tris, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 体积分数为 0.1% 的 Triton X-100) 温和震荡漂洗 2 次,每次 30 min,用去离子水洗 30 min,以去除残余的 TBST 溶液;漂洗后转移至 1% KOH 溶液,加入 1% 体积的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在强光下照射,褪去色素,当标本表面出现气泡时终止反应,倒掉溶液,加去离子水漂洗;漂洗后转移至胰蛋白酶消化液 [100 mL 体系:65 mL 去离子水,35 mL 饱和硼酸钠盐 (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O) 上清液,1 g 胰蛋白酶] 消化直至头部肌肉组织透明;将透明的标本转移至 1% KOH 溶液中,滴加茜素红染色液 (1 g 茜素红溶于 100 mL 1% KOH 配置成染色液) 直至溶液颜色变成深紫色,染色过夜,用 1% KOH 溶液洗去组织中残余的染色液;依次经过 1% KOH:甘油 (3:1→1:1→1:3),100% 甘油漂洗,最后保存在含少许麝香草酚的甘油中。骨骼染色的标本用 OLYMPUS SZ61 体式解剖镜观察,记录肌间小骨的数目、位置及形态。并用 CCD 显微拍摄系统 (QIMAGING) 拍照,Adobe Photoshop CS3 软件进行图片的拼接修饰。

## 2 结果与讨论

### 2.1 唇鳍肌间小骨骨化时机

根据吕耀平等<sup>[9]</sup>对唇鳍肌间小骨的描述和本研究中的唇鳍仔、稚鱼骨骼染色结果,发现唇鳍只具有髓弓小骨和脉弓小骨,无椎体小骨。唇鳍肌间小骨有 I 型、卜型、Y 型、一端多分叉、两端

两分叉 5 种类型。髓弓小骨具有以上 5 种类型,而脉弓小骨较髓弓小骨形态简单,只有 I 型、卜型、Y 型 3 种类型。本实验所检测受精后 29 ~ 65 d (dpf) 唇鳍仔稚鱼体长范围在 15.72 ~ 32.08 mm 之间。32 dpf 及之前的唇鳍仔稚鱼没有发现肌间小骨存在;35 dpf 的唇鳍仔稚鱼样本中开始出现肌间小骨,肌间小骨出现时,其它骨骼包括主轴骨骼及附肢骨骼已经骨化完全 (图版 - 1),到 62 dpf,唇鳍不管是髓弓小骨还是脉弓小骨都已骨化完全 (表 1)。髓弓小骨首先出现在尾部的第 37 ~ 41 肌节之间,脉弓小骨首先出现在尾部的 39 ~ 40 肌节之间 (图版 - 2)。肌间小骨从尾部向前端依次出现,骨化顺序归纳为图 1。

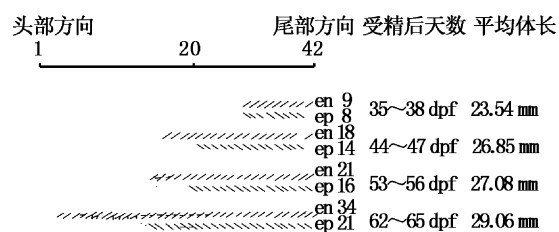


图 1 唇鳍肌间小骨的骨化顺序示意图

Fig. 1 Outline of ossifying process of intermuscular bones in *Hemibarbus Labeo*

en. 髓弓小骨; ep. 脉弓小骨。图中黑色直线上方数字表示肌节。

可能由于样本数较少的缘故,同一日龄组的个体大小和肌间小骨数目存在一定的差异,但总体上能反映出肌间小骨数目随着日龄和体长的增加而增多 (表 1),在唇鳍体长 15 cm 之前,不会出现肌间小骨,而在体长 35 cm 之后,肌间小骨已全部完成骨化 (图 2)。

唇鳍肌间小骨骨化从受精后 35 dpf 左右开始,到 62 dpf 左右骨化完成,在 35 dpf 时,其它骨骼包括主轴骨骼和附肢骨骼都已骨化完全 (图版 - 1)。这与在鲢和斑马鱼观察到的一样,肌间小骨骨化均是在其它骨骼骨化之后才开始骨化<sup>[11-12]</sup>。相比鲢肌间小骨骨化时间在 43 dpf 至 55 dpf,骨化时体长在 14.39 至 22.36 cm 之间<sup>[12]</sup>,唇鳍骨化时间提早,而肌间小骨全部骨化的时间要晚于鲢,这种个体发育过程肌间小骨骨化时间的延长,在一定程度上反映了肌间小骨的进化历史中,鲢亚科肌间小骨处于进化阶段,而鲟亚科已开始出现退化<sup>[9]</sup>。

表 1 唇鲮不同日龄体长及肌间小骨数目平均值

Tab. 1 The average standard length and average amount of intermuscular bone at different ages in *Hemibarbus labeo*

受精后天数	样本量	体长/mm	髓弓小骨数目	脉弓小骨数目	肌间小骨数
35	6	23.67(21.82~26.66)	22.2(0~44)	20.0(0~38)	42.2(0~82)
38	3	23.28(21.58~24.72)	10.0(0~19)	8.3(0~21)	18.3(0~40)
41	3	26.25(25.52~26.70)	22.3(13~30)	18.3(12~25)	40.7(25~55)
44	3	26.78(25.92~27.9)	23.7(12~43)	19.0(7~33)	42.7(23~76)
47	3	26.92(25.45~28.5)	48.0(34~61)	36.7(30~43)	84.7(64~104)
50	4	28.47(26.10~31.02)	50.5(27~73)	34.5(24~43)	85.0(51~116)
53	5	27.20(24.91~28.70)	37.8(22~52)	33.6(22~40)	71.4(44~91)
56	4	26.92(23.76~29.86)	45.0(3~74)	30.8(0~44)	75.8(3~118)
59	3	28.11(26.79~29.64)	49.7(43~56)	37.7(34~40)	87.3(77~95)
62	3	30.03(26.47~32.08)	65.0(46~76)	42.7(40~46)	107.7(86~122)
65	3	29.89(28.66~31.47)	71.3(66~76)	41.7(36~45)	113.0(110~117)

注:括号内数据表示范围。

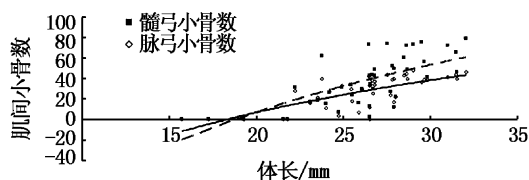


图 2 唇鲮肌间小骨与体长的变化关系图

Fig. 2 The relationship between the standard length and intermuscular bones of *Hemibarbus labeo*

en. 髓弓小骨; ep. 脉弓小骨。图中黑色直线上数字表示肌节,虚线表示髓弓小骨的增长趋势,实线表示脉弓小骨增长趋势。

## 2.2 肌间小骨骨化过程中的形态变化

唇鲮肌间小骨骨化过程中,会出现不同的形态。肌间小骨最初的形态是 I 型,其他的各种复杂形态都是从 I 型发展而来,髓弓小骨的最初形态都是没有分叉的 I 型(图版-3),在 62 dpf 仔鱼躯体左侧 18~22 肌节髓弓小骨已经分化成卜型及 Y 型髓弓小骨(图版-4)。脉弓小骨的最初形态也是未分叉的 I 型(图版-5)。在 65 dpf 仔鱼躯体右侧 24~27 肌节脉弓小骨已经分化成卜型及 Y 型脉弓小骨(图版-6)。I 型肌间小骨开始在主干的中间部分形成一个小分叉,I 型变成了卜型,随着体长的不断增大,肌间小骨主干部分与分支部分变长,最终变成了 Y 型,表明形态复杂的肌间小骨越晚出现。从唇鲮个体发育过程中观察到的肌间小骨从简单到复杂的形态变化规律,与鲢和斑马鱼个体发育中所报道的一样,均是从简单的 I 型,到卜型,再到 Y 型,再分化为各种形态<sup>[11-12]</sup>,这表明不同鲤科鱼类肌间

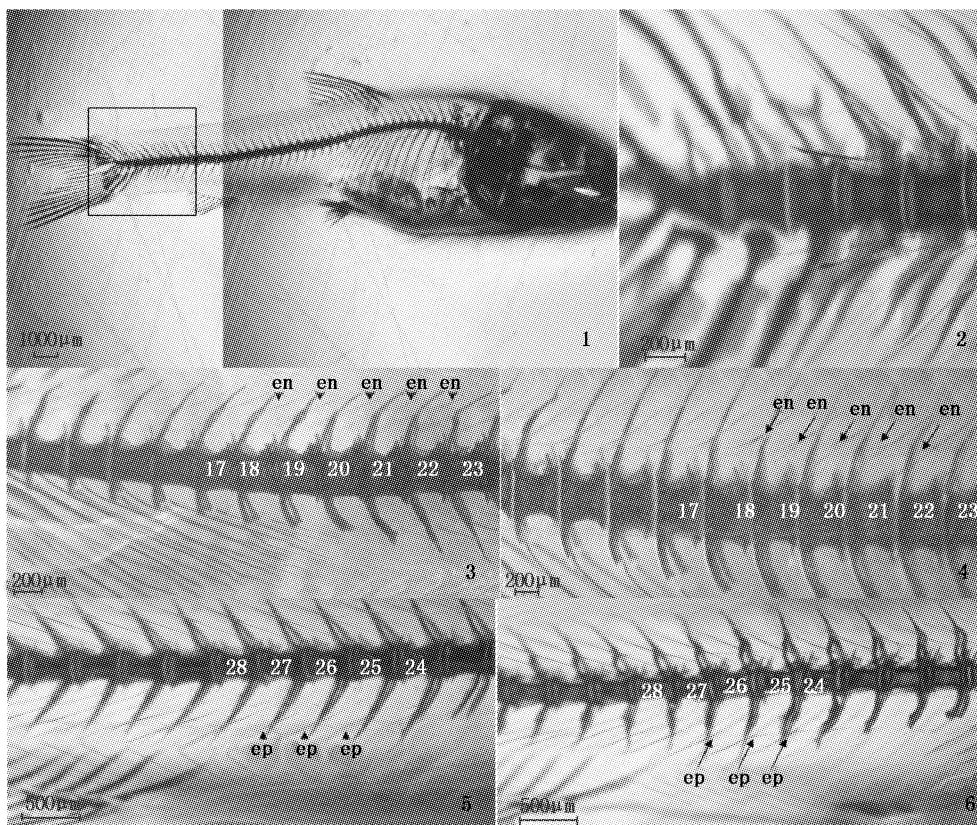
小骨(包括髓弓小骨和脉弓小骨)的骨化过程应该受同样的遗传机制控制。

总之,从个体发育角度研究鲮亚科鱼类唇鲮肌间小骨的骨化过程,充实了人们对于鱼类肌间小骨骨化过程的理解。鲤科不同亚科鱼类肌间小骨在骨化时机和骨化形态方面所表现出相似的规律,使我们可以利用模式动物斑马鱼开展复杂遗传机制的研究工作,并可有效推广至具有重要经济价值的鲤科鱼类,包括具有重要养殖价值的唇鲮。

## 参考文献:

- [1] 吕耀平. 唇鲮 1 龄鱼和 2 龄鱼形态特征参数及其相关性比较分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(2): 65-71.
- [2] 冯晓宇, 杨仲景, 郭水荣, 等. 唇鲮人工繁殖和鱼苗培育初步研究[J]. 淡水渔业, 2006, 36(6): 58-60.
- [3] 徐伟, 李池陶, 耿龙武, 等. 乌苏里江唇鲮的全人工繁育[J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 550-555.
- [4] 孟庆闻, 苏锦祥. 白鲢的系统解剖[M]. 北京: 科学出版社, 1960: 44-46.
- [5] 孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. 鱼类比较解剖[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 102-103.
- [6] 董在杰, 黄代中, 李丽娟, 等. 几种常见鲤科鱼类肌间刺的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 425-429.
- [7] 蒋燕, 杨琳琳, 鲍宝龙. 低等真骨鱼类的椎体小骨[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(4): 493-496.
- [8] PATTERSON C, JOHNSON G D. The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes [J]. Smithsonian Contribution to Zoology, 1995, 559: 1-85.
- [9] 吕耀平, 鲍宝龙, 蒋燕, 等. 低等真骨鱼类肌间骨的比较分析[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 425-429.

- [10] 秉志. 幼鲤大侧肌肌隔骨针的观察[J]. 动物学报, 1962, 14(2): 175-178.
- [11] BIRD N C, MABEE P M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (*Ostariophysi: Cyprinidae*) [J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 228(3): 337-357.
- [12] 柯中和, 张炜, 蒋燕, 等. 鲢肌间小骨发育的形态学观察[J]. 动物学杂志, 2008, 43(6): 88-96.



图版 唇鲮早期发育过程中肌间小骨的分布及形态分化

**Plate Distribution and morphological specification of intermuscular bones during early development in *Hemibarbus labeo***

1. 38 dpf 唇鲮体长 21.58 mm 染色结果, 红色信号表示骨骼已经骨化; 2. 图 1 方框区域放大照片, 箭头指示首先出现的脉弓小骨, 位于 39 和 40 肌节之间; 首先出现的髓弓小骨位于 37~41 肌节之间; 3. 无尾箭头指示 18~22 肌节 I 型髓弓小骨尚未开始分叉; 4. 箭头指示 18~22 肌节 I 型髓弓小骨开始分叉形成卜型及 Y 型小骨; 无尾箭头指示 24~27 肌节 I 型脉弓小骨尚未开始分叉; 5. 箭头指示 24~27 肌节 I 型脉弓小骨开始分叉形成卜型及 Y 型小骨; 6. 50 dpf 仔鱼, 第 9~15 肌节 I 型髓弓小骨(箭头指示)。

## The ossificational process of the intermuscular bones in *Hemibarbus labeo*

LÜ Yao-ping<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>1</sup>, BAO Bao-long<sup>2</sup>, HUANG Pei-pei<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Lishui University, Lishui 323000, Zhejiang, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology, Certified by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** To further understand the ossificational process of intermuscular bones in fishes from Cyprinidae, an important farming fish *Hemibarbus labeo* was investigated in this study. Intermuscular bones of *H. labeo* at different developmental stages were stained with alizarin red. Before 35 dpf (days post fertilization), all bones in *H. labeo* were ossified except for intermuscular bones. Since 35 dpf, intermuscular bones in tail area begun ossification in 23.67 cm standard length *H. labeo*. The ossified epineurals were observed in the myoseptums from 37<sup>th</sup> to 41<sup>th</sup> myotome, and the ossified epipleurals was only found between 39<sup>th</sup> to 40<sup>th</sup> myotome. As *H. labeo* was developing, ossified intermuscular bones were gradually observed in the myoseptums close to the head. Till to 62 dpf, all intermuscular bones were found ossified in *H. labeo* with 30.03 cm standard length. In addition, the primary morphology of intermuscular bone was type I, and ossified intermuscular bones with more complicated morphology were gradually forming from the type I during ossifying process. On the whole, the timing of intermuscular bone initial ossification and the forming process of complex morphology in *H. labeo* were very similar to that in other species in Cyprinidae, indicating conserved genetic mechanism control of ossification of intermuscular bones might exist in Cyprinidae.

**Key words:** *Hemibarbus labeo*; intermuscular bone; ossification; early development