

文章编号: 1674 - 5566(2014)01 - 0058 - 06

瓯江彩鲤肌间小骨的骨化模式

吕耀平¹, 周晨晨¹, 杨丽美¹, 鲍宝龙²

(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: 分别利用形态解剖和整体骨骼染色的方法, 对瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*) 成鱼肌间小骨的形态、分布, 以及仔、稚鱼肌间小骨的形态发生和出现进行观察。结果表明, 瓯江彩鲤肌间小骨有 I 形、卜形、Y 形、一端多叉形、两端两叉形、两端多叉形和树枝形 7 种类型, 肌间小骨越靠前端形态越复杂。肌间小骨出现前, 其他骨骼均已骨化完成, 肌间小骨在 32 dpf (day past fertilization) 首先出现在尾部, 然后往前依次出现, 到 53 dpf 全部出现。各种复杂形态的肌间小骨均是从 I 形发展而来。经比较, 鲤科不同亚科鱼类肌间小骨在骨化时机和骨化形态方面具有相似的形态发生规律, 为今后研究肌间小骨发生的分子机制提供了形态学基础。

研究亮点: 首次描述了瓯江彩鲤肌间小骨发生过程, 填补了鲤科鲤亚科肌间小骨骨化过程的空白, 并通过比较鲤科不同亚科间肌间小骨的骨化过程, 发现鲤科鱼类肌间小骨骨化模式高度保守, 为今后开展肌间小骨遗传机制研究打下了扎实的基础。

关键词: 瓯江彩鲤; 肌间小骨; 骨化; 形态; 发育

中图分类号: S 917

文献标志码: A

肌间小骨是指位于脊椎骨两侧肌间隔中的硬骨小刺, 又称肌间刺, 由肌隔结缔组织直接骨化而成。按肌间小骨附着位置可分为 3 类: 髓弓小骨、椎体小骨和脉弓小骨^[1-2]。肌间小骨仅存在于真骨鱼类中, 低等真骨鱼类则普遍存在^[1,3]。鲤科 (*Cyprinidae*) 鱼类作为我国主要的淡水养殖对象, 在我国得到广泛的养殖, 然而鲤科鱼类肌间小骨数目多, 形态复杂, 且各亚科间出现分化现象^[4]。迄今为止, 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, 国内外关于真骨鱼类肌间小骨个体发育的报道也主要集中在鲤科鱼类, 如鲤 (*Cyprinus carpio*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 和鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 等^[5-8], 分别属于鲤亚科 (*cyprininae*)、鲃亚科 (*Danioninae*)、鲃亚科 (*Gobioninae*) 和鲢亚科 (*Hypophthalmichthyinae*), 但对于鲤鱼肌间小骨发育过程中形态变化的详尽描述及其规律报道很少。瓯江彩鲤 (*Cyprinus*

carpio var. *color*) 与鲤同属于鲤科鲤亚科, 早在 1200 年前, 瓯江彩鲤已经在我国开始养殖。近年来随着瓯江彩鲤人工繁殖以及苗种培育技术普及^[9-10], 其养殖范围不断扩大。但是瓯江彩鲤也存在肌间小骨, 阻碍了它进一步推广及深加工。本文将瓯江彩鲤为研究对象, 对其肌间小骨发育过程中的形态变化进行详细地观察和描述, 以填补鲤科鲤亚科肌间小骨骨化过程的空白, 探讨鲤科各亚科鱼类肌间小骨骨化过程是否存在一定的保守性, 也为今后揭示鲤科鱼类肌间小骨发生的分子机制提供更加详实的形态学资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

瓯江彩鲤成鱼及仔、稚鱼样本来自浙江省龙泉瓯江彩鲤原种场。2013 年 5 月初, 挑选体健无病害、全身光洁、个体重在 1.5 kg 以上, 3 龄的亲鱼进行人工繁殖, 从受精后 14 d (day past

收稿日期: 2013-09-03 修回日期: 2013-10-19

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y3110477); 浙江省大学生科技创新项目 (2013R429027)

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

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

fertilization, dpf) 开始,每隔 3 天取样一次,每次 20 尾,用体积分数为 10% 的甲醛固定,一直取到 74 dpf。

1.2 成体瓯江彩鲤肌间小骨观察方法

将 -20℃ 冷冻保存的瓯江彩鲤成鱼放置室温解冻,随后放入高压灭菌锅,0.05 ~ 0.10 MPa, 121 ℃ 蒸 5 min 取出,待降至室温后,用镊子从头至尾分别取出髓弓小骨和脉弓小骨,并逐次排好,然后用 DSC-WX200 索尼数码相机拍照,记录成体肌间小骨的分布及形态。肌间小骨的形态分型采用吕耀平等^[4]的标准,为了便于描述肌间小骨的分布和形态,将肌间小骨按照体内的顺序依次用阿拉伯数字编号。

1.3 仔、稚鱼茜素红骨酪染色程序

参照柯中和等^[8]的方法。用蒸馏水漂洗固定好的仔、稚鱼样本以去除甲醛;用 TBST(1 L 体系:6 g Tris, pH 7.4; 8.775 g NaCl, 1 mL Triton X-100)温和漂洗,进一步去除残留甲醛和样本脂肪组织;紧接着转移到含 1% 体积 H₂O₂ 的 KOH 溶液,强光照射以去除色素;待色素去除后,用蛋白酶液[100 mL 体系:65 mL 去离子水,35 mL 饱和硼酸钠盐(Na₂B₄O₇ · 10H₂O)]消化肌肉组织,直至鱼体变透明。将透明的样本放入滴加有茜素红的 1% KOH 溶液,直至头骨染成深红色为止,最后经过甘油梯度脱水,保存在加有少许麝香草酚的甘油中。染色的样本用 OLYMPUS SZ61 体

式解剖镜观察,记录肌间小骨在瓯江彩鲤仔、稚鱼体内的数目、位置及形态。用 CCD 显微拍摄系统(QIMAGING)拍照,Adobe Photoshop CS4 软件进行图片的拼接、修饰。

2 结果

2.1 瓯江彩鲤肌间小骨的形态、分布和数目

鲤形目没有椎体小骨^[11],在瓯江彩鲤中也只发现髓弓小骨和脉弓小骨两种肌间小骨。瓯江彩鲤肌间小骨有 I 形、卜形、Y 形、一端多分叉、两端两分叉、两端多分叉和树枝形 7 种类型。髓弓小骨不具有两端两分叉型,而脉弓小骨较髓弓小骨形态简单,只有 I 形、Y 形和两端两分叉 3 种类型(图版 I)。

成体瓯江彩鲤两侧的肌间小骨的分布情况见表 1(以表 1 中 II 号样本为代表)。在所有髓弓小骨中,从前到后排列,第 1 到第 8 枚形态较复杂,有树枝形、两端多叉形和一端多叉形,第 9 到第 22 枚主要为 Y 形;第 22 枚往后的主要为 I 形,少数个体最后 1 ~ 2 枚髓弓小骨末端有很小的分支。第 1 到第 4 枚脉弓小骨主要为 Y 形,后面的脉弓小骨主要为 I 形。左右侧各种形态的肌间小骨分布大体相同。瓯江彩鲤肌间小骨平均数目为 90 枚,其中髓弓小骨为 62 枚,脉弓小骨为 28 枚(表 1)。

表 1 成体瓯江彩鲤各种形态肌间小骨分布的统计

Tab. 1 The statistics of various intermuscular bones distribution in adult *Cyprinus carpio* var. *color*

类型	样本号	体侧	各种形态类型的肌间小骨分布						
			树枝形	两端两叉形	两端多叉形	一端多叉形	Y 形	卜形	I 形
髓弓小骨	I	左			4 ~ 12		13 ~ 19, 21 ~ 22		1 ~ 3, 20, 23 ~ 31
		右			4 ~ 13		14 ~ 21		1 ~ 3, 22 ~ 31
	II	左	4		5 ~ 8	2	9 ~ 22		1, 3, 23 ~ 31
		右	3		4 ~ 8	2	9 ~ 20		1, 21 ~ 31
	III	左			4 ~ 9	19 ~ 21	10 ~ 18, 31		1 ~ 3, 22 ~ 30
		右			2 ~ 10		11 ~ 17, 31	19 ~ 20	1, 18, 21 ~ 30
脉弓小骨	I	左					1 ~ 3, 6		4 ~ 5, 7 ~ 14
		右					2 ~ 5		1, 6 ~ 14
	II	左					1 ~ 3		4 ~ 14
		右		13 ~ 14			1 ~ 4		5 ~ 12
	III	左					2 ~ 5		1, 6 ~ 14
		右					4 ~ 6, 14		1 ~ 3, 7 ~ 13

注:编号为 I、II 和 III 的成体瓯江彩鲤体长分别为 19.24、21.76 和 21.45 cm,表中阿拉伯数字为肌间小骨从前往后的编号。

2.2 瓯江彩鲤肌间小骨骨化时机

检测的 14 ~ 74 dpf 瓯江彩鲤仔稚鱼体长范围在 11.86 ~ 22.46 mm 之间。28 dpf 及之前的瓯江彩鲤仔、稚鱼没有发现肌间小骨存在,肌间小骨出现之前,其它骨骼包括主轴骨骼及附肢骨骼已经骨化完全(图版 II - 1);32dpf 的瓯江彩鲤仔

稚鱼样本中开始出现肌间小骨,到 53 dpf,肌间小骨骨化完全(表 2)。瓯江彩鲤髓弓小骨和脉弓小骨骨化时间接近,髓弓小骨首先出现在尾部的第 33 ~ 34 肌节之间,脉弓小骨首先出现在尾部的第 32 ~ 33 肌节之间(图版 II - 2)。肌间小骨从尾部向前端依次出现,骨化顺序见图 1。

表 2 瓯江彩鲤不同日龄体长及肌间小骨数目平均值
 Tab.2 The average standard length and average amount of intermuscular bone at different ages in *Cyprinus carpio* var. *color*

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
32	5	13.79(12.38 ~ 15.54)	1.6(0 ~ 4)	0.6(0 ~ 2)	2.2(0 ~ 4)
35	5	15.28(14.52 ~ 16.02)	14.4(2 ~ 21)	7.0(1 ~ 10)	21.4(3 ~ 31)
38	5	16.00(14.74 ~ 17.04)	26.2(14 ~ 38)	15.4(10 ~ 20)	39.6(24 ~ 58)
41	5	16.99(16.42 ~ 17.42)	45.8(31 ~ 56)	22.2(16 ~ 27)	68.0(47 ~ 83)
44	5	17.17(16.52 ~ 17.94)	56.6(44 ~ 63)	21.0(16 ~ 26)	77.6(60 ~ 87)
47	5	17.69(16.62 ~ 19.36)	56.8(50 ~ 62)	24.8(16 ~ 28)	81.6(68 ~ 90)
50	5	18.44(16.92 ~ 19.42)	60.4(56 ~ 62)	25.4(18 ~ 28)	85.9(74 ~ 90)
53	5	19.81(19.12 ~ 20.68)	61.2(58 ~ 62)	27.6(26 ~ 28)	88.6(86 ~ 90)

注:括号内数据表示范围。

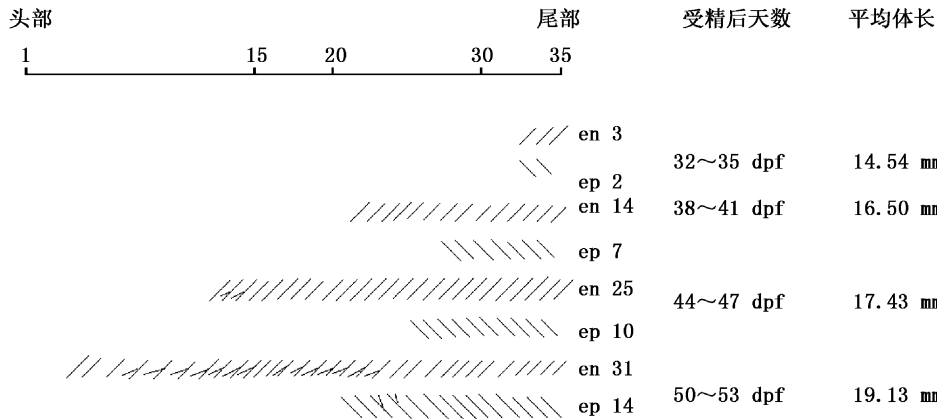


图 1 瓯江彩鲤肌间小骨的骨化顺序示意图

Fig.1 The sketch of ossification process of intermuscular bones in *Cyprinus carpio* var. *color*
 en. 髓弓小骨; ep. 脉弓小骨。图中黑色直线上数字表示肌节。

统计出现肌间小骨的瓯江彩鲤各日龄组平均体长、髓弓小骨平均数目、脉弓小骨平均数目和肌间小骨平均数目(表 2)。观察发现,瓯江彩鲤髓弓小骨与脉弓小骨骨化开始与结束时间基本一致,从 32 dpf 开始,其中最小体长 12.38 mm,到 53 dpf 骨化完成,其中最大体长 20.68 mm,肌间小骨数目随着日龄和体长的增加而增多(图 2)。

2.3 肌间小骨骨化过程中的形态变化

瓯江彩鲤肌间小骨骨化过程,随着日龄和体长增加,肌间小骨形态会变得复杂。肌间小骨最

初的形态是 I 形,其他各种复杂肌间小骨都是从 I 形发展而来,起初髓弓小骨与脉弓小骨的最初形

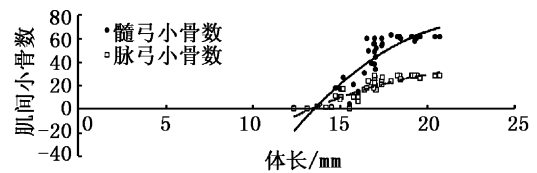


图 2 瓯江彩鲤肌间小骨数目与体长的变化关系图
 Fig.2 The relationship between the standard length and intermuscular bones of *Cyprinus carpio* var. *color*
 —表示髓弓小骨的增长趋势,---表示脉弓小骨增长趋势。

态都是没有分叉的 I 形(图版 II - 3, 5), 到了 44 dpf 仔鱼躯体右侧 16 ~ 17 肌节髓弓小骨已经分化成 Y 形髓弓小骨(图版 II - 4), 47 dpf 仔鱼躯体右侧 22, 24 肌节脉弓小骨已经分化成 Y 形脉弓小骨(图版 II - 6)。

3 讨论

吕耀平等^[4]认为鲤除卜形外, 具有 I 形、Y 形、一端多分叉、两端两分叉、两端多分叉和树枝形 6 种肌间小骨。鲤平均肌间小骨数目 99 枚, 和瓯江彩鲤 90 枚接近。肌间小骨分布上也与瓯江彩鲤类似, 鲤髓弓小骨第 4 到 13 枚形态较复杂, 有树枝形、两端多叉形和一端多叉形, 两端两叉型, 第 14 到 24 枚肌间小骨为 Y 型肌间小骨, 第 24 枚往后都是 I 型肌间小骨。脉弓小骨第 2 到第 5 枚为 Y 型, 后面的脉弓小骨为 I 型, 不论髓弓小骨还是脉弓小骨靠近躯体前部的肌间小骨形态较为复杂, 而尾部多以 I 型等简单型小骨为主。总的来说, 瓯江彩鲤与鲤在肌间小骨形态、分布和数目上并不存在明显差异。

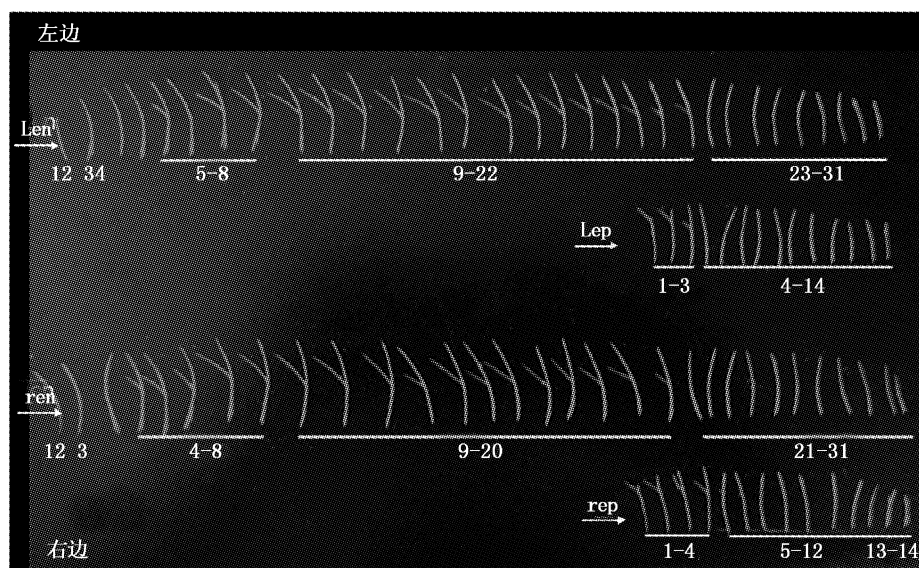
瓯江彩鲤肌间小骨骨化时间出现在其它骨骼骨化完成之后, 从尾部向前端依次出现, 与在斑马鱼、唇鲮和鲢观察到的一样^[6-8]。瓯江彩鲤肌间小骨骨化时间相比鲢(43 ~ 55 dpf) 和唇鲮(35 ~ 62 dpf) 肌间小骨骨化时间有所提早, 提示我们, 鲤亚科鱼类肌间小骨进化上可能要早于鲢亚科以及鲃亚科^[7]。肌间小骨形态由最简单的 I 型, 经过主干中间部分开叉形成卜型, 随着体长的增加, 小分叉逐步变成一端等长两分叉, 演化成 Y 型。瓯江彩鲤个体发育过程中观察到的肌间小骨从简单到复杂的形态变化规律, 与斑马鱼、唇鲮和鲢肌间小骨发生过程相同^[6-8]。虽然鲤科鱼类不同亚科之间, 肌间小骨骨化时间略有不同, 但其形态发生方式和从尾部向头部依次骨化的模式基本相同。

肌间小刺由肌间隔中的结蒂组织骨化而来,

被认为能增加游泳的能力^[12], 鲤科鱼类包括本研究的瓯江彩鲤的肌间小刺的骨化顺序均是从尾部向头部骨化, 这可能与鲤科鱼类的游泳方式主要依赖尾部摆动的推进方式有关。游泳方式明显不同的其它鱼类, 如鳗鲡, 其游动时力由身体前侧肌肉收缩, 依次往后传递, 其骨化方式是否类似鲤科鱼类从尾部依次向头部骨化, 还需今后进一步的研究。

参考文献:

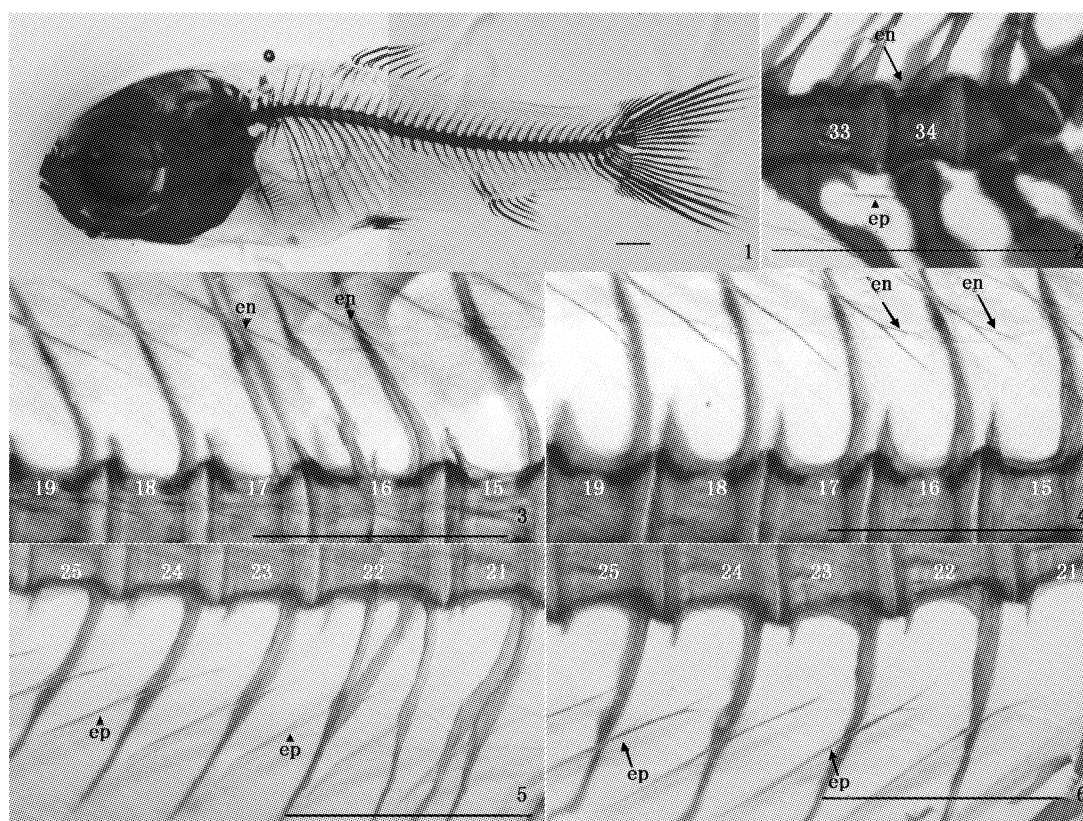
- [1] 孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. 鱼类比较解剖学[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 102 - 103.
- [2] 董在杰, 黄代中, 李丽娟, 等. 几种常见鲤科鱼类肌间刺的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 425 - 429
- [3] PATTERSON C, JOHNSON G D. The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes [J]. Smithsonian Contributions to Zoology, 1995, 559: 1 - 85.
- [4] 吕耀平, 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): 661 - 668.
- [5] 秉志. 幼鲤大侧肌肌隔骨针的观察[J]. 动物学报, 1962, 14(2): 175 - 178.
- [6] 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.
- [7] 吕耀平, 陈洁, 鲍宝龙, 等. 唇鲮肌间小骨的骨化过程[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 549 - 553.
- [8] 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.
- [9] 张时祥, 张良平, 金建勋, 等. 田鱼繁殖与选育研究[J]. 内陆水产, 2007, 32(1): 14 - 16.
- [10] 冯晓萍. 田鱼人工繁殖技术[J]. 科学养鱼, 2004(5): 8.
- [11] 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.
- [12] DANOS N, WARD A. The homology and origins of intermuscular bones in fishes: phylogenetic or biomechanical determinants? [J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2012, 106(3): 607 - 622.



图版 I 成体瓯江彩鲤肌间小骨分布

Plate I Distribution of intermuscular bones in adult *Cyprinus carpio* var. *color*

肌间小骨按照从头到尾的顺序依次排列,图中数字为肌间小骨的编号。len. 左侧髓弓小骨; lep. 左侧脉弓小骨; ren. 右侧髓弓小骨; rep. 右侧脉弓小骨。



图版 II 瓯江彩鲤早期发育过程中肌间小骨的分布及形态分化

Plate II Distribution and morphological specification of intermuscular bones during early development in *Cyprinus carpio* var. *color*

1. 28 dpf 瓯江彩鲤体长 11.27 mm 染色结果,红色信号表示骨骼已经骨化; 2. 32 dpf 瓯江彩鲤,箭头指示首先出现在尾部的髓弓小骨,位于 33 和 34 肌节之间,无尾箭头指示首先出现在尾部的脉弓小骨,位于 32 和 33 肌节之间; 3. 无尾箭头指示 16~17 肌节 I 型髓弓小骨尚未开始分叉; 4. 箭头指示 16~17 肌节 I 型髓弓小骨开始分叉形成 Y 型小骨; 5. 无尾箭头指示 22 和 24 肌节 I 型脉弓小骨尚未开始分叉; 6. 箭头指示 22 和 24 肌节 I 型脉弓小骨开始分叉形成 Y 型小骨。图中标尺为 500 μm 。

Ossification pattern of the intermuscular bone in *Cyprinus carpio* var. *color*

LÜ Yao-ping¹, ZHOU Chen-chen¹, YANG Li-mei¹, BAO Bao-long²

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

Abstract: To further understand the development process of intermuscular bones in teleosts, a modified bone clearing and staining experiment was conducted to investigate morphological development of intermuscular bone in *Cyprinus carpio* var. *color*. It is showed that intermuscular bone has different shapes including I type, one-end-unequal-bifork type, one-end-equal-bifork type, one-end-multifork type, two-end-biofork type, two-end-multifork type and tree-branch type. Generally, the morphological complexity of most intermuscular bones in anterior body was greater than that in posterior body. The initial ossification of intermuscular bone was observed in the posterior part of the body at 32 dpf, and then each of the intermuscular bones is ossified anteriorly, and the morphological characters at 53 dpf are the same as those found in adult fish. The primary morphology of intermuscular bone is I type, and more complicated morphology of ossified intermuscular bones are gradually derived from I type during ossification. These results suggest similar ossification pattern of intermuscular bones existing in Cyprinidae, which will also be helpful for us to further understand the molecular mechanism underlying intermuscular bone development.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *color*; intermuscular bone; ossification; morphology; development