科学通报 2015 年 第 60 卷 第 1 期：52 ~ 57
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

生长发育正常的无肌间刺草鱼突变体

徐晓锋, 郑建波, 钱叶青, 罗琛*

浙江大学生命科学学院, 杭州 310058
* 联系人, E-mail: luoc@zju.edu.cn

2014-06-23 收稿, 2014-08-22 接受, 2014-11-03 网络版发表
浙江省淡水养殖科技创新团队计划项目(2010R50026)资助

摘要 通过人工诱导雌核发育纯合二倍体使突变基因的性状得以表现, 筛选到无肌间刺草鱼突变体. 无肌间刺草鱼突变体的脊椎、附肢和整个形体都正常, 生长和运动也未见异常. 这些结果证明: (ⅰ) 肌间刺并不是草鱼身体支撑和运动所必需的; (ⅱ) 肌间刺的发育有不同于脊椎骨和附肢骨的发育遗传调控机制; (ⅲ) 用现代生物技术可以人工培育淡水主养鱼类的无肌间刺品种. 统计分析结果表明, 在雌核发育草鱼群体中无肌间刺草鱼突变体的比例极低, 提示草鱼肌间刺的发育可能受多个基因控制, 其调控机制及其复杂. 无肌间刺草鱼突变体为寻找和确定特异性调控鱼类肌间刺发育的关键基因提供了难得的实验材料.

关键词
草鱼
肌间刺
突变体
雌核发育

鱼的肌间刺(intermuscular bone)是分布于鱼类肌间隔中的硬骨小刺, 也称为肌间小骨. 我国的淡水主养鱼类, 如草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲤鱼、鲫鱼、鲂鱼、乌鳢等大多有肌间刺, 达不到国际市场上优质鱼类的品质要求. 培育无肌间刺的淡水主养鱼类品种是提高淡水鱼类商品品质和养殖经济效益, 发展我国淡水鱼类养殖业的重大任务.

目前对鱼类肌间刺的研究还限于形态、分布的描述, 以及对不同鱼类中肌间刺类型的比较分析[1~7]. 根据其在身体上所处的位置, 肌间刺可分为连接在髓弓的髓弓小骨(epineuralia bone)、连接在椎体的椎体小骨(epicentralia bone)和附着于腹肋或者脉弓的脉弓小骨(hypomeralia bone) 3类[1~8]. 不同鱼类中所具有的肌间刺类型存在差异[5,9~11]. 肌间刺的形状多种多样, 在不同鱼类中也存在差异[10~12]. 吕耀平等人[5]通过对低等真骨鱼类肌间刺形态进行的系统比较研究发现, 从低等到高等真骨鱼类, 肌间刺的形态出现从简单到复杂, 然后退化的演化现象, 在高等真骨鱼类则再无肌间刺形成. 这一现象提示鱼类的肌间刺可能是一种已经没有实际功能的进化痕迹器官. 肌间刺发育和形成的过程尚不清楚, 但认为是由肌隔的结缔组织通过膜性骨化发育而来, 不经历软骨模型阶段[8,13,14]. 柯中和等人[11]通过对鲢鱼肌间刺的系统观察, 发现肌间刺是在受精后43 d才在鱼的尾部开始出现, 然后才逐渐依次在前端区域形成, 55 d后才分布到整个鱼体上; 在肌间刺开始形成和骨化时, 鲢鱼的主轴骨骼和附肢骨骼都早已完全骨化. 斑马鱼的肌间刺的骨化也是在其他骨骼骨化之后才开始[15]. 这种发育时间上的显著差别提示鱼类肌间刺的发育可能有不同于脊椎骨和附肢骨发育的调控机制. 但迄今为止, 这些根据系统比较分析和发育时间分析所进行的肌间刺功能和调控机制的推测都还没有实验结果的证实.

鱼类的肌间刺隐藏在体内的肌肉组织中, 活体在外观上没有可资辨别的有无肌间刺个体的标记. 因此, 难以通过传统选育的方法获得无肌间刺的突变体, 以开展有关鱼类肌间刺的生物学功能和发育遗传调控机制的研究. 用遗传物质被破坏的异种鱼精子可以诱导两性生殖鱼类成熟卵子的雌核发育, 再通过染色体人工加倍即可能获得基因型纯合的雌

引用格式: 徐晓锋, 郑建波, 钱叶青, 等. 生长发育正常的无肌间刺草鱼突变体. 科学通报, 2015, 60: 52–57
Xu X F, Zheng J B, Qian Y Q, et al. Normally grown and developed intermuscular bone-deficient mutant in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 52–57, doi: 10.1360/N972014-00637

核发育二倍体. 在基因型纯合的雌核发育二倍体鱼中隐性突变基因所编码的性状得以表达而呈现突变表型[16,17]. 由于鱼类所产卵子数目巨大, 一次人工诱导雌核发育就可能获得多种不同的突变表型, 甚至多基因突变表型. 因此, 通过人工诱导雌核发育和对雌核发育纯合二倍体群体突变体的鉴别和筛选, 可能得到稀有的无肌间刺突变体. 为确定我国淡水主养鱼类肌间刺的发育是否有不同于脊椎骨和附肢骨的发育遗传机制, 肌间刺是否为这些鱼类正常生长发育所必需的结构, 我们选择草鱼这一我国淡水主养鱼类品种, 用不同地区、不同草鱼母本的卵子, 通过人工诱导雌核发育方法进行了长期大量的无肌间刺突变体的筛选工作, 得到了生长发育和生活能力正常的无肌间刺突变体草鱼, 证明了人工培育无肌间刺的淡水鱼类养殖品种是可能的.

1 材料和方法

(ⅰ) 实验材料. 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)取自湖南省湘阴县东湖渔场和湖滨渔场, 以及浙江省长兴县南杨渔场. 在繁殖季节按常规方法注射激素获得草鱼卵子和鲤鱼精子. 不同实验鱼基因组DNA微卫星扫描分析所用组织均为成体尾鳍.

(ⅱ) 雌核发育纯合二倍体鱼的获得和鉴定. 人工诱导草鱼雌核发育按照我们以前报道的方法进行[18]. 选择与草鱼杂交致死的鲤鱼精子, 经紫外线处理使其遗传失活后用于人工诱导草鱼卵子雌核发育. 鲤鱼精液用2~4倍体积冷Hank's (4℃)稀释, 在2支15 W紫外灯下照射45~50 min. 照射后在显微镜下检查确定精子活力. 成熟草鱼卵子排出后立即用遗传失活的鲤鱼精子激活其发育, 并在被激活后2 min在4℃进行冷休克处理12 min, 抑制其减数第2次分裂而使其染色体加倍, 获得雌核发育二倍体草鱼.

由于草鱼单倍体胚胎不能发育到孵化期, 鲤鱼精子与草鱼卵子杂交胚胎在尾芽期后出现发育障碍并最终死亡[18], 因此, 所得成活鱼苗即为雌核发育二倍体. 为确定雌核发育二倍体草鱼突变体中有无残存鲤鱼遗传物质存在, 用前期所筛选出的6对鲤鱼的多态性微卫星引物[19~21]对其基因组DNA进行了检测. 所用6对微卫星检测引物为MFW2, MFW4, MFW8, MFW22, MFW24和MFW26, 由生工生物工程(上海)股份有限公司(Sangon)合成, 其序列见参考文献[22]. 所用的*Taq*酶, dNTP以及PCR反应Buffer为日本TaKaRa公司产品, DNA marker pBR322为美国Fermentas公司产品. PCR扩增仪为美国Applied Biosystems公司的GeneAmp® PCR System2720热循环仪. PCR反应体系: 反应体积为20 μL, 反应混合液组成为10 × *Taq*酶缓冲液(2 μL), *Taq*聚合酶(1.0 U), dNTP(0.8 mmol/L), DNA模板(50 ng), Primer+(0.2 μmol/L), Primer−(0.2 μmol/L), $MgCl_2$(1.25 mmol/L), 加ddH_2O至反应体积为20 μL. PCR反应程序为: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 退火30 s (温度因引物而异), 72℃延伸30 s, 共30个循环; 72℃延伸2 min, 4℃保存. 各对引物的PCR反应退火温度见参考文献[21]. 扩增产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染显色. 聚丙烯酰胺凝胶显影后在凝胶成像系统中扫描、摄像和分析.

(ⅲ) 肌间刺活体检测. 雌核发育草鱼的肌间刺活体检测在X-射线透视仪上进行. 所用X-射线透视仪来自浙江大学紫金港校区校医院.

2 实验结果

2.1 通过人工诱导雌核发育获得无肌间刺草鱼突变体

为探索用人工诱导雌核发育方法是否能得到无肌间刺的纯合二倍体突变体, 我们先后多次用湖南和浙江地区不同草鱼母本成熟卵子进行人工诱导雌核发育制备雌核二倍体纯合草鱼. 在所获得的雌核发育草鱼群体满一龄后, 针对其个体大小、体型以及鳞片的分布和数目等性状进行观察分析. 在每一个来自同一母本的雌核发育二倍体群体中较多都出现了在大小、体型上差异明显的不同突变体(图1). 但对各个雌核发育草鱼群体中多条正常、畸形和小型全鳞雌核发育草鱼的解剖检测中没有发现无肌间刺突变. 大多数雌核发育草鱼群体中没有发现鳞片突变, 仅在一条来自浙江地区草鱼母本的287条雌核发育二倍体个体中发现了5条鳞片显著变大、数目变少、在鱼体背部体表的一些区域没有鳞片的散鳞突变个体(表1, 图2). 但不同散鳞雌核发育草鱼鳞片大小、数目和分布并不一致: 有的在躯干部分仅有显著变大、但排列规则的侧线鳞; 有的其他鳞片变大, 但侧线鳞变化不明显, 排列不规则(图2(a)~(d)). 鳞片大小、数目和分布的突变说明这些散鳞雌核发育草鱼在整个体表



图 1 一龄雌核发育草鱼不同个体在大小、体型上的差异比较. 照片中所示雌核发育草鱼来自同一母本、饲养在同一环境里

Figure 1 Size and morphological comparison among individuals of one-year old artificial gynogenetic grass carp. The artificial gynogenetic grass carp individuals shown in the image are siblings cultivated under the same condition

的鳞片钙化和分布调控机制上发生了变化.

由于鱼类鳞片的发育与骨骼发育一样都需要经历钙化的过程, 为确定体表鳞片大小、数目和分布的突变是否与体内肌间刺的突变相关, 我们在三龄时对该雌核发育草鱼群体中的部分全鳞个体和所有散鳞突变个体进行X-射线透视分析. 结果表明, 所有检测过的全鳞个体在其背部和腹部肌肉组织中都有细密、折光均匀, 容易分辨的肌间刺存在(图3(a)); 5条散鳞突变个体中4条有可分辨的肌间刺存在, 但那条侧线鳞巨大而排列规则的突变个体, 其肌肉中没有检测到可分辨的肌间刺, 仅在背部肌肉组织中可见分布间隔均匀, 比野生型个体中的肌间刺显著粗大(与脊椎骨的棘突相当), 折光不均匀的少量条纹(图3(b)). 这一观察结果说明, 在该无肌间刺草鱼突变体的背部肌肉组织中的某些成分可能发生了一定程度的钙化或者矿物化, 但没有发育为成型的肌间刺.

为确定无肌间刺草鱼突变体是否有未失活的鲤鱼遗传物质残存, 我们用鲤鱼的多态性微卫星引物对无肌间刺草鱼突变体的基因组DNA进行了多次重复的PCR扫描分析. 如图4所示, 6对鲤鱼的多态性微卫星引物在鲤鱼基因组上共检测到40个以上微卫星座位, 在对照草鱼和无肌间刺突变体草鱼基因组上都只检测到了2个在二者中相同的微卫星座位. 无肌

表 1 不同批次雌核发育二倍体草鱼中全鳞、散鳞及无肌间刺个体统计

Table 1 Number of full-scaled, scatter-scaled and intermusculer bone-deficient individuals in different gynogenetic grass carp groups

样品批次[a)]	总个体数	全鳞个体数	散鳞个体数	无肌间刺散鳞个体数	母本来源
1	138	138	0	0	湘阴东湖渔场
2	452	452	0	0	湘阴东湖渔场
3	124	124	0	0	湘阴望滨渔场
4	326	326	0	0	长兴南杨渔场
5	287	282	5	1	长兴南杨渔场
6	73	73	0	0	湘阴望滨渔场

a) 每一批次来自于同一个草鱼母本



图 2 野生型全鳞(a)与突变型散鳞雌核发育草鱼(b, c, d)

Figure 2 Wild type full-scaled (a) and mutant scatter-scaled (b,c,d) gynogenetic grass carp

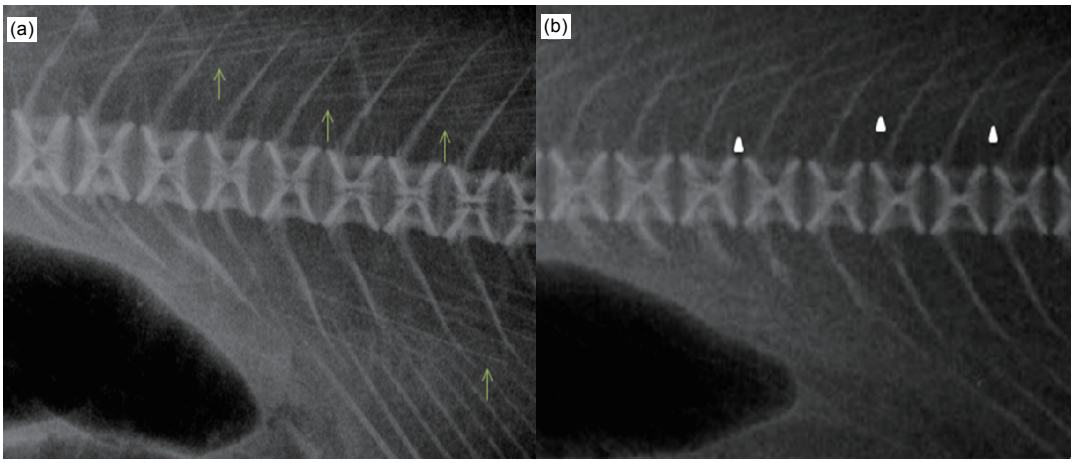


图 3 野生型(a)与无肌间刺突变型(b)雌核发育草鱼同一位置的X-射线透视图. (a) 中箭所示为细密、折光均匀的肌间刺; (b) 中箭头所示为粗疏、折光不均匀的条纹

Figure 3 X-ray image of wild-type (a) and intermuscular bone-deficient mutant (b) gynogenetic grass carp at the same position. Arrows indicate the concentrated and evenly-refracted intermusuclar bones. Arrowheads indicate the scattered and unevenly-refracted stripes

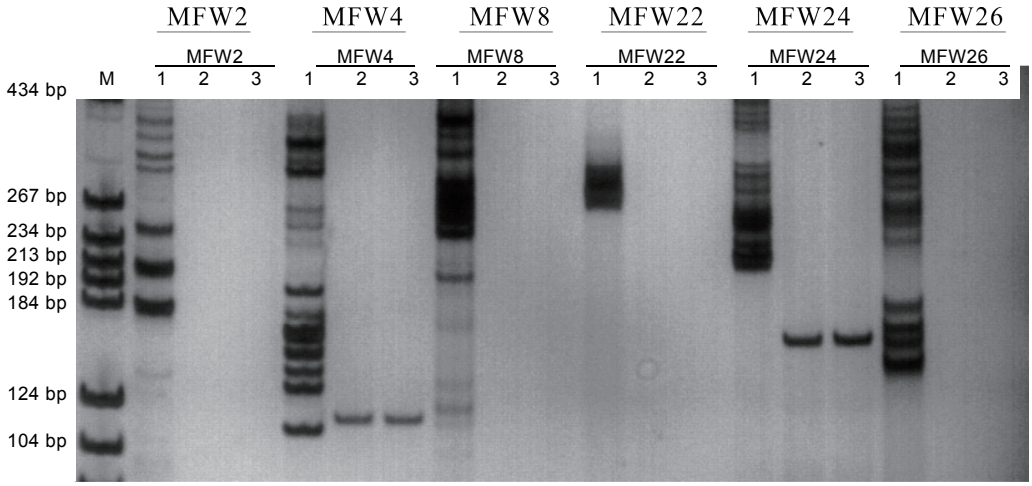


图 4 六对微卫星引物在无肌间刺草鱼突变体及其亲本基因组DNA上的扩增电泳图谱. 1, 鲤鱼; 2, 野生型草鱼; 3, 雌核发育无肌间刺草鱼

Figure 4 Electrophoretogram of PCR products amplified by 6 pairs of microsatellite primers in intermuscular-deficient mutant grass cap and its parents. 1, common carp; 2, wild-type grass carp; 3, intermuscular-deficient gynogenetic grass cap

间刺突变体的微卫星PCR产物检测电泳图谱与对照草鱼的完全相同而与鲤鱼的完全不同. 无肌间刺突变体的基因组DNA中没有检测到残存鲤鱼遗传物质存在, 说明无肌间刺草鱼突变体是草鱼本身的肌间刺发育调控突变基因纯合的结果, 而不是鲤鱼残存遗传物质干扰的结果.

2.2 无肌间刺草鱼突变体体型、附肢、脊椎以及生长都正常

除鳞片外, 无肌间刺突变体雌核发育草鱼外观上体型无异常, 尾鳍、背鳍、胸鳍、腹鳍和臀鳍也无异常(图2(c)). X-射线透视显示体内脊椎骨的发育和骨化也都正常(图3(b)). 这些性状的说明, 抑制肌间刺的发育和骨化没有对鱼脊椎骨和附肢骨骼的发育和骨化, 以及相关的鱼体的支撑和运动功能产生明显的影响. 在四龄时该突变体体重达到4500 g, 与对照的野生型全鳞雌核发育草鱼无明显差异, 说明其生长正常.

3 讨论

通过人工诱导雌核发育纯合二倍体使突变基因的性状得以表现, 我们发现了散鳞的雌核发育草鱼

突变体. 用X-射线透视方法从该突变体中筛选到了仅有少量不均匀的粗大折光条纹, 但没有成型的肌间刺的草鱼突变体. 无肌间刺草鱼突变体的脊椎骨和附肢骨都发育正常, 在外观上除鳞片突变外, 其体型和生长也都正常. 这些实验结果证明了草鱼肌间刺的发育和骨化有不同于脊椎骨和附肢骨的发育遗传调控机制, 肌间刺并不是草鱼支撑和运动所必需的结构. 这些结果也有力支持根据系统比较研究结果[5]所提出的观点: 鱼类的肌间刺可能是一种已经没有实际功能的进化痕迹器官. 因此, 通过现代生物技术可以人工培育淡水主养鱼类的无肌间刺品种.

但无肌间刺草鱼突变体出现的比例极低, 在所检测过的多个不同母本来源雌核发育草鱼群体中, 仅在一个群体的总共287条草鱼的5尾散鳞突变体草鱼中筛选出了1尾无肌间刺的突变体. 而所检测过的该同一母本来源的野生型全鳞和突变型散鳞雌核发育草鱼个体都有肌间刺. 这些观察结果提示, 草鱼肌间刺的发育可能受多个基因调节控制. 在无肌间刺草鱼突变体的背部肌肉组织中的某些成分, 可能肌隔结缔组织[8,13,14], 发生了一定程度的钙化但没有形成肌间刺, 提示鱼类肌间刺的发育可能有多个不同的形态发生阶段.

我们只在散鳞突变体中检测到了无肌间刺突变体, 在所有检测过的全鳞雌核发育草鱼中都有肌间刺, 提示草鱼鳞片的发育与肌间刺的发育可能受一些共同的基因调控. 但鱼类肌间刺与鳞片的发育形态、组织分布不同, 骨化程度也可能不同. X-射线透视结果表明大多数散鳞突变体中有肌间刺, 提示另有一些在肌肉中特异性调控肌间刺发育的基因. 我们有理由推测这些基因的功能主要是在肌肉组织发生的特定时期, 启动肌间刺发育, 调控其分布和结构形成.

寻找和确定特异性调控肌间刺发育, 但不影响脊椎骨和附肢骨骼的关键发育调控基因, 是揭示鱼类肌间刺的发育遗传调控机制, 进而实现在基因操作水平上进行无肌间刺养殖鱼类育种的基础. 无肌间刺草鱼纯合突变体的获得, 为寻找和确定这些基因提供了难得的实验材料.

参考文献

1 Patterson C, Johnson G D. The intermuseular bones and ligaments of teleostean fishes. Smithsonian Contrib Zool, 1995, 559: 1–85

2 Johnson G D, Patterson C. The intermuseular system of acanthomorph fishes: A commentary. Am Mas Nov, 2001, 3312: 1–24

3 Gemballa S, Britz R. Homology of intermuscular bones in acanthomorph fishes. Am Mus Nov, 1998, 3241: 1–25

4 Ma L X, Dong Z J, Su S Y, et al. Advance on intermuscular bone of fish (in Chinese). Agricult Sci Jiangsu, 2012, 40: 234-235, 240 [马良骁, 董在杰, 苏胜彦, 等. 鱼类肌间刺的研究进展. 江苏农业科学, 2012, 40: 234–235, 240]

5 Lü Y P, Bao B L, Jiang Y, et al. Comparative analysis of intermuscular bones in lower teleosts (in Chinese). J Fish China, 2007, 31: 661–668 [吕耀平, 鲍宝龙, 蒋燕, 等. 低等真骨鱼类肌间骨的比较分析. 水产学报, 2007, 31: 661–668]

6 Li S Z, Wang H M. Osteological studies of some Chinese flatfishes II: The vertebrae, ribs, epipleurals and myoseptal bones (in Chinese). Acta Zool Sin, 1987, 33: 267–276 [李思忠, 王惠民. 中国鲽形目鱼类骨骼的研究Ⅱ. 脊椎骨、肋骨、上肋骨及肌隔骨刺. 动物学报, 1987, 33: 267–276]

7 Gao W J. A study on the morphological and distribution of *Os. Intermusculares* of *Ctenopharyngodon idellus* (in Chinese). J Agricult Univ Hebei, 1984, 7: 178–184 [高维竞. 草鱼的肌间骨(*Os. intermusculare*)形态及其分布的研究. 河北农业大学学报, 1984, 7: 178–184]

8 Meng Q W, Su J X, Li W R. Fish Comparative Anatomy (in Chinese). Beijing: Science Press, 1987. 102–103 [孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. 鱼类比较解剖. 北京: 科学出版社, 1987. 102–103]

9 Cong S P, Xu J, Li J K. Preliminary study on *Os. Intermusculares* of *Gymnocypris przewalskii przewalskii* (in Chinese). J Shaanxi Norm Univ (Nat Sci Ed), 1982, 2: 80–83 [丛淑品, 徐剑, 李家坤. 青海湖裸鲤肌间骨(*Os. intermusculare*)的初步观察. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 1982, 2: 80–83]

10 Dong Z J, Huang D Z, Li L J, et al. Preliminary study on intermuscular bones of several cultured cyprinids (in Chinese). J Shanghai Fish Univ, 2006, 15: 425–429 [董在杰, 黄代中, 李丽娟, 等. 几种常见鲤科养殖鱼类肌间刺的初步研究. 上海水产大学学报, 2006, 15: 425–429]

11 Ke Z H, Zhang W, Jiang Y, et al. Developmental morphology of the intermuscular bone in *Hypophthalmichthys molitrix* (in Chinese). Chin J Zool , 2008, 43: 88–96 [柯中和, 张炜, 蒋燕, 等. 鲢肌间小骨发育的形态学观察. 动物学杂志, 2008, 43: 88–96]

12 Jiang Y, Yang L L, Bao B L. The epicentrals in several lower teleosts (in Chinese). J Shanghai Fish Univ, 2008, 17: 493–497 [蒋燕, 杨琳琳, 鲍宝龙. 几种低等真骨鱼类的椎体小骨. 上海水产大学学报, 2008, 17: 493–497]

13 Ping C. On the myoseptal spines of the carp (*Cyprinus Carpio* L.) (in Chinese). Acta Zool Sin, 1962, 14: 175–178 [秉志. 幼鲤大侧肌隔骨针的观察. 动物学报, 1962, 14: 175–178]
14 Deng Z Z. On the study of the skeleton of *Carassius auratus* L. (in Chinese). Acta Zool Sin, 1959, 11: 236–252 [邓之真. 鲫鱼骨骼的研究. 动物学报, 1959, 11: 236–252]
15 Bird N C, Mabee P M. Developmental morphology of the axial skeleton of the Zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). Dev Dynam, 2003, 228: 337–357
16 Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature, 1981, 291: 293–296
17 Luo C, Li B. Diploid-dependent regulation of gene expression: A genetic cause of abnormal development in fish haploid embryos. Heredity, 2003, 90: 405–409
18 Lin K D, Luo C. Preliminary study on applicability of microsatellite primers developed from common carp for genomic analysis of grass carp (in Chinese). Acta Laserbiol Sin, 2003, 12: 121–127 [林凯东, 罗琛. 鲤的微卫星引物对草鱼基因组分析适用性的初步研究. 激光生物学报, 2003, 12: 121–127]
19 Zheng K, Lin K D, Liu Z H, et al. Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and the xiangjiang River group. J Genet Genom, 2007, 34: 321–330
20 Hu H X, Zheng K, Chen J H, et al. Analysis on the genetic influence of heterologous sperm in the genome of gynogenetic grass carp (in Chinese). Acta Hydrobiol Sin, 2008, 32: 701–710 [胡海星, 郑康, 陈金辉, 等. 异源精子遗传物质对雌核发育草鱼基因组的影响分析. 水生生物学报, 2008, 32: 87–96]
21 Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Anim Genet, 1997, 28: 129–134

Normally grown and developed intermuscular bone-deficient mutant in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*

XU XiaoFeng, ZHENG JianBo, QIAN YeQing & LUO Chen

College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

An intermuscular bone-deficient grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, mutant has been identified in an artificial gynogenetic group, in which traits encoded by recessive mutant genes can be detected because of the genomic homozygosis. Both the axial and appendicular skeletons in the mutant are developed as in the gynogenetic wild-type individuals. No growth or morphological abnormalities have been observed in the mutant. These results indicate that: (1) it is unlikely that intermuscular bone is essential for body support and normal movement of grass carp; (2) the developmental genetic regulatory mechanism of intermuscular bone differs from that of the axial and appendicular skeleton; and (3) the intermuscular bone-deficient grass carp strain can be bred using advanced biological techniques. Statistical analysis revealed that the ratio of mutant grass carp with no intermuscular bone is very low in gynogenetic grass carp groups, suggesting that many genes are involved in the development of intermuscular bones and the regulatory network is quite complex. This mutant provides unique experimental material for the identification of genes involved in intermuscular bone development.

grass carp, intermuscular bone, mutant, gynogenesis

doi: 10.1360/N972014-00637