

鱼类肌间骨发育分子调控机制及遗传选育研究进展

王旭东^{1,2} 聂春红^{1,2} 高泽霞^{1,2,3}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070; 2. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 武汉 430070; 3. 湖北省名优鱼育种与健康养殖工程技术研究中心, 武汉 430070)

摘要: 鱼类的肌间骨(Intermuscular bones, IBs), 又称肌间小骨, 是分布于鱼体两侧肌隔中及连接在椎体上的小骨, 仅存在于低等真骨鱼类中。随着鱼类的系统演化, 肌间骨的数目和形态也发生着由无到多再到无、由简单到复杂再到简单的变化。中国的大宗淡水鱼类都存在一定数目的肌间骨, 严重影响了其食用和加工价值。鉴于鱼类肌间骨重要的系统进化科学研究价值及产业意义, 近年来国内外水产研究者围绕鱼类肌间骨分子调控机制和遗传育种开展了系列研究, 文章对此进行了系统的阐述, 并对其发展前景进行了分析, 可为肌间骨发生发育分子机制及少/无肌间骨鱼类新品种的遗传选育研究提供基础资料。

关键词: 鱼类; 水产养殖; 肌间骨; 发育; 分子调控; 育种

中图分类号: Q174; Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)03-0680-12



肌间骨, 俗称鱼刺, 是由肌隔中的肌腱骨化而来, 仅存在于低等真骨鱼类中。我国是水产养殖大国, 主要养殖大宗淡水鱼类, 即青鱼、草鱼、鲢、鳙、鲤、鲫和鲂^[1], 都存在一定数量的肌间骨。肌间骨的存在不仅极大限制了其加工以及出口创汇, 而且也给食用这些鱼类的人们带来麻烦和一定的受伤风险。但因这些大宗淡水鱼类味道鲜美、养殖技术容易掌握及历史文化和传统消费习惯等因素, 使得大宗淡水鱼在我国水产养殖业中占据重要地位。据《2019中国渔业统计年鉴》统计, 2018年我国大宗淡水鱼产量占到了全国淡水养殖鱼类产量的66.45%^[2]。因此, 对肌间骨的相关研究, 如肌间骨形成的分子机制的解析及培育无刺或少刺的大宗淡水鱼的育种技术也逐渐成为当前研究的热点。

长期以来, 人们对鱼类肌间骨的研究主要集中在形态和数目方面^[3-8]。近期, 常永杰等^[9]发现刀鲚(*Coilia nasus*)和短颌鲚(*C. brachygnathus*)背部上

方和腹部下方有肌骨杆(Myorhabdoi)。国内对于肌骨杆的研究报道较少, 该发现对我国鱼类肌间骨类型研究做了进一步补充。Yang等^[10]对12个亚科共592尾鲤科鱼类肌间骨的发生进行了系统进化研究, 研究揭示了鲤科鱼类肌间骨的变异多样性, 且与其系统发育密切相关, 但又受到多种环境因素的影响, 对肌间骨的发生演化做了进一步补充。

随着多学科的交叉融合, Fiedler等^[11]研究了北大西洋鲱(*Clupea harengus*)肌间骨的微结构及相关属性, 采用机械拉伸试验、扫描电子显微镜法(Scanning electron microscopy, SEM)、宽角X射线散射法(Wide-angle X-ray scattering, WAXS)和micro-CT成像技术等方法评估了肌间骨组织矿物密度(Tissue Mineral Density, TMD)及肌间骨内部微观结构, 进而对北大西洋鲱大体形和小体形两个群体的肌间骨进行了比较分析。研究结果表明, 与其他类型的骨相比, 肌间骨具有十分特殊的刚度、强

收稿日期: 2020-04-30; 修订日期: 2020-10-18

基金项目: 国家自然科学基金(31872559); 国家重点研发计划蓝色粮仓创新专项(2018YFD0900102); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-46-08); 中央高校基本科研业务费专项(2662018PY035)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872559); the National Key Research and Development Program (2018YFD0900102); Modern Agriculture Industry Technology System Construction Projects of China (CARS-46-08); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662018PY035)]

作者简介: 王旭东(1997—), 男, 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: 3472199883@qq.com

通信作者: 高泽霞(1982—), 女, 博士, 教授; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

度和韧性。该研究为硬骨鱼类骨骼生物力学和微观结构特性提供了新的数据。

近年来, 随着生物技术的快速的发展, 研究人员开始关注肌间骨骨化模式^[12-14]、肌间骨相关的分子调控机制和少/无刺鱼的培育等方面。何苹萍等^[15]、Lü等^[16]、Nie等^[17, 18]和Wan等^[19, 20]研究了肌间骨骨化过程的分子机制及一些关键基因的调控作用。在育种方面, Tang等^[21]和Xiong等^[22]分别评估了镜鲤(*Cyprinus carpio var. specularis*)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肌间骨的遗传力, 为开发无或少肌间骨的相关品种奠定了遗传学基础。徐晓峰等^[23]和Perazza等^[24]分别发现无肌间骨突变体草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)和大盖巨脂鲤(*Piaractus brachipomus*), 为探索肌间骨发生的分子机制提供了重要的实验材料。因此, 本文综合整理了有关肌间骨的研究资料, 主要从肌间骨相关的分子机制及育种前景等方面进行了全面阐述。

1 肌间骨发育相关基因调控

1.1 BMP家族基因

骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Protein, BMP)是1965年由Urist首次从成人骨组织中提取的一种活性蛋白质, 除了BMP-1外, 均属于转化生长因子- β (Transforming growth factor, TGF- β)超基因家族^[25, 26]。目前, BMP家族基因已经超过30种, Zhang等^[27]据dCHIP分析将已发现的人类14种骨形态发生蛋白分为3种类型: BMP2、BMP4、BMP6、BMP7和BMP9属于成骨/成软骨/成脂类型, BMP5、BMP11、BMP12、BMP13、BMP14和BMP15属于肌腱发育类型, BMP3、BMP8和BMP10属于BMP3类型^[27]。BMP具有诱导成骨的作用, 被认为是诱导骨形成及骨分化最早期的信号分子。BMP蛋白主要由单体形式通过二硫键结合形成二聚体^[28]。BMP的同二聚体和异二聚体被报道能与有成骨潜能及未分化的间充质干细胞表面受体相互作用, 从而促进间充质干细胞分化^[25, 26]。BMP9被认为是诱导骨髓间充质干细胞成骨的最有效因子之一^[29]。

Zhang等^[30]运用qRT-PCR技术初步分析了9个**bmp**基因在团头鲂肌间骨4个发育关键时期中的表达, 结果表明: 在肌间骨形成的早期阶段, **bmp3**、**bmp4**、**bmp5**和**bmp8a**的表达量均上调。因此, 这些BMP家族基因可能参与刺激间充质细胞向肌间骨生长位点的迁移、聚集及成骨细胞的分化。在肌间骨快速发育时期, 只有**bmp7b**和**bmp16**表达急剧增加, 说明**bmp7b**和**bmp16**可能参与成骨细胞分化和肌间骨的发育成熟。在团头鲂肌间骨发育过程

中, 表达量最高的**bmp7b** mRNA在肌间骨快速发育时期达到最高峰, 由此表明BMP-7b可能是肌间骨发育的强诱导因子, 用于诱导成骨细胞发育成熟。在肌间骨完全发育成熟的时期, **bmp2a**、**bmp2b**、**bmp3**、**bmp4**、**bmp8a**和**bmp14**相对于其他骨化时期的表达量显著增加, 推测这些基因对维持肌间骨结构等方面有重要作用。Yang等^[31]对罗非鱼和团头鲂的**bmp2a/b**基因的研究表明, **bmp2b**主要在肌间骨、肋骨和鳍条等骨相关的组织表达, 而**bmp2a**主要在肌肉、脾和心脏等外周组织表达。由此说明, **bmp2b**可能与肌间骨的发生发育密切相关。Su和Dong^[32]在转录和翻译水平比较分析了**bmp4**基因在鲤和罗非鱼的背部肌肉、腹部肌肉和尾部肌肉的表达情况, 结果表明**bmp4**基因在鲤背部和尾部肌肉这两处含有肌间骨的组织中高表达, 其他4个组织也有表达, 但表达量远远低于在鲤的背部和尾部肌肉中的表达量。通过对有无肌间骨鱼类和有无肌间骨组织的比较, 说明**bmp4**基因可能是调控肌间骨的重要基因。

1.2 肌腱发育相关基因

有研究认为肌间骨是由肌腱骨化而来的^[33, 34]。在肌腱发育过程中, Scleraxis(SCX)和Tenomodulin(TNMD)等作为肌腱发育的特异性转录因子受到广泛关注。SCX是一个含有碱性螺旋-环-螺旋(basic Helix-Loop-Helix, bHLH)的转录因子, 是肌腱祖细胞最早的标志, 在肌腱的发育成熟中起了重要的作用^[35]。在哺乳动物中, Tomoya等^[36]利用**scx**-GFP转基因小鼠研究了SCX在肌腱损伤后修复作用, 结果表明SCX是一个重要的加快修复损伤成熟肌腱的分子靶标。Shukunami等^[37]应用TALEN介导基因编辑技术获得**scx**^{-/-}小鼠表现出肌腱发育不良的表型。同时, Shukunami等^[37]也发现SCX是**tnmd**基因的转录调控因子, 在**scx**^{-/-}小鼠的肌腱和韧带中**tnmd**基因几乎不表达。TNMD是一种肌腱/韧带特异性标记物和抗血管生成分子, 属于II型跨膜糖蛋白, 含有高度保守的c-末端富含半胱氨酸的结构域^[38, 39]。Yin等^[39]发现**tnmd**^{-/-}小鼠的肌腱干细胞基因表达谱显著改变, 表现为细胞对I型胶原黏附不足, 细胞外基质的收缩能力受损。

在硬骨鱼类的研究中, Nie等^[40]通过Crispr/Cas9基因敲除技术分别获得了**scxa**^{-/-}和**scxb**^{-/-}斑马鱼突变体, **scxa**^{-/-}斑马鱼与野生型斑马鱼相比背部肌间骨消失, 仅尾部含有少量肌间骨; 进一步通过转录组分析发现**scxa**^{-/-}斑马鱼肌腱发育相关基因表达量均下调。而**scxb**^{-/-}斑马鱼肌间骨表型与野生斑马鱼无异。该研究表明**scxa**基因可控制硬骨鱼类肌间

骨的数量性状。陈宇龙等^[41]研究了肌腱发育相关基因*tnmd*和*xirp2a*在团头鲂肌间骨不同发育时期的表达, 研究结果表明*tnmd*基因在团头鲂肌间骨快速发育时期表达量显著高于其他时期, 而*xirp2a*基因在肌间骨发育各个时期没有显著差异。该研究指出*tnmd*基因可能对肌间骨的发育具有一定的调控作用。

1.3 硬化蛋白基因

硬化蛋白(Sclerostin, SOST)是一种含有213个氨基酸的糖蛋白, 在骨细胞中特异性表达^[42], 抑制成骨细胞的活动, 其主要作用是抑制Wnt/ β -catenin通路, 从而抑制骨的形成。在*sost*基因敲降的小鼠中可以观察到高骨量的表型, 并且抗骨质疏松^[43]。硬化蛋白抗体能够刺激骨形成, 这为治疗骨质疏松提供了一种新的方法^[44]。

硬化蛋白基因在硬骨鱼类肌间骨中的研究较少。杨敏璇等^[45]利用分子生物技术体外克隆鲫(*Carassius auratus*)*sost*基因全长, 并构建原核表达载体, 体外表达硬化蛋白。结果表明, 随着时间的递增, 硬化蛋白表达量逐渐增大, 诱导时间为4h左右其表达量最高。该研究表明, 信号肽存在对*sost*基因的蛋白表达存在抑制影响。房连聪^[46]对淇河鲫肌间骨发育时期的研究推测, SOST可能参与淇河鲫肌间骨骨化负调控, 对骨骼发育存在抑制作用。王良炎等^[47]对淇河鲫成鱼不同肌间骨相邻肌组织的研究发现, *sost*在肌隔组织中大量表达且在淇河鲫背部肌肉中存在差异性表达。田雪等^[48]以淇河鲫仔稚鱼为研究对象, 检测*sost*基因在肌间骨不同骨化阶段的mRNA和蛋白表达变化情况, 结果表明该基因在肌间骨完全成熟后表达量达到最高, 推测*sost*基因与鲫的肌间骨生长有一定相关性。

1.4 其他基因

在脊椎动物中, 肌节同源盒(Muscle segment homeobox, MSX)在上皮-间充质的交互作用中发挥重要作用, 促进器官的形成^[49]。Lü等^[16]运用整胚原位杂交和qRT-PCR技术研究*Msx-C*在唇鲮(*Hemibarbus labeo*)肌间骨发生过程中的作用。*Msx-C*基因在唇鲮26—41 dph(Day post hatching)在肌隔中表达, 该基因与唇鲮肌间骨骨化过程(35—62 dph)一致, 表明*Msx-C*基因在唇鲮肌间骨形成过程中发挥重要作用。

TWIST是高度保守的碱性螺旋-环-螺旋(Basic helix-loop-helix, bHLH)家族中的转录因子, 参与中胚层衍生组织(包括骨骼)的发育^[50]。脊椎动物有两种*twist*基因, 即*twist1*和*twist2*^[51]。研究发现, *twist1*和*twist2*对小鼠骨骼的发育具有调控作用^[52]。陈洁

等^[53]通过qPCR研究*twist1*和*twist2*在唇鲮肌间骨发育的4个关键时期的表达情况, 结果表明*twist1*表达量随肌间骨发育逐渐降低, 肌间骨快速发育和成熟时期*twist1*表达量与肌间骨未发育时期相比显著降低; *twist2*从肌间骨未发育时期到肌间骨快速发育时期表达量并未发生显著变化, 到肌间骨完全成熟时期其表达量才显著降低。这表明*twist1/2*基因的表达与肌间骨骨化存在一定的相关性。

当前, 对于鱼类骨骼发育的研究还比较缺乏, 研究进展情况落后于在人类和哺乳动物的相关研究。同时, 鱼类相对于人类和哺乳动物的进化地位低, 相同基因在进化过程中其功能可能会发生相应的改变。而且在活体水平的基因编辑会或多或少的受到补偿效应的作用, 从而对表型观察等产生影响。综合来看, 鱼类肌间骨发育相关基因仍有待挖掘和探索。

2 肌间骨相关组学分析

目前, 大多数肌间骨的研究主要是集中在个体发生发育的形态学分析, 对肌间骨发育分子调控方面的研究相对较少。近些年, 随着高通量测序技术和分子技术的发展, 越来越多的研究人员开始运用组学技术和分子技术揭示肌间骨发生发育的分子机制(表1)。

2.1 转录组

基于高通量测序技术, Wan等^[19]首次比较分析了6月龄团头鲂肌间骨(IBs)和包含肌间骨的结缔组织(CT)的miRNA分子特征, 获得218个已知miRNA基因的序列和相应表达水平。结果表明MiR-206是成骨细胞分化的关键调控因子, 对成骨细胞分化起到抑制作用。通过stem-loop实时荧光定量对11个差异表达miRNA在9个组织上进行验证, 结果表明mam-miR-221、mam-miR-222a、mam-miR-92a和mam-miR-26a在肌间骨和含肌间骨的结缔组织中表达量相对较高, 说明其在肌间骨发育中发挥一定作用。

随后, Wan等^[20]比较分析了团头鲂肌间骨发育关键时期(S1. 肌间骨未发生; S2. 肌间骨初步发生; S3. 肌间骨快速发育; S4. 肌间骨发育完全)mRNA和miRNA的分子特征, 并对二者进行整合分析。结果表明TGF- β 信号通路与MAPK信号通路、ERK信号通路互作, 调节成骨细胞分化。在团头鲂肌间骨4个发育关键时期中, 有22个miRNA持续上调和18个miRNA持续下调。通过整合分析发现一定数量的与肌间骨形成有关的mRNA-miRNA互作对, 在细胞水平验证了miR-133对靶基因*Tgfbra1a*的调控作用。

何苹萍等^[15]对禾花鲤(*C. carpio* var. *Quanzhou-nensis*)和建鲤(*C. carpio* var. *Jian*)肌间骨进行miRNA的高通量测序, 据差异表达结果推测, 肌间骨的发育可能是通过下调促进成骨miRNA的表达量及上调抑制成骨miRNA的表达量来抑制成骨过程, 从而维持禾花鲤肌间骨细小及柔软的特性。Peng等^[54]比较分析禾花鲤和建鲤肌间骨mRNA和microRNA转录组数据发现7个差异表达基因和12个差异表达miRNA参与禾花鲤骨矿化调控过程。随着团头鲂全基因组测序的完成, Liu等^[55]对3种关键组织(肌间骨、肌间骨外周结缔组织和背部白肌)进行了基因差异表达分析, 进一步确认了所观察到的基因表达差异确实与肌间骨的形成和功能有关。

2.2 蛋白组

Nie等^[17]通过iTRAQ LC-MS/MS蛋白组学定量分析技术构建了鱼类肌间骨和肋骨的第一张蛋白组图谱。经蛋白组学分析发现, 一龄团头鲂肌间骨和肋骨之间的93个差异表达蛋白造成一龄团头鲂肌间骨和肋骨的化学组成差异, 二龄团头鲂肌间骨和肋骨间存在154个差异表达蛋白造成上述2种骨间的化学组成差异; 与破骨细胞分化相关的玻连蛋白b前体和金属蛋白酶2在肋骨中显著上调表达; 在

团头鲂的不同年龄阶段(一龄、二龄)发现13个肌间骨发育相关候选蛋白和11个肋骨发育相关候选蛋白。通过KEGG分析在235个通路中共定位了2023个蛋白, 其中在肌间骨发育相关信号通路, 如MAPK信号通路、钙离子信号通路、TGF-β信号通路、Wnt信号通路及破骨细胞分化途径分别鉴定出60、41、20、17和11种蛋白。通过GO注释分析, HCM信号通路为差异表达蛋白最多的通路。在肋骨和肌间骨中共同表达45个蛋白, 仅有LAMA2表达上调, 其余44种蛋白表达下调。基于蛋白组数据, Nie等^[17]对ECM、MAPK、GnRH及钙离子通路中蛋白的表达模式进行分析。在ECM信号通路中链状胶原蛋白a1(V)等18个蛋白在一龄团头鲂肋骨组织中高表达; 肌腱蛋白样蛋白、层黏连蛋白亚基a-2和tnc蛋白在一龄团头鲂肌间骨中的表达量最高。

2.3 多组学整合分析

在肌间骨的组织结构和成分研究方面, Nie等^[17]通过HE染色切片法比较分析了一龄和二龄团头鲂肌间骨和肋骨, 切片结果表明两种骨组织均含有三种典型的骨形成细胞, 即破骨细胞、成骨细胞和骨细胞, 但在一龄和二龄团头鲂肋骨中均发现一个富含破骨细胞的骨腔, 而肌间骨不存在类似骨腔。通

表 1 低等硬骨鱼类肌间骨相关基因和组学研究

Tab. 1 Summary of studies on genes or omics related to intermuscular bone in lower teleosts

基因和组学研究Genetic and omics research	物种Species	样品采集Sampling part	研究方法Research methods	参考文献Reference
<i>bmp2</i>	团头鲂尼罗罗非鱼	成鱼肌间骨、肋骨、鳍条、肌肉、脾脏、肝脏、心脏、脑	qRT-PCR	[31]
<i>bmp4</i>	黄河鲤尼罗罗非鱼	成鱼背部肌肉、腹部肌肉、尾部肌肉	qRT-PCR免疫组织化学反应	[32]
<i>bmp2a, bmp2b, bmp3b, mp4, bmp5, bmp7b, bmp8a, bmp14, bmp16</i>	团头鲂	四个肌间骨关键发育时期的幼鱼、一龄、二龄团头鲂肋骨、肌间骨和含肌间骨的背部肌肉	qRT-PCR	[30]
<i>sost</i>	淇河鲫		qRT-PCR	[45—48]
<i>scxa/scxb</i>	斑马鱼		Crispr/Cas9基因敲除	[40]
<i>tnmd</i>	团头鲂	四个肌间骨关键发育时期的幼鱼	qRT-PCR	[41]
<i>MsxC</i>	唇鲮	肌间骨关键发育时期的幼鱼	整胚原位杂交qRT-PCR	[16]
<i>twist1/2</i>	唇鲮	仔、稚鱼尾部肌肉	qRT-PCR	[53]
MicroRNA组MicroRNA	团头鲂	6月龄团头鲂肌间骨和含有肌间骨的结缔组织	高通量测序	[19]
MicroRNA组和转录组MicroRNA & Transcriptome	团头鲂	四个肌间骨关键发育时期的幼鱼	高通量测序	[20]
MicroRNA组MicroRNA	禾花鲤建鲤	肌间骨	高通量测序	[15]
MicroRNA组和转录组MicroRNA & Transcriptome	禾花鲤建鲤	肌间骨	高通量测序	[54]
蛋白质组Proteome	团头鲂	一龄、二龄团头鲂肋骨和肌间骨	高通量测序	[17]
蛋白质组和转录组Proteome & Transcriptome	团头鲂	四个肌间骨关键发育时期的幼鱼尾部肌肉	高通量测序	[18]
基因组和转录组Genome & Transcriptome	团头鲂	三个肌间骨关键发育时期的幼鱼尾部肌肉	高通量测序	[56]

过使用阿利新蓝染色(用于软骨细胞染色)和茜素红染色(用于组织钙盐反应)等不同的染色方法分析, Nie等^[18]对团头鲂肌间骨发育关键时期的个体进行整体染色观察的研究, 结果表明肌间骨矿化从S2时期开始, S2到S4时期钙沉积量持续增加; 但在肌间骨发育过程中无软骨细胞形成, 表明肌间骨的骨化方式为膜内骨化。随后, Nie等^[18]综合了组织学、转录组和蛋白组数据全面分析了肌间骨的骨化模式, 通过同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术鉴定得到3368个蛋白, 功能注释表明MARK信号通路和钙离子信号通路是骨发生过程中的主要信号通路。经蛋白组学和定量表达分析发现, 软骨细胞相关蛋白(COLLAGEN9A1、STAT1和TNC)在肌间骨发育过程中的表达量无显著差异, 而与成骨细胞和骨形成相关蛋白(ENTPD5、CASQ1A、PVALB、ANXA2A和ANXA5)表达量在不同发育时期具有显著的差异性, 从蛋白组学的角度进一步验证了肌间骨骨化不经历软骨阶段的观点。

Chen等^[56]通过全基因组和转录组综合分析, 获得了MAPK信号通路、钙离子信号通路、ECM受体互作及Notch信号通路等团头鲂肌间骨发育相关信号通路, 尤其是ECM受体互作和Notch信号通路在全基因组和转录组两种分析中均得到富集。随后在转录水平验证了以上通路中的相关基因(*itgal*、*itga6a*、*lamb1b*、*col6a3*、*dvl1a*和*oserr1*), 结果表明这些基因均在团头鲂肌间骨发育S3时期比S1时期显著高表达, 与转录组水平相同。

近期, 基于在大盖巨脂鲤养殖群体中发现了缺失肌间骨的个体^[24], 研究团队对突变体进行了全基因组关联分析^[57], 筛选到了13个与减少骨量、促进骨形成、抑制骨吸收和骨矿化等相关功能相关的基因, 包括*actn3b*、*adamts12*、*atp6v0a1a*、*atp6v0ca*、

dchs1b、*ebf3a*、*efnb1*、*nmu*、*ntn4*、*pde4d*、*plek*、*wisplb*和*xpr1b*。

基于鱼类肌间骨相关组学和基因表达信息, 总结出从肌腱源干细胞-成骨细胞前体细胞-成骨细胞-肌间骨形成过程中发挥一定作用的通路及相关基因(图1), 为进一步探讨鱼类肌间骨发育的机制提供了分子基础信息。

3 肌间骨性状的遗传选育

目前, 国内大宗淡水鱼类及印度、巴西等国家主要养殖的鱼类品种均含有肌间骨, 对鱼类经济效益和食用安全产生了一定的影响。一些研究学者致力于运用育种手段来减少或去除鱼类肌间骨, 已取得一些明显的进展^[58](表2)。

3.1 选择育种

自20世纪70、80年代起, 以群体选育和家系选育为主的选择育种已广泛应用于水生生物的遗传改良工作中^[59], 而研究人员对减少肌间骨数量方法探究开始于1967年^[60]。虽然这些方法探究没有获得少肌间骨鱼类品种^[58], 但许多研究发现在鲤科鱼类中肌间骨数量存在显著的遗传变异现象^[60, 61], 这种遗传变异现象表明选择育种可应用于减少肌间骨数量的相关研究^[58]。

近些年, Cao等^[62]对镜鲤、柏氏鲤(*C. pellegri*)与黑龙江鲤(*C. carpio*)的杂交鲤、荷包鲤的耐寒品系等3种鱼的肌间骨数量和形态变异情况进行比较分析, 与其他两种鱼相比, 镜鲤肌间骨的数量最少, 变异系数也较高。结果表明镜鲤是一种可用于选择育种减少肌间骨的材料, 并且认为通过选择育种可以有效减少鱼体后部肌间骨数量。Tang等^[21]首次对镜鲤肌间骨进行遗传力和数量性状位点(Quantitative Trait Loci, QTLs)分析, 结果表明镜鲤肌间骨数量为中等遗传力性状并发现8个肌

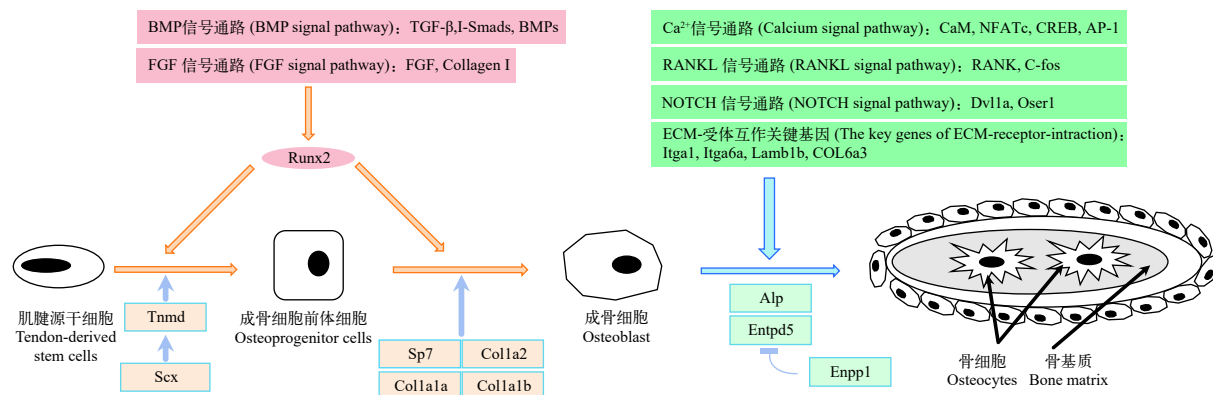


图1 硬骨鱼类肌间骨发育相关分子机制

Fig. 1 The molecular mechanism related to intermuscular bone in teleosts

间骨QTLs和29个肌间骨相关的候选基因。该研究为鲤肌间骨分子机制的深入研究提供了资料。Xiong等^[22]研究表明团头鲂整体肌间骨数量变异系数为6.98%, 而脉弓小骨数量变异系数高达13.63%, 显著高于髓弓小骨数量的变异系数(6.60%)。对83个全同胞家系团头鲂的肌间骨数量遗传力进行评估显示, 髓弓小骨数量为低遗传力(0.13), 脉弓小骨数量为中等遗传力(0.37)。Xiong等^[22]认为可以通过家系选择育种来有效减少脉弓小骨数量。在20世纪90年代后期, DNA分子标记辅助育种的出现加快了育种进程^[63]。马吉敏等^[64]从200个微卫星位点中筛选出149个多态性位点, 经关联性分析获得8个与镜鲤肌间骨数量显著相关的微卫星位点。Wan等^[65]利用混合分组分析(Bulked segregant analysis, BSA)方法检测团头鲂肌间骨极少(<100)和极多(>130)两个群体中的SNPs, 共确定了6074个SNPs且最终筛选出181个与团头鲂肌间骨数量相关的候选SNP位点。该研究首次探索了SNPs位点与肌间骨数量的关联性, 为肌间骨数量相关的分子标记辅助育种奠定了基础。

3.2 杂交育种

除选择育种外, 杂交育种也是最基础且得到广泛应用的育种技术之一^[59]。一些研究人员对不同鱼类进行杂交, 对获得的后代进行肌间骨相关分析研究。聂春红等^[64]对团头鲂与其他3种鲂属鱼类[三角鲂(*M. skolkovii*)、广东鲂(*M. terminalis*)和厚颌鲂(*M. pellegrini*)]正反交及亲本自交后代共10种杂交组合子代的肌间骨数目、形态、分布和长度进行了比较分析。研究结果表明, 鲂属鱼类近缘杂交子一代的肌间骨相关性状特征无显著改变。蒋文枰等^[67]对鲃鲂F₁代、鲃鲂F₂代和母本翘嘴鲃(*Culter alburnus*)、父本团头鲂肌间骨的数目、形态和分布进行统计分析, 研究表明鲃鲂F₁代、鲃鲂F₂代在肌间骨数目和形态复杂性方面较母本有所减少, 并且F₂代较F₁代还呈现下降趋势。钟泽洲^[68]对团头鲂、翘嘴红鲃、鲃鲂F₁代及翘嘴鲃4种不同杂交鱼的肌间骨的数目、形态和分布进行研究, 结果说明翘嘴鲃等人工培育的杂交鱼比原始亲本翘嘴红鲃、团头鲂的肌间骨少。Guo等^[69]研究广东鲂(♀)和翘嘴鲃(♂)属间杂交F₁代的肌间骨数目形态特

表 2 鱼类肌间骨性状相关的遗传改良研究

Tab. 2 Summary of studies on genetic improvement of fishes related to intermuscular bone traits

育种方法Breeding method	物种或杂交方式Species or hybridization	肌间骨相关研究结果IBs-related breeding result	参考文献Reference
选择育种Selection breeding	镜鲤、柏氏鲤与黑龙江鲤的杂交鲤、荷包鲤耐寒品系	三种鲤科鱼类相比, 镜鲤肌间骨数量最少	[62]
	镜鲤	肌间骨数量性状遗传力为中等, 发现8个肌间骨QTLs和29个肌间骨相关的候选基因	[21]
	团头鲂	髓弓小骨数量性状遗传力为0.13, 脉弓小骨数量遗传力为0.37	[22]
	镜鲤	筛选鉴定到8个与肌间骨数量显著相关的微卫星标记	[64]
	团头鲂	筛选鉴定到5个与肌间骨数量显著相关的SNP标记	[65]
	属间杂交	鲂属鱼类近缘杂交子一代的肌间骨相关性状特征无显著改变	[66]
杂交育种Hybrid breeding	属间杂交	鲃鲂F ₁ 代、鲃鲂F ₂ 代在肌间骨数目和形态复杂性方面较母本有所减少, 并且F ₂ 代较F ₁ 代还呈现下降趋势	[67]
	属间杂交	翘嘴鲃等人工培育的杂交鱼比原始亲本翘嘴红鲃、团头鲂的肌间骨少	[68]
	属间杂交	鲃鲂F ₁ 代肌间骨的数目和形态复杂程度相对父本均有所下降, 相对母本有所升高, 具有一定程度的杂种优势	[69]
	属间杂交	新型杂交鲃(团头鲂♀×翘嘴鲃♂)肌间骨数量相对于父本肌间骨量减少5.7%	[70]
	属间杂交	候选新品系F系髓弓小骨表现出形态复杂程度低、数量减少的性状	[71]
	多倍体育种Polyploid breeding	改良二倍体红鲫和改良三倍体鲫等人工培育的杂交鱼比野生鲫的肌间骨数量少	[72]
雌核发育Gynogenesis	野生鲫、彭泽鲫、改良三倍体鲫鱼、改良二倍体红鲫、改良异源四倍体鲫鲤		
	团头鲂	雌核发育群体肌间骨数量无明显减少	[73]
基因编辑Genome editing (CRISPR/Cas9 System)	草鱼	获得少量无肌间骨个体	[23]
	鲤	<i>sp7a</i> 突变体鲤肌间骨长度明显变短	[74]
	斑马鱼	<i>scxa</i> 突变斑马鱼肌间骨数目显著减少	[40]
	斑马鱼	没有指出具体的基因名称, 但获得了肌间骨完全缺失的突变品系, 且突变体胚胎发育、肌肉发育及其他骨骼发育与野生型无显著差异	[75—76]

征,发现鲃鲂 F_1 代肌间骨的数目和形态复杂程度相对父本均有所下降,而相对母本有所升高,具有一定程度的杂种优势。Wu等^[70]用远缘杂交技术培育的新型杂交鲃(团头鲂♀×翘嘴鲃♂)肌间骨数量相对于父本肌间骨量减少5.7%。李志等^[71]比较分析了不同月龄异育银鲫 A^+ 品系和候选新品系F系的肌间骨形态数量差异,研究表明,候选新品系F系髓弓小骨表现出形态复杂程度低、数量减少的性状,相对于 A^+ 系有利于食用的优势。

3.3 多倍体和雌核发育育种

多倍体育种和人工雌核生殖属于细胞工程育种技术,是在细胞或染色体组水平上进行遗传改良的育种技术^[59]。黎玲等^[72]比较了5种不同倍性鱼肌间骨的数目、形态和分布,结果表明改良二倍体红鲫和改良三倍体鲫等人工培育的杂交鱼比野生鲫的肌间骨数量少,为培育少或无肌间骨鱼类提供一种育种方法。关柠楠等^[73]对86尾雌核发育团头鲂群体肌间骨的数目、形态、分布和长度进行了比较分析。结果表明,与正常的团头鲂群体肌间骨的数目相比,该群体的肌间骨的数目并没有明显减少。徐晓锋等^[23]通过人工诱导雌核发育纯合二倍体草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)使突变基因的性状显现,在5尾散鳞突变体草鱼中筛选出了1尾正常发育的无肌间骨的草鱼。

3.4 基因编辑育种

此外,随着基因编辑技术的发展,Zhong等^[74]使用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除鲤 $sp7a$ 基因,结果表明 $sp7a^{-/-}$ 突变体存在明显的肌间骨变短的现象,但突变体同时存在骨缺损,包括鳃盖、上颌骨功能不全和背部弯曲等问题。Nie等^[40]通过基因编辑技术分别获得了 $scxa$ 基因突变斑马鱼,突变体与野生型斑马鱼相比背部无肌间骨,仅尾部含有少量肌间骨,总数较野生型减少约70%,个别突变体虽然存在肋骨发育缺陷和肌膈发育缺陷,但整体生命活动和繁殖能力与野生型没有明显差异。杨建等^[75,76]同样通过基因编辑技术获得了无肌间骨的斑马鱼突变品系,虽然作者没有指出具体的基因,但通过qRT-PCR对比分析5个肌肉特异性基因($mef2$ 、 $myf5$ 、 $myod$ 、 $myog$ 和 $sox6$)和6个骨骼发育相关基因($bmp2a$ 、 $bmp4$ 、 $smad1$ 、 $smad4a$ 、 $runx2a$ 和 $sp7$)在无肌间骨突变品系和野生斑马鱼中的表达情况,结果表明肌间骨存在与否对斑马鱼胚胎发育以及肌肉发育无显著影响;肌间骨缺失对斑马鱼骨骼发育无显著影响,只在胚胎发育时期影响骨骼相关基因表达水平的变化,结合组织学染色结果推测,肌间骨缺失对斑马鱼骨骼发育无显著影响。

4 研究展望

世界上对鱼类肌间骨的遗传育种研究最早始于1967年,之后近50年,这方面的研究进展比较慢。从图2可以看出,自2010年后,越来越多的研究人员开始围绕鱼类肌间骨分子遗传机制和遗传育种开展研究。研究肌间骨的分子机制对揭示鱼类肌间骨的系统进化有着重要意义,随着分子编辑技术和单细胞测序技术的快速发展,通过开展有肌间骨和无肌间骨鱼类肌膈中肌腱组织细胞类型的确定和基因表达差异性研究,筛选鉴定诱导有肌间骨鱼类肌腱源性干细胞向成骨细胞分化的关键基因;通过基因过表达和基因功能缺失等研究方法明确基因的调控功能,阐明鱼类肌间骨发育的分子机制,进一步可通过CRISPR/Cas9基因编辑技术培育少或无肌间骨的鱼类。

此外,肌间骨的遗传力为中等遗传力且一些与肌间骨数量相关的标记基因也被筛选鉴定,这些标记基因可以被用来指导少肌间骨鱼类的选育,尤其是鲤科鱼类。随着科学技术的快速发展和测序成本的降低,二代/三代测序技术与全基因组关联研究(Genome wide association studies, GWAS)技术也可以用来确定与肌间骨数量相关的标记基因,进一步提高少肌间骨鱼类选育的准确性。无肌间骨的草鱼或巴西大盖巨脂鲤可以用来与正常个体杂交,在获得 F_1 代基础上进而形成 F_2 家系,用于QTL定位肌间骨有/无的关键基因,为后续研究肌间骨的分子机制以及开展无肌间骨鱼类选育奠定基础。中国的水产养殖已为世界做出重要贡献,若能培育出无“小刺”的主养大宗鱼,必将成为对世界水产的又一重大贡献。

参考文献:

- [1] Ge X P. Status and development trend of China's bulk freshwater fish industry [J]. *Fishery Guide to be Rich*, 2013(6): 17-21. [戈贤平. 我国大宗淡水鱼产业现状与发展方向 [J]. 渔业致富指南, 2013(6): 17-21.]
- [2] Xu L J, Lü Y H, Yu S H, et al. China fishery statistical yearbook of 2019 [R]. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 21-25. [徐乐俊, 吕永辉, 于航盛, 等. 2019中国渔业统计年鉴 [R]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 21-25.]
- [3] Lü Y P, Bao B L, Jiang Y, et al. Comparative analysis of intermuscular bones in lower teleosts [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(5): 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 [J]. 水产学报, 2007, 31(5): 661-668.]
- [4] Jiang Y, Yang L L, Bao B L, et al. The epicentrals in several lower teleosts [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2008, 17(4): 493-496. [蒋燕, 杨琳琳, 鲍宝龙. 几种低等真骨鱼类的椎体小骨 [J]. 上海水产大学学报,



图2 硬骨鱼类肌间骨相关分子机制及遗传育种研究时间进程

Fig. 2 The time course of molecular mechanism and genetic breeding related to intermuscular bone in teleosts

- 2008, **17**(4): 493-496.]
- [5] Bing Z. Observation of intermuscular bones of juvenile common carp muscle [J]. *Acta Zoological Sinica*, 1962, **14**(2): 175-179. [秉志. 幼鲤大侧肌隔骨针的观察 [J]. 动物学报, 1962, **14**(2): 175-179.]
 - [6] Wan S M, Yi S K, Zhong J, *et al.* Developmental and morphological observation of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(6): 1143-1151. [万世明, 易少奎, 仲嘉, 等. 团头鲂肌间骨发育的形态学观察 [J]. 水生生物学报, 2014, **38**(6): 1143-1151.]
 - [7] Chen L, Tian X, Mi J L, *et al.* Developmental and morphological study of intermuscular bones in *Cyprinus carpio haematopterus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, **26**(4): 481-489. [陈琳, 田雪, 米佳丽, 等. 黄河鲤肌间骨发育的形态学观察 [J]. 上海海洋大学学报, 2017, **26**(4): 481-489.]
 - [8] Patterson C, Johnson G D. The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes [J]. *Smithsonian Contribution to Zoology*, 1995(559): 1-85.
 - [9] Chang Y J, Zhou J J, Zhang L H, *et al.* The identification of new types of intermuscular bones in *Coilia nasus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **41**(1): 104-111. [常永杰, 周佳佳, 张丽红, 等. 刀鲚肌间骨新类型的发现 [J]. 水生生物学报, 2020, **41**(1): 104-111.]
 - [10] Yang K, Jiang W, Wang X, *et al.* Evolution of the intermuscular bones in the Cyprinidae (Pisces) from a phylogenetic perspective [J]. *Ecology and Evolution*, 2019, **9**(15): 8555-8566.
 - [11] Fiedler I A K, Zeveleva S, Duarte A, *et al.* Microstructure, mineral and mechanical properties of teleost intermuscular bones [J]. *Journal of Biomechanics*, 2019(94): 59-66.
 - [12] Nie C H, Chen Z X, Dai C J, *et al.* Ossification patterns of intermuscular bones in different fish species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(1): 131-137. [聂春红, 陈祖萱, 戴彩娇, 等. 不同鱼类肌间骨的骨化模式研究 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(1): 131-137.]
 - [13] Yao W J, Gong X L, Lü Y P, *et al.* The ossificational process of the intermuscular bones in *Anguilla japonica* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, **23**(6): 810-813. [姚文杰, 龚小玲, 吕耀平, 等. 日本鳗鲡肌间小骨的骨化过程 [J]. 上海海洋大学学报, 2014, **23**(6): 810-813.]
 - [14] Yao W J, Lü Y P, Gong X L, *et al.* Different ossification patterns of intermuscular bones in fish with different swimming modes [J]. *Biology Open*, 2015, **4**(12): 1727-1732.
 - [15] He P P, Wang H, Wei P Y, *et al.* miRNAs sequencing and analysis of intermuscular bone between rice flower carp and jian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(4): 757-762. [何莘莘, 王卉, 韦媛媛, 等. 禾花鲤与建鲤肌间骨miRNAs测序与分析比较 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(4): 757-762.]
 - [16] Lü Y P, Yao W J, Chen J, *et al.* Newly identified gene muscle segment homeobox C may play a role in intermuscular bone development of *Hemibarbus labeo* [J]. *Genetics & Molecular Research*, 2015, **14**(3): 11324-11334.
 - [17] Nie C H, Wan S M, Tomljanovic T, *et al.* Comparative proteomics analysis of teleost intermuscular bones and ribs provides insight into their development [J]. *BMC Genomics*, 2017, **18**(1): 147.
 - [18] Nie C H, Wan S M, Liu Y L, *et al.* Development of teleost intermuscular bones undergoing intramembranous ossification based on histological-transcriptomic-proteomic data [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(19): 4698.
 - [19] Wan S M, Yi S K, Zhong J, *et al.* Identification of MicroRNA for intermuscular bone development in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(5): 10686-10703.
 - [20] Wan S M, Yi S K, Zhong J, *et al.* Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to intermuscular bone development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 31050.
 - [21] Tang G P, Lü W H, Sun Z P, *et al.* Heritability and quantitative trait locus analyses of intermuscular bones in mirror carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquaculture*, 2020(515): 734601.
 - [22] Xiong X M, Robinson N A, Zhou J J, *et al.* Genetic parameter estimates for intermuscular bone in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) based on a microsatellite-based pedigree [J]. *Aquaculture*, 2019(502): 371-377.
 - [23] Xu X F, Zheng J B, Qian Y Q, *et al.* Normally grown and developed intermuscular bone-deficient mutant in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2015, **60**(1): 52-57. [徐晓峰, 郑建波, 钱叶青, 等. 生长发育正常的无肌间刺草鱼突变体 [J]. 科学通报, 2015, **60**(1): 52-57.]
 - [24] Perazza C A, Hilsdorf A W S, Pinaffi F L V, *et al.* Lack of intermuscular bones in specimens of *Colossoma macropomum*: An unusual phenotype to be incorporated into genetic improvement programs [J]. *Aquaculture*, 2017(472): 57-60.
 - [25] An X L, Han J X, Wang S L. Progress on bone morphogenetic protein [J]. *Food and Drug*, 2009, **11**(11): 69-73. [安新玲, 韩金祥, 王世立. 骨形态发生蛋白的研究进展 [J]. 食品与药品, 2009, **11**(11): 69-73.]
 - [26] Che J J, Jin X H, Dai T. Research progress on the role and mechanism of BMP in BMSC osteogenesis and bone marrow differentiation [J]. *Shandong Medical Journal*, 2020, **60**(16): 99-101. [车家驹, 金旭红, 戴涛. BMP在BMSC成骨、软骨分化中作用及机制的研究进展 [J]. 山东医药, 2020, **60**(16): 99-101.]
 - [27] Zhang L, Luo Q, Shu Y, *et al.* Transcriptomic landscape regulated by the 14 types of bone morphogenetic proteins (BMPs) in lineage commitment and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *Genes & Diseases*, 2019, **6**(3): 258-275.
 - [28] Wang J G, Wu C C, Wu D J, *et al.* Bone morphogenetic

- protein and bone metabolism [J]. *China Animal Husbandry Veterinary Medicine*, 2010, **37**(7): 30-32. [王建国, 吴晨晨, 吴殿君, 等. 骨形态发生蛋白与骨代谢 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, **37**(7): 30-32.]
- [29] Jiang T, Xia C, Chen X, *et al.* Melatonin promotes the BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by activating the AMPK/ β -catenin signalling pathway [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, **10**(1): 408.
- [30] Zhang W Z, Lan T, Guan N N, *et al.* Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream [J]. *Gene*, 2018(642): 116-124.
- [31] Yang G, Qin Z, Kou H, *et al.* A comparative genomic and transcriptional survey providing novel insights into bone morphogenetic protein 2 (bmp2) in fishes [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(24): 6137.
- [32] Su S, Dong Z. Comparative expression analyses of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) expressions in muscles of tilapia and common carp indicate that BMP4 plays a role in the intermuscular bone distribution in a dose-dependent manner [J]. *Gene Expression Patterns*, 2018(27): 106-113.
- [33] Britz R, Gemballa S. Homology of intermuscular bones in acanthomorph fishes [J]. *American Museum Novitates*, 1998(3241): 1-25.
- [34] Nie C H, Hilsdorf A W S, Wan S M, *et al.* Understanding the development of intermuscular bones in teleost: status and future directions for aquaculture [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, **12**(2): 759-772.
- [35] Hadi A, Nadav K B, Gadi P, *et al.* Molecular targets for tendon neoformation [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, **118**(2): 439-444.
- [36] Tomoya S, Sakai K, Maeda T, *et al.* Transcription factor scleraxis vitally contributes to progenitor lineage direction in wound healing of adult tendon in mice [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, **293**(16): 5766-5780.
- [37] Shukunami C, Takimoto A, Nishizaki Y, *et al.* Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes [J]. *Scientific Reports*, 2018, **8**(1): 3155.
- [38] Lin D, Alberton P, Caceres M D, *et al.* Loss of tenomodulin expression is a risk factor for age-related intervertebral disc degeneration [J]. *Aging Cell*, 2020, **19**(5): e13091.
- [39] Yin H, Caceres M D, Yan Z, *et al.* Tenomodulin regulates matrix remodeling of mouse tendon stem/progenitor cells in an ex vivo collagen I gel model [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, **512**(4): 691-697.
- [40] Nie C H, Wan S M, Chen Y L, *et al.* Loss of scleraxis leads to distinct reduction of mineralized intermuscular bone in zebrafish [OL]. *Aquaculture and Fisheries*, 2021(6): 169-177.
- [41] Chen Y L, Zhang L H, Zhou J J, *et al.* Cloning and expression analysis of *tnmd/xirp2a* genes relating to tendon development in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, **38**(2): 7-14. [陈宇龙, 张丽红, 周佳佳, 等. 团头鲂肌腱发育相关基因 *tnmd/xirp2a* 的克隆和表达 [J]. 华中农业大学学报, 2019, **38**(2): 7-14.]
- [42] MacDonald B T, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Development Cell*, 2009, **17**(1): 9-26.
- [43] Wei Q, Wang B, Hu H, *et al.* Icaritin promotes the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells via the regulation of sclerostin expression [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, **45**(3): 816-824.
- [44] McDonald M M, Morse A, Birke O, *et al.* Sclerostin antibody enhances bone formation in a rat model of distraction osteogenesis [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2018, **36**(4): 1106-1113.
- [45] Yang M X, Zhu Z A, Chen J J, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of the *SOST* gene of *Carassius auratus* [J]. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 2019, **32**(2): 58-63. [杨敏璇, 朱焯安, 陈嘉俊, 等. 鲫鱼肌间刺形成基因 *SOST* 的克隆表达研究 [J]. 仲恺农业工程学院学报, 2019, **32**(2): 58-63.]
- [46] Fang L C. The intermuscular bones and the sclerostin gene (*SOST*) in *Carassius auratus* in Qihe River [D]. Zhengzhou: Henan Normal University, 2015: 29-37. [房连聪. 淇河鲫肌间骨及其形成相关基因 *SOST* 的研究 [D]. 郑州: 河南师范大学, 2015: 29-37.]
- [47] Wang L Y, Tian X, Pang X L, *et al.* Differentially expression of *SOST* gene in the muscle tissues located between different intermuscular bones in Qihe crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, **32**(12): 1354-1359. [王良炎, 田雪, 庞小磊, 等. 硬化蛋白基因在淇河鲫成鱼不同肌间骨相邻肌组织的表达差异分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, **32**(12): 1354-1359.]
- [48] Tian X, Wang L Y, Chen L, *et al.* The mRNA and protein expression of gene *SOST* during ossification process of intermuscular bone in crucian carp (*Carassius auratus*) in Qihe River [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, **40**(5): 673-680. [田雪, 王良炎, 陈琳, 等. *SOST* 基因在淇河鲫肌间骨骨化过程中的表达研究 [J]. 水产学报, 2016, **40**(5): 673-680.]
- [49] Bendall A J, Abate-Shen C. Roles for *Msx* and *Dlx* homeoproteins in vertebrate development [J]. *Gene*, 2000, **247**(1-2): 17-31.
- [50] Lee M S, Lowe G N, Strong D D, *et al.* TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, **75**(4): 566-577.
- [51] Xiao X S, Li Y Z. Progression of *Twist* gene [J]. *Medical Recapitulate*, 2009, **15**(7): 1031-1034. [肖雄升, 李有柱. *Twist* 基因的研究进展 [J]. 医学综述, 2009, **15**(7): 1031-1034.]
- [52] Huang Y Y, Meng T, Wang S Z, *et al.* Twist1-and Twist2-haploinsufficiency results in reduced bone formation [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(6): e99331.

- [53] Chen J, Lü Y P, Dai Q M, *et al.* Molecular characterization of two twist genes in barbel steed (*Hemibarbus labeo*) and their relationship with intermuscular bone development [OL]. *Journal of Fisheries of China*. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20200616.1156.004.html>. [陈洁, 吕耀平, 戴庆敏, 等. 唇(鲮)twist1和twist2 基因克隆及其在肌间刺骨化过程中的表达 [OL]. 水产学报. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20200616.1156.004.html>.]
- [54] Peng J X, Zeng D G, He P P, *et al.* mRNA and microRNA transcriptomics analyses in intermuscular bones of two carp species, rice flower carp (*Cyprinus carpio* var. *Quanzhounensis*) and Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*) [J]. *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & Proteomics*, 2019(30): 71-80.
- [55] Liu H, Chen C H, Gao Z X, *et al.* The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet [J]. *Gigascience*, 2017, **6**(7): 1-13.
- [56] Chen J, Chen X, Huang X, *et al.* Genome-wide analysis of intermuscular bone development reveals changes of key genes expression and signaling pathways in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Genomics*, 2020, **113**(1): 654-663.
- [57] Nunes J R S, Pértille F, Andrade S C S, *et al.* Genome-wide association study reveals genes associated with the absence of intermuscular bones in tambaqui (*Colossoma macropomum*) [J]. *Animal Genetics*, 2020(51): 899-909.
- [58] Gjerdem T. Flesh quality improvement in fish through breeding [J]. *Aquaculture International*, 1997, **5**(3): 197-206.
- [59] Zhang X J, Zhou L, Gui J F, *et al.* Biotechnological innovation in genetic breeding and sustainable green development in Chinese aquaculture [J]. *Science China-life Sciences*, 2019, **49**(11): 1409-1429. [张晓娟, 周莉, 桂建芳. 遗传育种生物技术创新与水产养殖绿色发展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2019, **49**(11): 1409-1429.]
- [60] Sengbusch R., Meske C. On the way to boneless carp [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1967(37): 271-274.
- [61] Moav R, Finkel A, Wohlfarth G. Variability of intermuscular bones, vertebrae, ribs, dorsal fin rays and skeletal disorders in the common carp [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1975, **46**(1): 33-43.
- [62] Cao D C, Kuang Y Y, Zheng X H, *et al.* Comparative analysis of intermuscular bones in three strains of common carp [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2015, **31**(1): 32-36.
- [63] Tang L X, Xu Z Q, Ge J C. Application of DNA molecular markers in genetics and breeding of aquatic animals [J]. *Journal of Aquaculture*, 2013, **34**(10): 44-48. [唐刘秀, 许志强, 葛家春. DNA分子标记技术在水产动物遗传育种中的应用 [J]. 水产养殖, 2013, **34**(10): 44-48.]
- [64] Ma J M, Kuang Y Y, Zheng X H, *et al.* Screening and body correlation analysis of microsatellite markers related to intermuscular bone number in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Zoological Research*, 2013, **34**(4): 406-410. [马吉敏, 匡友谊, 郑先虎, 等. 镜鲤(*Cyprinus carpio*)肌间刺数量微卫星标记筛选与相关性分析 [J]. 动物学研究, 2013, **34**(4): 406-410.]
- [65] Wan S M, Xiong X M, Tomljanovic T, *et al.* Identification and mapping of SNPs associated with number of intermuscular bone in blunt snout bream [J]. *Aquaculture*, 2019(507): 75-82.
- [66] Nie C H, Guan N N, Chen W Q, *et al.* Morphological comparison of intermuscular bones among hybrids of *Megalobrama* species [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2016, **51**(2): 241-252. [聂春红, 关柠楠, 陈文倩, 等. 鲂属鱼类杂交子代肌间骨的形态学比较 [J]. 动物学杂志, 2016, **51**(2): 241-252.]
- [67] Jiang W P, Jia Y Y, Liu S L, *et al.* Comparative analysis of intermuscular bones hybrid of F1, F2 of (*C. alburnus*) (♀) × (*M. amblycephala*) (♂) and its parents [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(2): 277-286. [蒋文桦, 贾永义, 刘士力, 等. 鲂鲢F1、F2及其亲本肌间骨的比较分析 [J]. 水生生物学报, 2016, **40**(2): 277-286.]
- [68] Zong Z Z. Comparative analysis of intermuscular bones in hybrid of (blunt snout bream × topmouth culter) (♀) × blunt snout bream (♂) and its parents [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2014: 12-23. [钟泽洲. 翘嘴鲮及其亲本肌间骨的比较分析 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2014: 12-23.]
- [69] Guo H H, Zheng G D, Wu C B, *et al.* Comparative analysis of the growth performance and intermuscular bone traits in F1, hybrids of black bream (*Megalobrama terminalis*) (♀) × topmouth culter (*Culter alburnus*) (♂) [J]. *Aquaculture*, 2018(492): 15-23.
- [70] Wu C, Huang X, Chen Q, *et al.* The formation of a new type of hybrid culter derived from a hybrid lineage of *Megalobrama amblycephala* (♀) × *Culter alburnus* (♂) [J]. *Aquaculture*, 2020(525): 735328.
- [71] Li Z, Zhou L, Wang W Z, *et al.* Comparative analysis of intermuscular bones between clone A⁺ and clone F strains of allogynogenetic gibel carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(4): 860-869. [李志, 周莉, 王忠卫, 等. 异育银鲫A⁺系和F系肌间骨的比较分析 [J]. 水生生物学报, 2017, **41**(4): 860-869.]
- [72] Li L, Zhong Z Z, Zeng M, *et al.* Comparative analysis of intermuscular bones in fish of different ploidies [J]. *Science China-life Sciences*, 2013, **43**(3): 5-16. [黎玲, 钟泽州, 曾鸣, 等. 不同倍性鱼肌间骨的比较分析 [J]. 中国科学: 生命科学, 2013, **43**(3): 5-16.]
- [73] Guan N N, Nie C H, Chen Y L, *et al.* Morphological characteristics of intermuscular bones in gynogenetic population of bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fisheries Science*, 2017, **36**(5): 596-600. [关柠楠, 聂春红, 陈宇龙, 等. 团头鲂雌核发育群体的肌间骨形态学分析 [J]. 水产科学, 2017, **36**(5): 596-600.]
- [74] Zhong Z, Niu P, Wang M, *et al.* Targeted disruption of *sp7* and *myostatin* with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp [J].

Scientific Reports, 2016, **6**(1): 22953.

- [75] Yang J, Tong G X, Zheng X H, *et al.* Comparative analysis of embryonic muscle development in wildtype zebrafish and its intermuscular bone deficiency mutant [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, **26**(2): 296-303. [杨建, 佟广香, 郑先虎, 等. 肌间刺缺失突变对斑马鱼胚胎发育过程中肌肉发育的影响 [J]. *中国水产*

科学, 2019, **26**(2): 296-303.]

- [76] Yang J, Tong G X, Zheng X H, *et al.* Comparative analysis of skeletal development between wildtype zebrafish and intermuscular bone-deficient mutants [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(3): 546-553. [杨建, 佟广香, 郑先虎, 等. 肌间刺缺失对斑马鱼骨骼发育的影响 [J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(3): 546-553.]

RESEARCH PROGRESS ON MOLECULAR REGULATION MECHANISM AND GENETIC SELECTION OF INTERMUSCULAR BONES IN TELEOSTS

WANG Xu-Dong^{1,2}, NIE Chun-Hong^{1,2} and GAO Ze-Xia^{1,2,3}

(1. Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China; 3. Hubei Province Famous Fish Breeding and Healthy Aquaculture Engineering Technology Research Center, Wuhan 430070, China)

Abstract: Intermuscular bones (IBs) are small spicule-like bones existing in the muscle fillet of fish and ossified from tendons, which only occur in lower teleosts. Most of the aquaculture fish species in the world, especially cyprinid fishes, contain a certain amount of IBs, which consequently affects the market value and processing industry of these species. Therefore, understanding the molecular regulation mechanism and conducting the genetic selection of IBs are worthwhile and meaningful for the world aquaculture industry, especially for carp species. Since 1967, more and more studies began to focus on the types, morphology and number of IBs among different fish species. With the evolution of fish, the IBs morphology evolved from simple to complex and then degenerate simple again. The two different types of ossification pattern have been observed during IBs' development, including ossification from posterior to the anterior regions, and from anterior to the posterior regions. Recently, with the development of high-throughput sequencing and molecular technology, a quite number of studies have been conducted and tried to uncover the molecular mechanisms of IBs development. The regulation functions of some genes, such as *scxa*, *osterix*, *bmps*, *tnm*, had been revealed. Among these genes, the *scxa* mutations based on Crispr/Cas9 system showed distinct reduction of mineralized IBs in zebrafish, *osterix* mutations in common carp had short length of IBs. These genes could be used as candidate genes to breed less or short IBs strains in other economic fish species with IBs. The omics data of IBs, including miRNA, mRNA, proteomics and genomics, have been established in several fish species, such as blunt snout bream, common carp, tambaqui, which would be useful to unveil the molecular regulation mechanisms of IBs development. As to the genetic selection of IBs, several technologies, such as selective breeding, hybridization, polyploid breeding, gynogenesis and gene editing, had been used to breed strains with less IBs number. The selective breeding studies had reported the moderate heritability values of IBs number in blunt snout bream and mirror carp, which indicate that it should be feasible to decrease the number of IBs through selective breeding. Some related SNPs and QTL with IBs number were also identified in these two species. The individuals totally losing IBs were identified in the grass carp gynogenetic population in China and in one tambaqui culture population in Brazil. These identified individuals offers the fantastic materials for understanding the genetic origin of this phenotype as well as founders to breed offspring without IBs. In the future, with the development of single cell transcriptomics and spatially resolved transcriptomics analysis, the molecular mechanism for tendon-derived stem cells differentiating into osteoblast in species with IBs could be clarified. Then the key genes could be screened out and their functions in IBs development can be clarified. Moreover, Genome wide association studies (GWAS) based on sequencing could be used to identify the genes/SNPs associated with IBs number and whole genome selection approach could be considered in some important species. In this review, we summarized all the related reports focusing on fish IBs' developmental molecular mechanism and genetic breeding, and the future directions are also discussed, which could dedicate basic data for less-IB or no-IB strains breeding program.

Key words: Fish; Aquaculture; Intermuscular bones; Development; Molecular mechanism; Breeding