

doi: 10.7541/2021.2020.129

大泷六线鱼仔稚鱼头部骨骼发育观察

张伟 刘莹 官曙光 于超勇 赵文溪 宋爱环 李绍彬

(山东省海洋生物研究院, 山东省海水养殖病害防治重点实验室, 山东省海水健康养殖工程技术研究中心, 青岛 266000)

摘要: 采用软骨-硬骨双染色方法, 对大泷六线鱼仔稚鱼头部骨骼的发育过程进行详细观察与分析。结果显示: 大泷六线鱼初孵仔鱼头部已存在迈克尔氏软骨、腭方骨、舌棒骨和第一基舌软骨等骨骼元件; 当仔鱼4 DPH时, 第二基鳃软骨出现在第一基鳃软骨后端, 缘带向后延伸, 且软骨桥出现, 将头盖骨分为前颌和后颌; 9 DPH时, 3对鳃下骨, 第五对角腮骨可见; 13 DPH时, 迈克尔氏软骨背中部突, 4对鳃上骨、鼻骨、中筛板和侧筛板相继出现; 16—21 DPH时, 基舌骨出现在第一基鳃软骨前方; 23 DPH时, 齿骨开始骨化; 26 DPH时, 前颌骨和上颌骨开始骨化; 至35 DPH时, 前颌骨和上颌骨完成骨化; 50 DPH时, 副蝶骨、前鳃盖骨、缘带、后翼骨、鼻骨和续骨完成骨化; 60 DPH时, 大泷六线鱼头部骨骼, 除舌棒骨外, 基本骨化完成。研究摸清了大泷六线鱼仔稚鱼头部骨骼不同骨元件的发育时序, 阐释了头部骨骼的发育规律及其特殊性, 为大泷六线鱼早期骨骼功能发育研究及头部骨骼畸形鉴定提供了科学依据。

关键词: 大泷六线鱼; 头部骨骼; 发育特征; 软骨-硬骨双染色方法; 骨化

中图分类号: Q174

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)04-0898-08



鱼类骨骼系统包括外骨骼与内骨骼, 外骨骼主要由鳞片和鳍条等组成, 内骨骼主要由主轴骨骼和附肢骨骼组成。鱼类骨骼发育方式可分为两种, 一种是由间充质细胞直接分化为骨细胞并骨化成骨骼, 即膜内化骨; 另一种是由间充质干细胞先分化为软骨细胞, 软骨细胞再经骨化成骨骼, 即软骨内化骨^[1, 2]。鱼类骨骼发育是一个非常复杂的过程, 其会影响鱼类的外部形态与功能需求^[3], 硬骨鱼类因种类不同, 在骨骼发育方面存在明显的差异, 目前, 国内外很多学者已围绕鱼类骨骼系统发育开展了大量的研究, 摸清了鳊(*Siniperca chuatsi*)^[1]、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)^[4]、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[5]和远东拟沙丁鱼(*Sardinops melanostictus*)^[6]等硬骨鱼类的骨骼发育时序规律, 研究发现, 鱼类早期骨骼发育遵循头部优先发育的原则, 且骨骼早期发育时序的不同与仔、稚鱼的胚后功能发育和对环境的适应性密切相关。

大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)隶属于六线

鱼科Hecagrammidae、六线鱼属*Hexagrammos*, 为冷温性近海底层鱼类, 主要分布于朝鲜、日本及中国黄渤海海域, 在我国山东和辽宁等地的近海多岩礁海区分布广泛^[7]。因大泷六线鱼肉质细腻、味道鲜美、生长迅速、经济价值较高, 故其不仅是我国北方网箱养殖的理想种类, 也是开拓礁湾增殖和发展游钓业的理想品种^[8]。目前, 对于大泷六线鱼的研究主要集中在繁育生物学、遗传学、资源评价和生态生长特性等方面的研究^[7, 9, 10], 在大泷六线鱼早期发育方面, 胡发文等^[11, 12]对大泷六线鱼胚胎发育过程中各期特征及发育时间进行了详细的观察记录, 同时也对仔稚鱼头部和尾部等外部形态发育过程进行了详细的描述; 于超勇等^[13]对大泷六线鱼仔稚鱼脊柱及附肢骨骼系统的发育过程进行了详细的观察与分析。但是, 目前国内外尚未有对大泷六线鱼仔稚鱼的头部骨骼早期发育过程的详细描述。头部骨骼作为鱼类骨骼的重要组成部分, 与鱼类摄食和呼吸功能发育密切相关, 同时头部的畸形

收稿日期: 2020-06-01; 修订日期: 2021-04-20

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系鱼类产业创新团队(SDAIT-12-02); 山东省农业良种工程项目(2019LZGC013); 山东省重点研发计划(2019GHY112011)资助 [Supported by the Modern Agricultural Industrial Technology System of Shandong Province (SDAIT-12-02); Agricultural Variety Improvement Project of Shandong Province (2019LZGC013); Key Research and Development Project of Shandong Province (2019GHY112011)]

作者简介: 张伟(1981—), 男, 助理研究员, 硕士; 研究方向为海水养殖。E-mail: 116620590@qq.com

通信作者: 刘莹(1990—), 女, 助理研究员, 硕士; 研究方向为海水养殖。E-mail: 731476795@qq.com

发育也会对苗种的存活率产生极大的影响^[14], 盖珊瑚等^[15]对在人工繁育大泷六线鱼仔稚鱼骨骼畸形进行统计与分析时发现, 头部骨骼畸形的主要发生时期为16—20 DPH(孵化后日龄), 且为仔稚鱼变态期高死亡率的主要原因, 因此摸清大泷六线鱼头部骨骼早期发育规律, 对于有效鉴定人工繁育过程中头部骨骼畸形的发生至关重要。本研究通过软骨-硬骨双染色方法^[16], 对大泷六线鱼的仔稚鱼发育过程中头骨的形态变化进行连续观察与分析, 摸清了大泷六线鱼仔稚鱼头部骨骼不同骨元件的发育时序与骨化阶段, 阐释了头部骨骼的生长发育规律与其特殊性, 旨在为揭示大泷六线鱼头部骨骼早其发育与摄食功能之间的关系提供科学依据, 同时, 为提升人工繁育条件下大泷六线鱼畸形鉴定水平及丰富大泷六线鱼早期生活史奠定基础。

1 材料与方法

1.1 大泷六线鱼仔稚鱼培育

大泷六线鱼仔、稚鱼早期发育的各阶段样本取自威海圣航水产科技有限公司。实验亲鱼取自大连黑石礁海区海上网箱养殖的2—3龄大泷六线鱼, 室内标准条件养殖, 利用腹部挤压法获得卵及精液, 将卵与精液混合均匀, 令鱼卵整形为大小为10—15 cm左右的方形、厚度为2—3层鱼卵的平面薄片, 2min后加入海水, 15min后受精卵片凝固变硬, 将卵片置于水槽中, 流水孵化。孵化条件为: 水温16—17℃, 盐度28—30, pH 7.8—8.2, 溶解氧 ≥ 5 mg/L, 光照强度为500 lx。受精卵经过21d左右可孵化出仔鱼; 初孵仔鱼转移到培育池中, 养殖水温为14—15℃, 盐度28—30, pH 7.8—8.2, 溶解氧 ≥ 5 mg/L, 曝气, 光照强度控制在500—1000 lx; 从初孵仔鱼至5 DPH为静水培育, 6 DPH后随鱼苗的生长逐步增大换水量, 6—20 DPH换水量为60%, 21—40 DPH换水量为100%, 41—60 DPH换水量达150%, 60日龄后随鱼苗的生长及摄食量的增加, 换水量达200%到400%; 大泷六线鱼仔鱼孵化后, 即已开口, 鱼苗孵化初期至25 DPH, 每日向培育池中添加新鲜小球藻, 5—25 DPH投喂轮虫, 10—60 DPH投喂卤虫无节幼体, 50 DPH后开始投喂配合饵料。

1.2 大泷六线鱼仔稚鱼样本采集及保存

自大泷六线鱼仔鱼孵化后, 每天早上投喂饵料前, 自2个培育池中分别随机取样50—60个, 每组样品随机取20尾仔鱼进行观察分析, 采样策略为: 初孵仔鱼至31 DPH每日取样1次, 35—60 DPH每5日取样1次; 在样品采集后, 用MS-222进行麻醉, 待仔

稚鱼完全沉入烧杯底部后, 将其收集存入10%甲醛溶液中, 置于4℃冰箱中保存, 保存期间定期更换新鲜10%甲醛溶液。

1.3 大泷六线鱼仔稚鱼骨骼染色方法

大泷六线鱼仔稚鱼骨骼染色方法主要参照杨安峰^[16]采用的软骨-硬骨双染色方法, 其操作步骤主要包括蒸馏水清洗浸泡、软骨染色液(10 mg阿利新蓝8GX+80 mL 95%乙醇溶液+20 mL冰乙酸)染色、纯乙醇脱水(浸泡1—3d)、乙醇溶液梯度复水(95%、75%、40%和15%)、胰蛋白酶溶液(30 mL饱和硼酸钠水溶液+70 mL蒸馏水+1 g胰蛋白酶)消化处理、硬骨染色液(0.5%KOH+足够的茜素红饱和溶液, 直至溶液呈现深紫色)染色、0.5%KOH-甘油合剂梯度脱色(3:1、1:1和1:3)、3% H_2O_2 溶液色素漂白、加有麝香草酚的纯甘油密封保存。

1.4 大泷六线鱼骨骼染色标本观察及相关数据采集

染色处理好的仔稚鱼样品在Olympus SZ61型体视显微镜下进行观察, 详细记录仔稚鱼各发育时期的头部骨骼特征进行观察, 并利用数码相机显微照相进行照片采集, 采集的图像用Adobe Photoshop CS软件(www.photoshop.com)进行处理。从初孵仔鱼到60日龄仔稚鱼的全长用游标卡尺测量(0.01 mm)。所有的全长数据均用SPSS 16.0软件(www.ibm.com)进行分析, 统计数据表现为Mean $\pm$ SD的形式。

2 结果

2.1 大泷六线鱼颅骨发育过程

大泷六线鱼初孵仔鱼已具备骨小梁、第一基鳃软骨、4对角鳃骨和筛板等颅骨骨骼元件(初孵仔鱼, 图版 I -1), 此外缘带出现在眼睛上方; 当仔鱼全长达到(6.71 $\pm$ 0.27) mm(4 DPH, 图版 I -2)时, 第二基鳃软骨出现在第一基鳃软骨后端, 缘带向后延伸, 软骨桥出现, 将头盖骨分为前卤和后卤, 当全长达到(8.52 $\pm$ 0.16) mm(9 DPH, 图版 I -3)时, 3对鳃下骨, 第五对角鳃骨可见(表 1), 全长至(10.12 $\pm$ 0.31) mm(13 DPH, 图版 I -4)时, 4对鳃上骨、鼻骨、中筛板和侧筛板相继出现; 全长至(25.16 $\pm$ 1.36) mm(35 DPH, 图版 I -8)时, 顶骨和额骨出现, 鼻骨开始发生骨化, 另外, 角鳃骨从中间开始骨化, 第一基鳃软骨与鳃下骨的连接处开始骨化; 全长至(31.43 $\pm$ 1.54) mm(50 DPH, 图版 I -9)时, 副蝶骨出现, 缘带和鼻骨完成骨化; 最后, 筛板开始发生骨化(表 1), 至全长为(35.38 $\pm$ 2.79) mm(60 DPH, 图版 I -10)时, 大泷六线鱼颅骨骨骼骨化完成。

表 1 大泷六线鱼仔稚鱼头部骨骼发育时序

Tab. 1 The time and progress of cranium development corresponding total length (TL) in *Hexagrammos otakii*

骨元件 Skeletal element	全长Total length (mm)						
	5	10	15	20	25	30	35
颅骨Cranium							
副蝶骨Parasphenoid			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
筛板Ethmoid plate						~~~~~	~~~~~
鼻骨Nasal						~~~~~	~~~~~
中筛板Mesethmoid						~~~~~	~~~~~
侧筛板 Lateral ethmoid							~~~~~
骨小梁Trabeculae				=====	=====	=====	=====
筛骨软骨Ethmoid cartilage							
缘带Taenia marginalis						~~~~~	~~~~~
顶骨Parietal			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
额骨Frontal			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
鳃上骨Epibranchial						~~~~~	~~~~~
基鳃软骨1Basibranchial cartilages 1						~~~~~	~~~~~
基鳃软骨2Basibranchial cartilages 2						~~~~~	~~~~~
角鳃骨Ceratobranchial						~~~~~	~~~~~
鳃下骨Hypobranchial						~~~~~	~~~~~
颌骨Jaw bone							
上颌骨Maxillary			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
前颌骨Premaxillary			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
齿骨Dentary			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
舌续骨Hyosymplectic						=====	=====
腭方骨Palatoquadrate						=====	=====
角骨Angular						~~~~~	~~~~~
迈克尔氏软骨Meckel's cartilage						=====	=====
舌棒骨Hyoid bar						~~~~~	~~~~~
下舌骨Hypohyal						~~~~~	~~~~~
基舌骨Basihyal						~~~~~	~~~~~
茎舌骨Stylohyal						~~~~~	~~~~~
板状骨Palate							
后翼骨Metapterygoid						~~~~~	~~~~~
外翼骨Ectopterygoid						~~~~~	~~~~~
续骨Symplectic			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
内翼骨Endopterygoid						~~~~~	~~~~~
舌颌骨Hyomandibular			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
方骨Quadrate			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
鳃盖Opercular							
鳃盖骨Opercle			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
前鳃盖骨Preopercle			~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
间鳃盖骨Interopercle				~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
下鳃盖骨Subopercle						~~~~~	~~~~~

注:—软骨Element in cartilaginous; ~硬骨element in ossified state; =骨骼退化element degenerated

2.2 大泷六线鱼仔稚鱼颌骨发育过程

大泷六线鱼初孵仔鱼已存在部分颌骨软骨元件, 如: 迈克尔氏软骨、腭方骨、舌棒骨、舌续骨和下舌骨等, 全长至 (10.12 ± 0.31) mm(13 DPH, 图版 I -4)时, 迈克尔氏软骨背中部突出, 翼骨突出在腭方骨前端并向筛板方向延伸, 舌棒骨后端逐渐变宽; 全长至 (12.22 ± 0.42) — (16.17 ± 0.40) mm时(16—21 DPH, 图版 I -5、6), 基舌骨出现在第一基鳃软骨前方, 与此同时, 下舌骨、上颌骨、前颌骨和鳃丝相继出现, 迈克尔氏软骨前端逐步发生退化; 全长至 (18.02 ± 1.27) mm(23 DPH, 图版 I -7)时, 齿骨开始骨化, 齿骨为大泷六线鱼骨骼中最先发生硬骨化的骨骼元件; 全长至20.00 mm(26 DPH)时, 前颌骨和上颌骨开始骨化; 至全长为 (25.16 ± 1.36) mm(35 DPH, 图版 I -8)时, 前颌骨和上颌骨骨化完成, 大泷六线鱼腭方骨已逐渐退化形成方骨, 舌续骨也逐渐退化形成续骨和舌颌骨, 另外, 同角鳃骨相同, 舌骨棒从中间开始骨化, 全长至 (31.43 ± 1.54) mm(50 DPH, 图版 I -9)时, 基舌骨和下舌骨开始发生骨化, 至全长为 (35.38 ± 2.79) mm(60 DPH, 图版 I -10)时, 大泷六线鱼颌骨骨骼中, 除舌棒骨外, 基本骨化完成(表 1)。

2.3 大泷六线鱼仔稚鱼板状骨与鳃盖骨发育过程

板状骨: 后翼骨、外翼骨和内翼骨于35 DPH前后出现软骨并于50 DPH逐渐开始硬骨化, 而续骨、舌颌骨和方骨则于26—35 DPH期间直接发育为硬骨(表 1)。

鳃盖: 前鳃盖骨和鳃盖骨于26 DPH前后直接以硬骨化的形态出现, 而下鳃盖骨和间鳃盖骨则于35 DPH前后以硬骨化形态出现; 全长至 (31.43 ± 1.54) mm(50 DPH, 图版 I -9)时, 后翼骨和前鳃盖骨完成骨化, 同时, 角鳃骨由中间向两端骨化, 鳃盖骨、下鳃盖骨及鳃盖条发生骨化(表 1)。

3 讨论

3.1 大泷六线鱼仔稚鱼头部骨骼发育与早期摄食能力的适应性关系

鱼类骨骼发育过程非常复杂, 其头部骨骼尤为细碎繁琐, 而头部骨骼早期发育时序与不同鱼种仔稚鱼对环境的适应息息相关^[17]。本文通过双染色法对大泷六线鱼的头骨发育进行了最直观的观察与分析, 比较清晰地观察到了头部不同骨骼的发育时序及骨化顺序, 大泷六线鱼仔稚鱼头部骨骼的变化明显的反映出与摄食功能需要的统一。

与亚东鲑(*Salmo trutta fario*)^[18]和海水青鳉(*Oryzias melastigma*)^[19]相似, 大泷六线鱼头部骨骼发育始于胚胎时期, 初孵仔鱼已具备迈克尔氏软骨、骨

小梁和角鳃骨等与仔鱼摄食相关的头骨元件。相比于大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[20]和赤点石斑鱼^[5]等鲈形目鱼类初孵仔鱼无任何头部骨骼元件, 大泷六线鱼可以更早地应用头部骨骼进行外源性养分的捕食摄取, 这无疑可以大幅提高其仔鱼的生存率, 更加适应北方海域尤其是秋冬季的严寒及食物短缺^[21, 22]。在鱼类早期个体发育过程中, 从内源性营养转变为外源性营养是一个非常关键的时期, 尤其是与摄食相关骨骼的发育, 头部骨骼在这一时期由简单结构逐步发育为具有功能分区的复杂结构。与邱丽华等^[23]的报道相似, 6 DPH, 在腭方骨、舌棒骨、舌续骨和下舌骨等骨骼的发育情况下, 大泷六线鱼颌弓初步成型, 颌弓对仔鱼口部的启闭和捕食十分重要, 六线鱼开始开口捕食外源性食物, 该阶段标本腹部观察到的轮虫幼虫残体可印证这一结论; 8—48 DPH, 颌骨、方骨、顶骨、额骨和鼻骨已相继骨化, 颌弓由软骨转变为硬骨增强了仔鱼的咬合能力和吞咽能力和舌弓硬骨化加强了脑颅与咽颅的连接而将颌弓紧紧悬系在脑颅上和颌弓的硬骨化使得咽齿逐渐发育完善可对捕食物初步加工并进一步增强捕食能力和鳃盖的硬骨化则提高了鳃的呼吸功能使得仔鱼运动嗅探能力大幅提升, 此时仔鱼从刚具备采食轮虫幼体的能力发展到捕食相对更加凶猛和更大型的卤虫成体, 捕食能力不断加强, 大量的外源性营养摄入体内, 因此大泷六线鱼进入快速生长期, 这与胡发文等^[12]的研究相吻合; 49—60 DPH, 大泷六线鱼头骨骨骼除舌棒骨外基本骨化完成, 脑颅鼻区和耳区的逐步成熟其嗅探能力和体调节平衡能力不断提升, 而咽颅颌弓、舌弓、鳃弓和鳃盖骨的硬化成熟则显著提升了仔稚鱼的咬合、捕食和吞咽能力, 此阶段大泷六线鱼已可以采食比卤虫更加坚硬的配合饵料, 幼鱼生长渐趋稳定。综上所述, 大泷六线鱼头部骨骼的发育为其外源性摄食能力的建立与逐级增强提供了基本条件。

3.2 大泷六线鱼仔稚幼鱼头部骨骼的发育特殊性

不同鱼类仔稚鱼头部骨骼发育时序不尽相同, 就发育周期而言, 大泷六线鱼头部骨骼发育耗时较长, 大泷六线鱼头部骨骼发育始于胚胎时期, 60日龄基本发育完全, 发育耗时较日本鬼鲉(*Inimicus japonicus*)^[24]和大黄鱼^[25]等硬骨鱼类长, 这可能与大泷六线鱼低温生长环境有关。

与偏向植食性的杂食性鱼类团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[26]相比, 偏肉食性的大泷六线鱼与其头骨发育有诸多不同之处, 团头鲂初孵仔鱼咽骨发育并不完善, 但其上颌骨和鳃盖骨在孵化后

4—5 DPH即可膜质化, 为保证团头鲂的正常呼吸与摄食, 其鳃弓软骨和咽齿于卵黄囊消失前就开始出现, 但其鼻区发育较为迟缓。而在大泷六线鱼的头骨发育过程中, 呼吸与摄食相关的头部骨骼也较早发育, 大泷六线鱼鳃基软骨、角腮骨和鳃下骨主要集中在4—9 DPH发育, 这部分骨骼所包裹的鳃腔为仔鱼鳃丝的发育提供了优良条件, 保证了仔鱼的正常呼吸; 舌续骨、腭方骨、迈克尔氏软骨背部中突、舌棒骨和茎舌骨集中在4—9 DPH发育, 这部分骨骼支撑包裹口腔以保护其内部器官的发育, 如牙齿的发育就主要依靠颌骨中的腭骨为基础, 这部分骨骼的发育为仔鱼能够进行强有力的捕食活动奠定了坚实的基础; 但大泷六线鱼在孵化之初最先发育的头部骨骼为筛板、侧筛板、骨小梁和缘带, 这部分骨骼主要围绕鼻区发育, 主要作用是包裹形成鼻囊以保护其内部嗅觉器官的发育, 提升六线鱼嗅探外源营养的能力, 由此可以推测, 相较于植食性鱼类, 嗅觉在肉食性大泷六线鱼早期摄食过程中起到重要作用。与此同时, 通过观察实验结果我们发现: 相较于鼻区、鳃弓和舌弓的优先发育, 大泷六线鱼眼区和耳区的发育相对滞后, 蝶骨、顶骨和翼骨系的骨化甚至要等到20—25 DPH才能开始, 这种发育模式的形成可能是由于在大泷六线鱼进化历程中, 为了在生存竞争中赢得优势, 自然选择优先筛选出嗅探、捕食和吞咽能力最为突出的家系, 而淘汰了以视觉与听觉为优势的家系。

本实验通过对大泷六线鱼头骨的发育过程进行观察与分析, 确定了大泷六线鱼头部骨骼发育时序及特征, 有助于进一步了解其早期发育阶段的功能趋向。

参考文献:

- [1] Cao X Y, Zhao J L, Chen X W, et al. Early ossification of the skeletal system in larval and juvenile *Siniperca chuatsi* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(2): 304-313. [曹晓颖, 赵金良, 陈晓武, 等. 鳊仔稚鱼骨骼系统骨化发育 [J]. *中国水产科学*, 2019, 26(2): 304-313.]
- [2] Gavaia P J, Dinis M T, Cancela M L. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) [J]. *Aquaculture*, 2002, 211(1-4): 305-323.
- [3] Gao X Q, Liu Z Q, Guan C T, et al. Skeletal development and abnormalities of the vertebral column and fins in larval stage of hatchery-reared American shad, *Alosa sapidissima* [J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(7): 2376-2392.
- [4] Lü X J, Wang Y N, Liu Q H, et al. Research on skeletal development and allometric growth in larval and juvenile

- Epinephelus lanceilatus* [J]. *Marine Sciences*, 2018, **42**(5): 116-121. [吕雪娇, 王雨浓, 刘清华, 等. 鞍带石斑鱼仔稚幼鱼骨骼发育与生长特性研究 [J]. *海洋科学*, 2018, **42**(5): 116-121.]
- [5] Park J Y, Han K H, Cho J K, *et al.* Early osteological development of larvae and juveniles in red spotted grouper, *Epinephelus akaara* (Pisces: Serranidae) [J]. *Development & Reproduction*, 2016, **20**(2): 87-101.
- [6] Matsuoka M. Osteological development in the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus* [J]. *Ichthyological Research*, 1997, **44**(2): 275-295.
- [7] Yu Y Q, Tian T, Chen Y, *et al.* Growth performance of fat greenling *Hexagrammos otakii* in artificial reef areas in Zhangzi Island [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, **31**(2): 205-210. [于亚群, 田涛, 陈勇, 等. 獐子岛深水人工鱼礁区大泷六线鱼生长特性研究 [J]. *大连海洋大学学报*, 2016, **31**(2): 205-210.]
- [8] Gao F X, Pan L, Hu F W, *et al.* Morphological characteristics and structure of digestive system of *Hexagrammos otakii* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, **33**(2): 24-28. [高凤祥, 潘雷, 胡发文, 等. 大泷六线鱼的外形特征与消化系统结构 [J]. *渔业科学进展*, 2012, **33**(2): 24-28.]
- [9] Pan L, Hu F W, Gao F X, *et al.* Study of artificial breeding and seedling culture technique for greenling *Hexagrammos otakii* [J]. *Marine Sciences*, 2012, **36**(12): 39-44. [潘雷, 胡发文, 高凤祥, 等. 大泷六线鱼人工繁殖及育苗技术初步研究 [J]. *海洋科学*, 2012, **36**(12): 39-44.]
- [10] Hu F W, Guo W, Pan L, *et al.* Morphological development and growth of larval and juvenile *Hexagrammos otakii* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, **33**(6): 16-22. [胡发文, 郭文, 潘雷, 等. 大泷六线鱼仔稚幼鱼形态发育与生长特性 [J]. *渔业科学进展*, 2012, **33**(6): 16-22.]
- [11] Hu F W, Pan L, Gao F X, *et al.* Embryonic development of *Hexagrammos otakii* and its relationship with incubation temperature [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, **33**(1): 28-33. [胡发文, 潘雷, 高凤祥, 等. 大泷六线鱼胚胎发育及其与水温的关系 [J]. *渔业科学进展*, 2012, **33**(1): 28-33.]
- [12] Hu F W, Zhang S C, Wang X, *et al.* An artificial breeding technique for green *Hexagrammos otakii* [J]. *Marine Sciences*, 2016, **40**(3): 71-76. [胡发文, 张少春, 王雪, 等. 大泷六线鱼全人工繁育技术研究 [J]. *海洋科学*, 2016, **40**(3): 71-76.]
- [13] Yu C Y, Guan S G, Yu D D, *et al.* Development of vertebral column and appendicular skeleton in larvae and juveniles of fat greenling *Hexagrammos otakii* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, **35**(1): 47-55. [于超勇, 官曙光, 于道德, 等. 大泷六线鱼仔稚鱼脊柱及附肢骨骼系统的发育观察 [J]. *大连海洋大学学报*, 2020, **35**(1): 47-55.]
- [14] Zheng K, Yue H, Zheng P L, *et al.* Skeletal ontogeny and deformities in commercially cultured marine fish larvae [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, **23**(1): 250-261. [郑珂, 岳昊, 郑攀龙, 等. 海水养殖鱼类仔、稚鱼骨骼发育与畸形发生 [J]. *中国水产科学*, 2016, **23**(1): 250-261.]
- [15] Gai S S, Guan S G, Yu C Y, *et al.* Skeletal deformities in the larvae and juveniles of hatchery-reared *Hexagrammos otakii* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, **35**(4): 544-550. [盖珊珊, 官曙光, 于超勇, 等. 人工繁育大泷六线鱼仔稚鱼的骨骼畸形观察 [J]. *大连海洋大学学报*, 2020, **35**(4): 544-550.]
- [16] Yang A F. Double staining technique of cartilage and hard bone [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1987(2): 40-41. [杨安峰. 硬骨-软骨双染色技术 [J]. *动物学杂志*, 1987(2): 40-41.]
- [17] Koumoundouros G, Divanach P, Kentouri M. Osteological development of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae): dorsal, anal, paired fins and squamation [J]. *Marine Biology*, 2001, **138**(2): 399-406.
- [18] Hao F H, Chen Y F, Cai B. Embryonic development of *Salmo trutta fario* from Yadong River, Tibet [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30**(3): 289-296. [豪富华, 陈毅锋, 蔡斌. 西藏亚东鲑的胚胎发育 [J]. *水产学报*, 2006, **30**(3): 289-296.]
- [19] Wang X J, Xiao X, Li C, *et al.* Impact of ocean acidification on skeletal development in embryonic marine medaka [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2015, **37**(12): 116-122. [王晓杰, 肖潇, 李超, 等. 海洋酸化对海水青鳞胚胎骨骼发育的影响 [J]. *海洋学报*, 2015, **37**(12): 116-122.]
- [20] Lv X J, Xu S H, Liu Q H, *et al.* Osteological ontogeny and allometric growth in larval and juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Aquaculture*, 2019(498): 351-363.
- [21] Ji D P, Bian X D, Song N, *et al.* Feeding ecology of *Hexagrammos otakii* in Lidao Rongcheng [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(9): 1399-1409. [纪东平, 卞晓东, 宋娜, 等. 荣成俚岛大泷六线鱼摄食生态研究 [J]. *水产学报*, 2014, **38**(9): 1399-1409.]
- [22] Xu L L, Xue Y, Xu B D, *et al.* Feeding ecology of *Hexagrammos otakii* in Haizhou Bay [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, **25**(3): 608-620. [许莉莉, 薛莹, 徐宾铎, 等. 海州湾大泷六线鱼摄食生态研究 [J]. *中国水产科学*, 2018, **25**(3): 608-620.]
- [23] Qiu L H, Qin K J, Wu L X, *et al.* The feeding intensity of fat greenling larval under different illumination [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1999, **34**(5): 4-7. [邱丽华, 秦克静, 吴立新, 等. 光照对大泷六线鱼摄食量的影响 [J]. *动物学杂志*, 1999, **34**(5): 4-7.]
- [24] Cui G Q, Chen A Q, Lü W Q, *et al.* Early development of the vertebral column and the appendicular skeleton in the *Inimicus japonicas* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, **37**(2): 230-238. [崔国强, 陈阿琴, 吕为群, 等. 日本

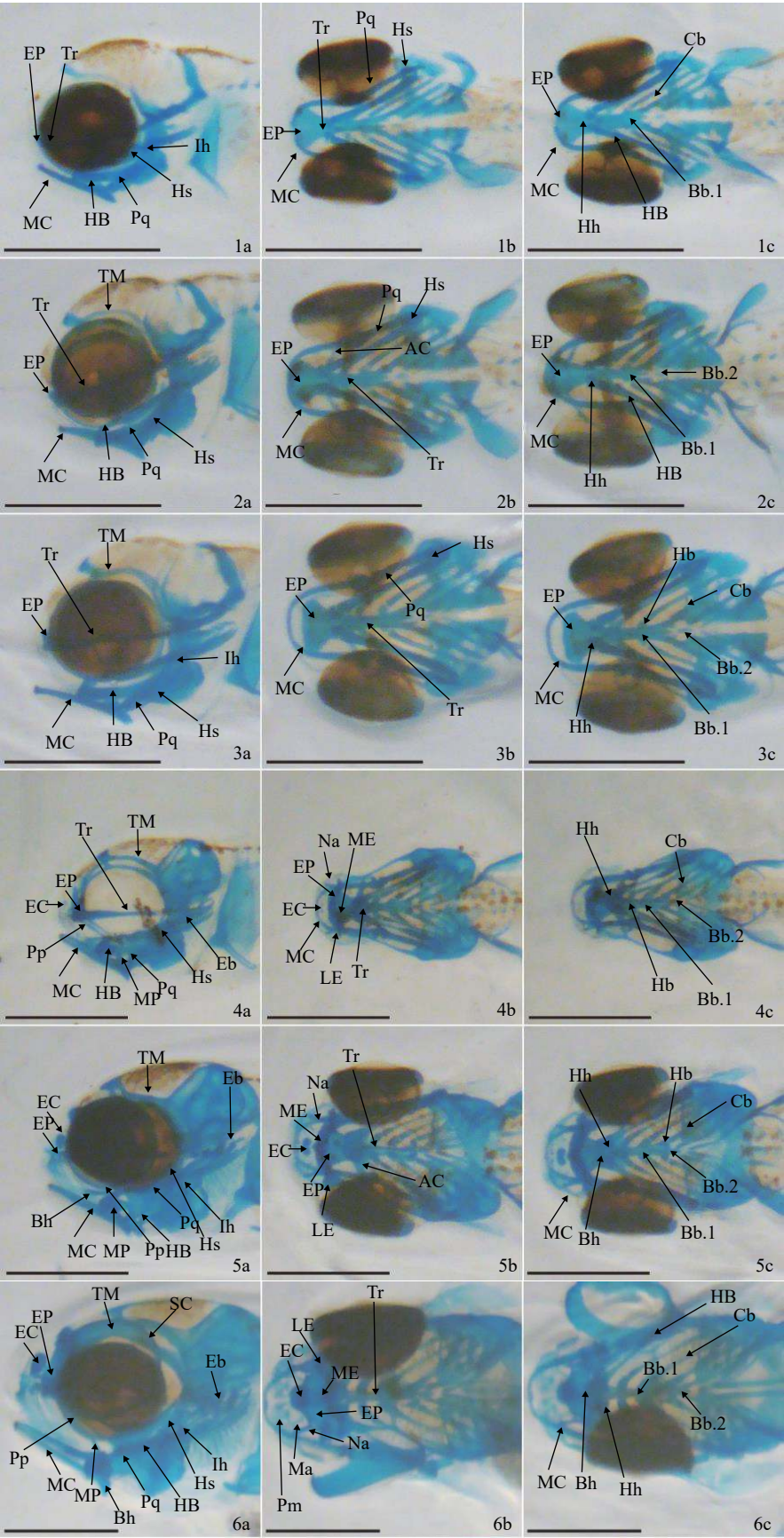
- 鬼鲇脊柱和附肢骨骼的早期发育 [J]. 水产学报, 2013, 37(2): 230-238.]
- [25] Wang Q R, Ni Y Y, Lin L M, *et al.* Development of the vertebral column and the pectoral and caudal fins in larvae of the large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(3): 467-472. [王秋荣, 倪玥莹, 林利民, 等. 大黄鱼仔稚鱼脊柱、胸鳍及尾鳍骨骼系统的发育观察 [J]. 水生生物学报, 2010, 34(3): 467-472.]
- [26] Zhao J, Chen X L. Development of the skull of *Megalobrama skolkovii* and its adaptive signification [J]. *Zoological Research*, 1995, 16(4): 307-314. [赵俊, 陈湘舜. 鲢鱼的头骨发育及其适应意义 [J]. 动物学研究, 1995, 16(4): 307-314.]

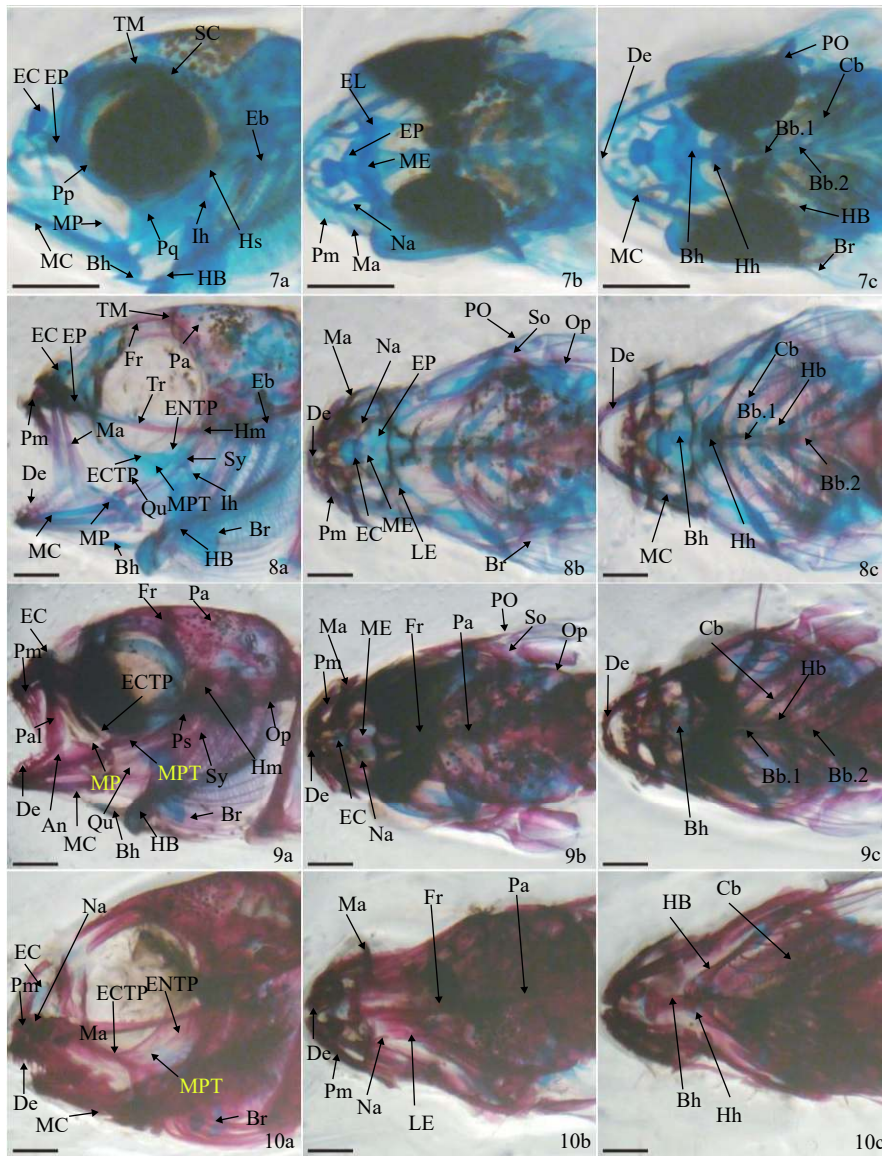
OBSERVATION ON THE DEVELOPMENT OF THE HEAD BONES OF THE LARVAE AND JUVENILES OF *HEXAGRAMMOS OTAKII*

ZHANG Wei, LIU Ying, GUAN Shu-Guang, YU Chao-Yong, ZHAO Wen-Xi, SONG Ai-Huan and LI Shao-Bin
(Shandong Key Laboratory of Disease Control in Mariculture, Healthy Mariculture Engineering Research Center of Shandong Province, Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266000, China)

Abstract: The fat greenling (*Hexagrammos otakii*) is a commercially important fish in North China. It is not only an ideal species for cage culture, but also optimal for expanding reef bays and developing recreational fishing. Scholars have carried out research on the fat greenling's embryonic development, early morphology development, as well as spine and appendicular bone development. However, there is a lack of studies on its skull development. This study intends to show the skeletal framework of the fat greenling's head. It also aims to determine the key processes of bone ossification and timing of development to understand the close relationship between its skull growth and functional development such as feeding and breathing. Samples of the fat greenling larvae were taken once every day and once every 5 days for 0—31 DPH and 35—60 DPH, respectively. The double staining of cartilage and bone procedure was used to analyze the skeletal development of newly hatched fat greenling larvae. The results showed that there were many skeletal elements in the head of the newly hatched fat greenling larvae, including Meckel's cartilage, palatoquadrate, Hyoidbar and Basibranchial 1. At 4 DPH, the Basibranchial 2 appeared at the posterior end of the Basibranchial1, and the marginal zone extended backwards. The cartilage bridge then emerged, and the skull was divided into anterior and posterior fontanelles. At 9 DPH, 3 pairs of Hypobranchial bones and the fifth pair of Ceraobranchial were visible. At 13 DPH, the Meckelian cartilage protruded on the middorsal part, and four pairs of Epibranchial, nasal bone, Lateral Ethmoid and Etmoidplate appeared successively. At 16—21 DPH, the Basihyal appeared in front of the Basibranchial1. At 23 DPH, the dentary bone began to ossify while the premaxillary and superior maxillary bones started to ossify at 26 DPH, and the ossification process completed at 35 DPH. The ossification of parasphenoid bone, preoperculum, *Taenia marginalis*, metapterygoid bone, nasal bone and symplectic bone was completed at 50 DPH. At 60 DPH, except the Hyoidbar bone, the skeletal framework of the fat greenling's head was completely ossified. The results showed that it takes a long time for the development of the fat greenling's skeletal framework, and the early growth of its skull is closely related to the enhancement of the feeding and respiratory capacity of the larvae. The results of this study not only explain the growth and development process of the fat greenling's skull, but also provide scientific basis for early functional development research and identification of skull deformities.

Key words: *Hexagrammos otakii*; Head bones; Developmental characteristics; The clearing and staining technique of cartilage and bone; Ossification





图版 I 大泷六线鱼仔稚鱼头部骨骼发育时序

Plate I Time and developmental process of the skeleton in head of larva and juvenile *H. otakii*

1. 仔鱼全长(6.00±0.31) mm (初孵仔鱼); 2. 仔鱼全长(6.71±0.27) mm (4 DPH); 3. 仔鱼全长(8.52±0.16) mm (9 DPH); 4. 仔鱼全长(10.12±0.31) mm (13 DPH); 5. 仔鱼全长(12.22±0.42) mm (16 DPH); 6. 仔鱼全长(16.17±0.40) mm (21 DPH); 7. 仔鱼全长(18.02±1.27) mm (23 DPH); 8. 仔鱼全长(25.16±1.36) mm (35 DPH); 9. 仔鱼全长(31.43±1.54) mm (50 DPH); 10. 仔鱼全长(35.38±2.79) mm (60 DPH); An: 角骨; Bb.1. 第一鳃基软骨; Bb.2. 第二鳃基软骨; Bh. 基舌骨; Br. 鳃盖骨; Cb. 角腮骨; De. 匙骨; EP. 筛板; EC. 筛骨软骨; Eb. 鳃上骨; Fr. 额骨; HB. 舌棒骨; Hb. 鳃下骨; Hh. 下舌骨; Hs. 舌续骨; Hm. 舌颌骨; Io. 间鳃盖骨; LE. 侧筛板; MC. 迈克尔氏软骨; Ma. 上颌骨; ME. 中筛骨; MPT. 后翼骨; MP. 背中部突; Na. 鼻骨; Op. 鳃盖; Pal. 上颌; Pm. 前颌骨; Pp. 翼骨突; Pq. 颞方骨; Pa. 顶骨; Po. 前鳃盖骨; Ps. 副蝶骨; Qu. 方骨; Sy. 续骨; So. 下鳃盖骨; Tr. 骨小梁; TM. 缘带; Uh. 尾舌骨; 1a—10a为侧面观(Side view), 1b—10b为背面观(Back view), 1c—10c为腹面观(Ventral view), 比例尺: 1 mm (1—10)

1. at (6.00±0.31) mm TL (0 DPH); 2. at (6.71±0.27) mm TL (4 DPH); 3. at (8.52±0.16) mm TL (9 DPH); 4. at (10.12±0.31) mm TL (13 DPH); 5. at (12.22±0.42) mm TL (16 DPH); 6. at (16.17±0.40) mm TL (21 DPH); 7. at (18.02±1.27) mm TL (23 DPH); 8. at (25.16±1.36) mm TL (35 DPH); 9. at (31.43±1.54) mm TL (50 DPH); 10. at (35.38±2.79) mm TL (60 DPH); An. Angular; Bb.1. Basibranchial1; Bb.2. Basibranchial2; Bh. Basihyal; Br. Branchiostegal; Cb. Ceraobranchial; De. Dentary; EP. Etmoidplate; EC. Etmoidcartilage; Eb. Epibranchial; Fr. Frontal; HB. Hyoidbar; Hb. Hypobranchial; Hh. Hypohyal; Hs. Hyosymplectic; Hm. Hyomandibular; Io. Interopercle; LE. Lateral Etmoid; MC. Meckel's cartilage; Ma. Maxillary; ME. Mesethmoid; MPT. Metaoterygoid; MP. Mediodorsalprocess; Na. Nasal; Op. Opercle; Pal. Palatine; Pm. Premaxillary; Pp. Pterygoidprocess; Pq. Palatoquadrate; Pa. Parietal; Po. Preopercle; Ps. Parasphenoid; Qu. Quadrate; Sy. Symplectic; So. Subopercle; Tr. Trabeculae; TM. Taenia marginalis; Uh. Urohyal bone; Scale bar: 1 mm (1—10)