



军曹鱼仔稚鱼脊柱和附肢骨骼的发育特征

毛非凡, 陈刚*, 马骞*, 周启苓, 施钢, 黄建盛, 邝杰华
(广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524025)

摘要: 为探明军曹鱼仔稚鱼早期脊柱及附肢骨骼的发育特征, 本研究采用软骨-硬骨双染色技术, 分别利用阿利新兰、茜素红对软骨、硬骨以及 1~33 日龄军曹鱼仔稚鱼全骨骼进行染色, 系统观察并描述其脊柱和附肢骨骼的发育特征。结果显示, 军曹鱼脊柱开始发育的标志为 7 日龄仔鱼中脉弓和神经弓的出现; 13 日龄稚鱼椎骨、神经弓和脉弓开始骨化; 背肋、腹肋分别于 17、20 日龄开始骨化; 29 日龄稚鱼脊柱骨化完成。附肢骨骼骨化起始顺序依次为胸鳍、尾鳍、腹鳍、背鳍和臀鳍。胸鳍匙骨于 4 日龄出现, 肩胛骨孔于 12 日龄出现, 同时上匙骨开始骨化; 乌喙骨与肩胛骨于 20 日龄开始骨化; 第 1 尾下骨于 5 日龄出现, 15 日龄稚鱼尾杆骨、侧尾下骨和尾鳍鳍条开始骨化, 18 日龄稚鱼尾下骨开始骨化; 腹鳍支鳍骨于 17 日龄延伸至匙骨, 同时腹鳍开始骨化; 臀鳍和背鳍于 17 日龄由前向后开始骨化。研究表明, 军曹鱼在 13 日龄进入稚鱼期, 早期发育阶段的骨骼发育特征与其功能性适应密切相关。本研究结果对研究军曹鱼早期骨骼发育与功能适应、优化养殖条件有重要作用。

关键词: 军曹鱼; 仔稚鱼; 脊柱; 附肢骨骼; 发育特征

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

鱼类骨骼系统由位于体表的外骨骼和肌肉下的内骨骼构成。外骨骼包括鳍条和鳞片; 内骨骼包括头骨、脊柱、肋骨和附肢骨骼^[1]。内骨骼起源于原肠胚时期中胚层的间充质, 间充质细胞迁移至特定位置发育成相应骨骼^[2-5]。骨骼发育过程一般遵循头部骨骼优先发育, 附肢骨骼后形成的发育模式, 这与不同骨骼组织行使的功能有关^[6]。骨骼骨化模式包括膜内骨化和软骨内骨化, 其中膜内骨化是间充质细胞直接分化为成骨细胞并骨化成骨; 软骨内骨化则是间充质细胞分化成软骨细胞后经过骨化过程, 最后骨化成硬骨^[6]。鱼类骨骼的发生、发育对其早期发育阶段呼吸、摄食

和运动等功能有重要影响^[7-8]。如褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*) 仔稚鱼附肢骨骼在发育过程中, 与摄食和平衡游泳相关的骨骼优先发育^[9]。大黄鱼(*Larimichthys crocea*) 中轴骨骼和附肢骨骼的发育对增强呼吸、摄食和游泳机能具有重要作用^[10]。鳊(*Siniperca chuatsi*) 仔稚鱼前颌骨、上颌骨与下颌骨快速骨化和下颌的延长对其摄食方式的改变有重要作用^[11-12]。由此可知, 阐明鱼类骨骼的发生、发育过程, 可为深入认识鱼类早期发育阶段的功能趋向及环境适应提供切入点。

军曹鱼(*Rachycentron canadum*) 隶属于鲈形目(Perciformes) 鲈亚目(Percoidae) 军曹鱼科

收稿日期: 2021-07-31 修回日期: 2021-10-17

资助项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-47); 广东海洋大学科研启动经费资助项目(R19022); 广东省科技计划项目(2017B020245001)

第一作者: 毛非凡(照片), 从事鱼类种子工程与健康养殖研究, E-mail: 435230060@qq.com

通信作者: 陈刚, 从事鱼类种子工程与养殖研究, E-mail: cheng@gdou.edu.cn;

马骞, 从事鱼类发育生物学、生理学与遗传育种研究, E-mail: maq@gdou.edu.cn



(Rachycentridae) 军曹鱼属 (*Rachycentron*), 近年在南方沿海极具养殖潜力。已有研究表明, 军曹鱼仔稚鱼时期运动和营养方式等经历了重要的变化, 其运动方式经历了由悬浮到短而急的游动, 最后为快速游泳方式的变化; 其营养方式也经历了由内源性营养到混合性营养, 最后为外源性营养的转变^[13]。但与这种运动和摄食方式转化相关的骨组织是否优先发育, 换言之, 运动与摄食方式的转变是否与早期骨骼发育特征具有相关性尚有待商榷。据此, 本研究通过对 1~33 日龄 (days past hatching, dph) 军曹鱼仔稚鱼脊柱及附肢骨骼的发育过程进行系统观察和记录, 详细描述各骨组织的骨化时间及发育特征, 探讨其早期发育阶段骨骼的发育与运动及摄食方式转变的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2020 年 4 月, 在广东海洋大学生物研究基地 (湛江东海岛) 进行了军曹鱼人工繁育。受精卵收集筛选后置于 500 L 圆形孵化桶中充气孵化。仔鱼孵出后, 将其从孵化桶转移至室内水泥池 (5.0 m×3.5 m×1.5 m) 进行培育。对孵化后 1~33 日龄的仔稚鱼进行连续取样。每日投喂前随机选取 20~30 尾鱼苗, 经丁香酚麻醉后置于 4% 多聚甲醛固定液中 4℃ 过夜, 于次日转至 70% 乙醇溶液中 (-20℃) 保存。实验过程中操作人员严格遵守广东海洋大学动物实验伦理规范, 并按照广东海洋大学动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 实验方法

采用 Dingerkus 等^[14] 的软骨-硬骨双染色方法并加以改进, 具体步骤:

清洗 将经 4% 多聚甲醛固定的样品放入 ddH₂O 中浸泡 1~2 d 或流水冲洗 1 d。

软骨染色 将清洗过的样品置于 0.02% 阿尔新兰染液中 12 h, 直至观察到鳍基部被染为明显蓝色。

梯度脱水 将标本依次放入 95%、75%、40%、15% 乙醇溶液, ddH₂O 中进行梯度脱水, 每个梯度 2 h。

透明化 将标本放入 1% KOH 溶液中进行透明化, 直至标本体表无色素, 可明显观察到骨骼。

硬骨染色 将标本放入 0.1% 茜素红染液

中 30~45 min, 直至硬骨均被染成红色。

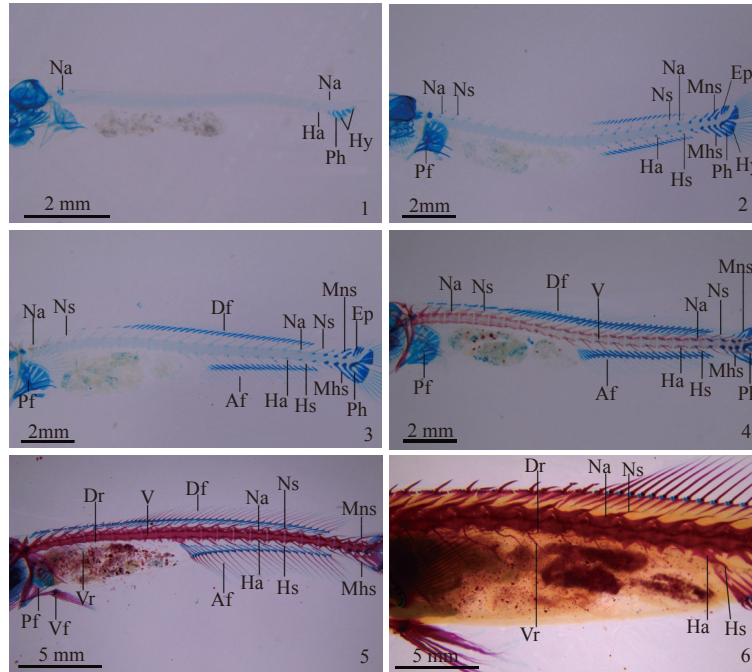
保存 将标本依次移入 0.5% KOH-甘油混合液 (3:1、1:1、1:3, 体积比) 中, 洗脱多余染液, 溶液变红即更换, 每个梯度 2 d, 最终移入甘油中, 并加入 3~4 粒麝香草酚长期保存。

用 M205 FCA 体视显微镜 (Leica, 德国) 对骨骼标本进行观察拍照, 记录骨骼发育的形态特征。用游标卡尺测量全长 (TL) 并计算平均值, 所得数据以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。用 Photoshop 2020 对拍摄的照片进行编辑处理。骨骼命名参照 Harder^[15] 和孟庆闻^[16]。

2 结果

2.1 脊柱与肋骨发育

1 日龄仔鱼 [TL=(3.87±0.16) mm] 脊索呈直管状, 尚未分节; 5 日龄仔鱼 [TL=(6.01±0.17) mm] 尾索微微弯曲上翘; 6 日龄仔鱼 [TL=(7.03±0.22) mm] 尾索上翘较明显, 尾索下方出现 1 枚侧尾下骨和 2 枚尾下骨, 最后一枚脉弓特化形成侧尾下骨, 位于尾索下部的鳍皱开始演变成鳍条, 位于尾索上部的鳍皱尚无变化。7 日龄仔鱼 [TL=(8.17±0.32) mm] 脊索背部前端和后端出现神经弓软骨, 脊索腹部后端出现脉弓软骨, 脊柱开始发育 (图版 I-1)。10 日龄仔鱼 [TL=(11.27±0.41) mm] 所有神经弓和脉弓已经全部形成。11 日龄仔鱼 [TL=(12.33±0.48) mm] 神经弓和脉弓末端愈合形成软骨状神经棘和脉棘 (图版 I-2)。13 日龄稚鱼 [TL=(16.86±1.04) mm] 脊柱先在椎体与神经弓、脉弓愈合处出现骨化点, 随后椎体由前向后、从头部向尾部开始骨化; 神经弓由两端向中间、从基部向末端骨化, 脉弓由尾部向头部、从基部向末端骨化; 神经棘和脉棘的骨化方向一致, 均从基部向末端骨化, 骨化时间晚于神经弓和脉弓 (图版 I-3)。15 日龄稚鱼 [TL=(23.71±2.07) mm] 所有椎骨、神经弓和脉弓全部骨化完成, 除尾部 1 枚愈合型神经棘和 2 枚愈合型脉棘, 其他脉棘和神经棘已全部骨化 (图版 I-4)。17 日龄稚鱼 [TL=(29.67±1.13) mm] 背肋由头部向尾部、基部向末端开始骨化。20 日龄稚鱼 [TL=(36.33±2.82) mm] 背肋骨化完成, 腹肋开始骨化, 骨化方向与背肋一致。21 日龄稚鱼 [TL=(37.39±2.98) mm] 愈合型神经棘和愈合型脉棘基本骨化完成 (图版 I-5)。29 日龄稚鱼 [TL=(76.33±7.44) mm] 腹肋骨化完成 (图版 I-6)。除椎骨为膜骨, 脊柱



图版 I 军曹鱼仔稚鱼脊柱骨骼发育时序

1. 7日龄, 2. 11日龄, 3. 13日龄, 4. 15日龄, 5. 21日龄, 6. 29日龄。Af. 臀鳍, Df. 背鳍, Dr. 背肋, Ep. 尾上骨, Ha. 脉弓, Hs. 脉棘, Hy. 尾下骨, Mhs. 愈合型脉棘, Mns. 愈合型髓棘, Na. 神经弓, Ns. 神经棘, Pf. 胸鳍, Ph. 侧尾下骨, V. 脊柱, Vf. 腹鳍, Vr. 腹肋, TL. 全长, 下同。

Plate I Vertebral column development timing and progression of larval and juvenile *R. canadum*

1. 7 days post hatching (dph), 2. 11 dph, 3. 13 dph, 4. 15 dph, 5. 21 dph, 6. 29 dph. Af. anal fin, Df. dorsal fin, Dr. dorsal rib, Ep. epural, Ha. haemal arch, Hs. haemal spine, Hy. hypural, Mhs. modified haemal spine, Mns. modified neural spine, Na. neural arch, Ns. neural spine, Pf. pectoral fin, Ph. parhypural, V. vertebra, Vf. ventral fin, Vr. ventral rib, TL. total length, the same below.

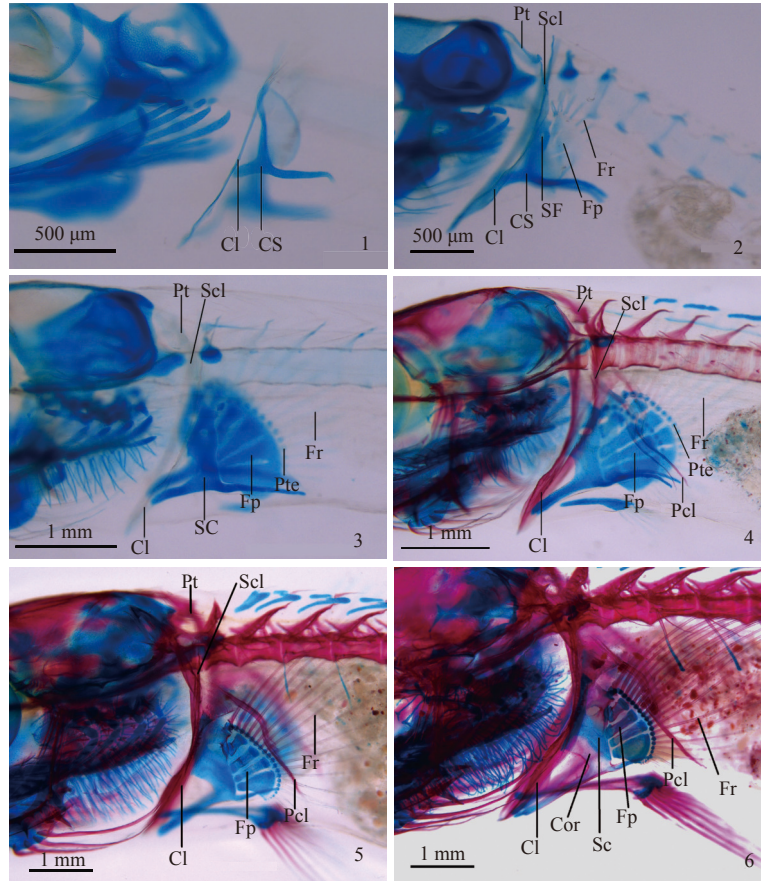
其他部位骨骼均为软骨化骨。

2.2 附肢骨骼发育

胸鳍 2日龄仔鱼 [TL=(4.03±0.15) mm] 的胸鳍原基出现, 是军曹鱼最早出现的附肢骨骼。4日龄仔鱼 [TL=(5.03±0.28) mm] 的匙骨首先出现, 为细长状骨片。5日龄仔鱼 [TL=(6.01±0.17) mm] 乌喙骨-肩胛骨软骨出现 (图版 II-1)。7日龄仔鱼 [TL=(8.17±0.32) mm] 软骨鳍板出现。9日龄仔鱼 [TL=(10.05±0.59) mm] 鳍皱演化成软骨鳍条 (图版 II-2), 并于17日龄由内侧向外侧、由基部向末端骨化。12日龄仔鱼 [TL=(14.17±1.00) mm] 上匙骨开始向骨骼边缘骨化, 并通过后颞骨与头骨相连, 远端支鳍骨可见, 肩胛骨孔出现 (图版 II-3)。15日龄稚鱼 [TL=(23.71±2.07) mm] 后匙骨从基部向末端骨化 (图版 II-4)。18日龄稚鱼 [TL=(31.45±1.11) mm] 支鳍骨由背部向腹部、由中间向两端开始骨化, 支鳍骨由鳍板退化形成 (图版 II-5)。20日龄稚鱼 [TL=(36.33±2.82) mm] 乌喙骨与肩胛骨由中间向两端开始骨化, 骨化方向一致 (图版 II-6)。

25日龄稚鱼 [TL=(60.45±5.77) mm] 乌喙骨和肩胛骨连接处边缘清晰可见。33日龄稚鱼 [TL=(87.60±6.00) mm] 胸鳍基本骨化完成。除匙骨为膜骨, 胸鳍其他骨骼均为软骨化骨。

尾鳍 5日龄仔鱼 [TL=(6.01±0.17) mm] 第1尾下骨出现。8日龄仔鱼 [TL=(9.05±0.26) mm] 尾上骨开始出现, 尾鳍褶皱逐渐演变成软骨鳍条 (图版 III-1)。15日龄稚鱼 [TL=(23.71±2.07) mm] 尾鳍的各骨骼元件已经形成, 此时尾杆骨开始骨化, 侧尾下骨和鳍条由基部向末端开始骨化 (图版 III-2)。18日龄稚鱼 [TL=(31.45±1.11) mm] 尾杆骨骨化完成, 尾下骨由下往上、由基部向末端开始骨化 (图版 III-3)。20日龄稚鱼 [TL=(36.33±2.82) mm] 尾上骨开始由基部向末端骨化, 由2枚愈合型脉棘和1枚愈合型神经棘特化形成的尾鳍支鳍骨已完全骨化。24日龄稚鱼 [TL=(53.05±4.87) mm] 尾下骨骨化完成, 第2、3尾下骨略晚于其他尾下骨完成骨化 (图版 III-4)。28日龄 [TL=(73.27±6.88) mm] 尾鳍骨化完成, 第3、4尾下骨有逐渐愈合现象。尾鳍中尾杆骨为膜骨化骨, 其他骨骼均为软骨化骨。



图版 II 军曹鱼仔稚鱼胸鳍骨骼发育时序

1. 5 日龄, 2. 9 日龄, 3. 12 日龄, 4. 15 日龄, 5. 18 日龄, 6. 20 日龄。Cl. 匙骨, Cor. 乌喙骨, CS. 乌喙骨-肩胛骨软骨, Fp. 支鳍骨, Fr. 鳍条, Pcl. 后匙骨, Pt. 后颞骨, Pte. 远端支鳍骨, Sc. 肩胛骨, Scl. 上匙骨, SF. 肩胛骨孔, 下同。

Plate II Pectoral fin skeleton development timing and progression of larval and juvenile *R. canadum*

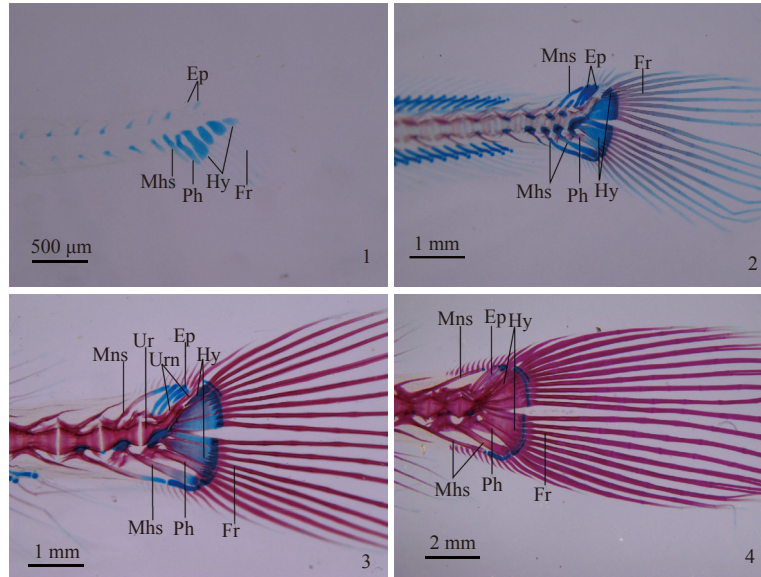
1. 5 dph, 2. 9 dph, 3. 12 dph, 4. 15 dph, 5. 18 dph, 6. 20 dph. Cl. cleithrum, Cor. coracoid, CS. coracoid-scapula cartilage, Fp. fin plate, Fr. fin ray, Pcl. postcleithrum, Pt. posttemporal, Pte. pterygiophore, Sc. scapula, Scl. supracleithrum, SF. scapula foramen, the same below.

背鳍和臀鳍 10 日龄仔鱼 [TL=(11.27±0.41) mm] 背鳍支鳍骨由躯体中部向首尾两端依次出现。11 日龄仔鱼 [TL=(12.33±0.48) mm] 背鳍鳍皱演化为软骨鳍条 (图版 IV-1)。13 日龄稚鱼 [(TL=16.86±1.04) mm] 远端支鳍骨出现。17 日龄仔鱼 [TL=(29.67±1.13) mm] 鳍棘开始由前向后、由基部向末端骨化, 第一鳍棘最早开始骨化 (图版 IV-2)。18 日龄稚鱼 [TL=(31.45±1.11) mm] 鳍条由前向后、由基部向末端开始骨化。20 日龄稚鱼 [TL=(36.33±2.82) mm] 支鳍骨由前向后、由中间向两端开始骨化, 此时鳍条全部骨化完成 (图版 IV-3)。25 日龄稚鱼 [TL=(60.45±5.77) mm] 背鳍骨化完毕 (图版 IV-4)。

9 日龄仔鱼 [TL=(12.33±0.48) mm] 臀鳍支鳍骨由腹部向尾部方向逐渐出现。11 日龄仔鱼 [TL=(12.33±0.48) mm] 远端支鳍骨和软骨鳍条出现 (图版 IV-1)。17 日龄稚鱼 [TL=(29.67±1.13) mm]

鳍条由前向后、由基部向末端骨化 (图版 IV-2)。18 日龄稚鱼 [TL=(31.45±1.11) mm] 第一鳍棘开始骨化。20 日龄稚鱼 [TL=(36.33±2.82) mm] 支鳍骨开始骨化, 骨化方向与背鳍支鳍骨一致, 鳍条全部骨化完成 (图版 IV-3)。25 日龄稚鱼 [TL=(60.45±5.77) mm] 臀鳍完全骨化 (图版 IV-4)。

腹鳍 14 日龄稚鱼 [TL=(19.93±1.12) mm] 鳍原基演变为软骨鳍条 (图版 V-1)。17 日龄稚鱼 [TL=(29.67±1.13) mm] 支鳍骨延伸至匙骨部位, 鳍棘、鳍条由基部向末端开始骨化。18 日龄稚鱼 [TL=(31.45±1.11) mm] 支鳍骨中部出现骨化点, 由中间向两端开始骨化 (图版 V-2)。20 日龄稚鱼 [TL=(36.33±2.82) mm] 内侧背骨化完成, 外侧翼开始骨化 (图版 V-3)。24 日龄稚鱼 [TL=(53.05±4.87) mm] 腹鳍骨化完成 (图版 V-4)。

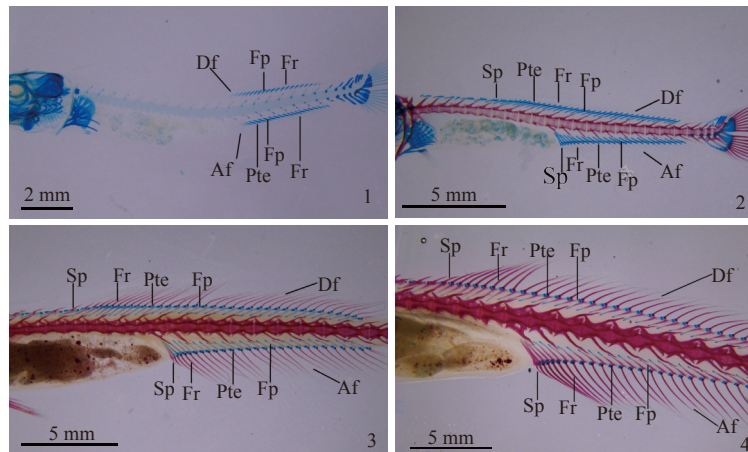


图版III 军曹鱼仔稚鱼尾鳍骨骼发育时序

1. 8 日龄, 2. 15 日龄, 3. 18 日龄, 4. 24 日龄。Ur. 尾杆骨, Urn. 尾神经棘。

Plate III Caudal fin skeleton development timing and progression of larval and juvenile *R. canadum*

1. 8 dph, 2. 15 dph, 3. 18 dph, 4. 24 dph. Ur. urostyle, Urn. uroneural.



图版IV 军曹鱼仔稚鱼背鳍和臀鳍骨骼发育时序

1. 11 日龄, 2. 17 日龄, 3. 20 日龄, 4. 25 日龄。

Plate IV Dorsal fin skeleton and anal fin development timing and progression of larval and juvenile *R. canadum*

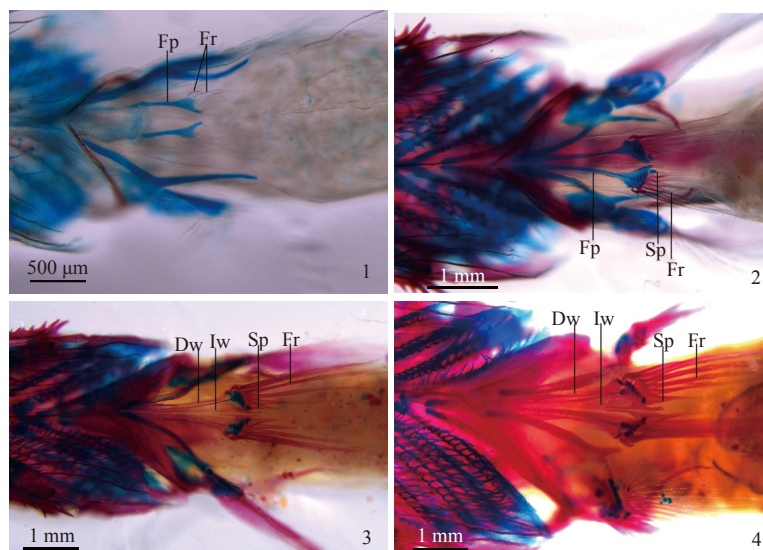
1. 11 dph, 2. 17 dph, 3. 20 dph, 4. 25 dph.

3 讨论

3.1 早期骨骼发育的适应性意义

与其他海水鱼类相比较, 军曹鱼初孵仔鱼体型较大^[17], 初孵仔鱼口裂的大小与其体型成正比^[18], 口裂大有利于军曹鱼仔鱼在开口摄食阶段摄取更多的外源营养。军曹鱼初孵仔鱼通常在水中呈静止悬浮状^[13]。2 日龄仔鱼大部分时间仍处于悬浮状态, 但胸鳍原基可做简单摆动, 偶尔会做短而

急的游动, 此时仔鱼尚未开始摄食^[19-20]。3 日龄仔鱼的胸鳍褶皱可向外张开, 已开始捕食。胸鳍骨骼的出现为仔鱼运动的开始创造条件^[10], 4 日龄仔鱼的匙骨出现, 尾鳍褶皱呈放射丝状, 仔鱼可以依靠胸鳍、尾部和躯体的摆动增强游动能力^[19-20]。8 日龄仔鱼神经弓和脉弓已经出现, 胸鳍鳍条、乌喙骨-肩胛骨软骨和软骨鳍板已开始发育, 尾索上翘, 4 枚尾下骨、2 枚尾上骨已经出现, 尾鳍鳍条开始发育, 此时仔鱼游泳能力进一步加强, 可



图版 V 军曹鱼仔稚鱼腹鳍骨骼发育时序

1. 14 日龄, 2. 18 日龄, 3. 20 日龄, 4. 24 日龄。Dw. 背侧翼, Iw. 内侧背。

Plate V Ventral fin skeleton development timing and progression of larval and juvenile *R. canadum*

1. 14 dph, 2. 18 dph, 3. 20 dph, 4. 24 dph. Dw. dorsal wing, Iw. internal wing.

追击捕食^[13, 19-20]。综上可知, 军曹鱼仔鱼期脊柱与附肢骨骼的发育与其运动方式的转变密切相关。鱼类骨骼发育过程与其形态结构、生态适应和功能需求密切相关^[1, 21-23]。

与欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[24]、绯小鲷 (*Pagellus erythrinus*)^[7] 和赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)^[25] 等鲈形目鱼类相似, 军曹鱼仔稚鱼骨骼发育起始于孵化后。附肢骨骼及脊柱的骨化增强了仔稚鱼运动能力, 背棘的骨化与御敌有直接关系^[1, 10]。军曹鱼椎骨 13 日龄开始骨化, 18 日龄骨化完成, 附肢骨骼如胸鳍、尾鳍的鳍条和背棘已经骨化完毕, 这些骨化特征对仔稚鱼的摄食、运动及御敌意义重大。臀鳍、背鳍分别于 17、18 日龄开始骨化, 表明其摆动转向能力进一步增强, 利于稚鱼进行捕食活动。腹鳍于 24 日龄骨化完成, 稚鱼可快速游动至水面摄食。研究表明, 军曹鱼仔稚鱼已具备一定的运动及御敌能力。

仔稚鱼的划分通常以鳞片的出现、腹鳍的出现、尾索上翘作为主要标志^[11, 26-27]。6 日龄时军曹鱼仔鱼尾索上翘; 11 日龄仔鱼出现腹鳍原基; 13 日龄时椎骨开始骨化, 此时脊柱和附肢骨骼均已趋近完全骨化, 鱼体形态除尾鳍为圆形区别于成鱼 (叉形尾鳍) 外, 其他形态特征无明显差异。由此可见, 不同标志的选取会造成对于仔鱼和稚鱼期划分的差异。基于本研究中军曹鱼的骨骼发育特征, 结合邝杰华等^[17] 对军曹鱼仔、稚鱼期的形

态描述, 建议以椎骨起始骨化作为军曹鱼进入稚鱼期的标志之一。

3.2 脊柱和附肢骨骼的骨化特征

鱼类脊柱的发育通常以神经弓和脉弓的出现为起始, 但不同鱼类神经弓和脉弓发育的方向存在差异。例如, 有明银鱼 (*Salanx ariakensis*)^[28] 仔鱼神经弓和脉弓均由后向前发育, 鲈形目的尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)^[29] 仔鱼的神经弓由前向后发育, 脉弓由中间向两端发育, 军曹鱼神经弓由两端向中间发育, 脉弓由后向前发育, 这表明鱼类脊柱骨骼发育在具有一致性的同时也存在差异性。

军曹鱼脊柱沿头部向尾部方向依次骨化, 这与鳊^[11]、大黄鱼^[10] 等鲈形目鱼类脊柱骨化方向一致, 鲱形目 (*Clupeiformes*) 刀鲚 (*Coilia nasus*)^[27] 脊柱从中间向两端骨化, 同为鲱形目的美洲西鲱 (*Alosa sapidissima*)^[30] 则是由首尾两端向中间骨化。军曹鱼神经弓、神经棘、脉弓与脉棘都是由基部向末端骨化, 而刀鲚神经弓、神经棘、脉弓与脉棘是从中间开始向基部与末梢骨化^[27, 31]。由此可见, 鱼类脊柱的骨化模式存在种属间差异。

军曹鱼附肢骨骼骨化顺序与发生顺序基本一致, 胸鳍最早出现并骨化, 尾鳍紧随其后且骨化起始时间明显早于背鳍和臀鳍, 与绯小鲷^[7]、尖吻重牙鲷 (*Diplodus puntazzo*)^[32] 和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[33] 等鱼类发育模式相似。军曹鱼

成鱼有4块尾下骨, 尾鳍为叉型^[34]。本研究稚鱼尾部骨骼元件于15日龄全部出现, 共计5块尾下骨, 第2、3块尾下骨末端分离, 尾鳍为圆型; 33日龄稚鱼第3、4块尾下骨有愈合的趋势。推测这种骨骼发育现象可能与其尾鳍鳍型的转变有关。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Mabee P M, Crotwell P L, Bird N C, *et al.* Evolution of median fin modules in the axial skeleton of fishes[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 294(2): 77-90.
- [2] Kulesa P M, Gammill L S. Neural crest migration: patterns, phases and signals[J]. *Developmental Biology*, 2010, 344(2): 566-568.
- [3] Minoux M, Rijli F M. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development[J]. *Development*, 2010, 137(16): 2605-2621.
- [4] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. *Nature*, 1997, 386(6626): 671-674.
- [5] Evans D J R, Noden D M. Spatial relations between avian craniofacial neural crest and paraxial mesoderm cells[J]. *Developmental Dynamics*, 2006, 235(5): 1310-1325.
- [6] 李振华, Alex D, 徐燕玲, 等. 斑马鱼: 新型骨骼研究模式生物[J]. *中药药理与临床*, 2010, 26(3): 67-71.
Li Z H, Alex D, Xu Y L, *et al.* The zebrafish: a novel model organism for bone research[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2010, 26(3): 67-71 (in Chinese).
- [7] Sfakianakis D G, Koumoundouros G, Divanach P, *et al.* Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus*(L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities[J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4): 407-424.
- [8] Kendall A W, Ahlstrom E H Jr, Moser H G. Early life history stages of fishes and their characters[M]/Moser H G. *Ontogeny and systematics of fishes*. Lawrence: Allen Press, 1984.
- [9] 邓平平, 严银龙, 施永海. 褐菖鲉仔稚鱼脊柱及四肢骨骼系统的早期发育[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2018, 44(6): 735-742.
Deng P P, Yan Y L, Shi Y H. Early development of the vertebral column and appendicular skeleton in *Sebastes marmoratus* larvae[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2018, 44(6): 735-742 (in Chinese).
- [10] 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.
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 (in Chinese).
- [11] 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.
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 (in Chinese).
- [12] 田文斐. 鳊鱼骨骼早期发育以及主要摄食器官发育与摄食行为的适应性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012: 1-22.
Tian W F. Study on the development of skeleton and feeding apparatus and their adaption to feeding in *Siniperca chuatsi* (Perciformes: Siniperacinae)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012: 1-22 (in Chinese).
- [13] 叶富良. 军曹鱼人工繁殖技术[J]. *科学养鱼*, 2002(12): 12-13.
Ye F L. Artificial reproduction technology of cobia, *Rachycentron canadum*[J]. *Scientific Fish Farming*, 2002(12): 12-13 (in Chinese).
- [14] Dingerkus G, Uhler L D. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage[J]. *Stain Technology*, 1977, 52(4): 229-232.
- [15] Harder W. *Anatomy of fishes, Unit 1*[M]. Schweizerbart: University of Michigan Press, 1975: 31-91.
- [16] 孟庆闻. 鱼类比较解剖[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 57-118.
Meng Q W. *Comparative anatomy of fishes*[M]. Beijing: Science Press, 1987: 57-118 (in Chinese).
- [17] 邝杰华, 陈刚, 马骞, 等. 军曹鱼的胚胎发育及仔稚鱼形态观察[J]. *水产学报*, 2021, 45(11): 1814-1824.
Kuang J H, Chen G, Ma Q, *et al.* Embryonic development and morphological characteristics of larvae and juveniles of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(11): 1814-1824 (in Chinese).
- [18] Yang S G, Hur S W, Ji S C, *et al.* Morphological development of embryo, larvae and juvenile in yellowtail

- kingfish, *Seriola lalandi*[J]. Development & Reproduction, 2016, 20(2): 131-140.
- [19] 陈刚, 张健东, 叶宁, 等. 军曹鱼的养殖技术介绍(上)[J]. 科学养鱼, 2004(1): 10-11.
Chen G, Zhang J D, Ye N, *et al.* Introduction of culture technology of cobia, *Rachycentron canadum* (I)[J]. Scientific Fish Farming, 2004(1): 10-11 (in Chinese).
- [20] 陈刚, 张健东, 施钢, 等. 军曹鱼的养殖技术介绍(中)[J]. 科学养鱼, 2004(2): 10-11.
Chen G, Zhang J D, Shi G, *et al.* Introduction of culture technology of cobia, *Rachycentron canadum* (II)[J]. Scientific Fish Farming, 2004(2): 10-11 (in Chinese).
- [21] Kohno H, Taki Y, Ogasawara Y, *et al.* Development of swimming and feeding functions in larval *Pagrus major*[J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1983, 30(1): 47-60.
- [22] 胡廷尖, 刘士力, 练青平, 等. 泥鳅早期形态发育的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(17): 132-138.
Hu T J, Liu S L, Lian Q P, *et al.* Study on the developmental and morphological characters in *Missgurnus arguillicaudatus* larvae[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(17): 132-138 (in Chinese).
- [23] 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.
- [24] Gluckmann I, Hurliaux F, Focant B, *et al.* Postembryonic development of the cephalic skeleton in *Dicentrarchus labrax* (Pisces, Perciformes, Serranidae)[J]. Bulletin of Marine Science, 1999, 65(1): 11-36.
- [25] 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.
- [26] Kendall A W J R, Ahlstrom E H, Moser H G. Early life history stages of fishes and their characters[M]//Moser H G, Richards W J, Cohen D M, *et al.* Ontogeny and systematics of fishes. Lawrence, US: The American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 1984: 11-22.
- [27] 陈渊戈, 夏冬, 钟俊生, 等. 刀鲚仔稚鱼脊柱和四肢骨骼发育[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(2): 217-223.
Chen Y G, Xia D, Zhong J S, *et al.* Development of the vertebral column and the appendicular skeleton in the larvae and juveniles of *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(2): 217-223 (in Chinese).
- [28] 王晓东, 何鸣笛, 曾娇, 等. 杭州湾北部有明银鱼仔稚鱼脊柱和四肢骨骼发育研究[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(6): 930-937.
Wang X D, He M D, Zeng J, *et al.* Development of the vertebral column and the appendicular skeleton in the larvae and juveniles of *Salanx ariakensis* in the north of Hangzhou Bay[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018, 27(6): 930-937 (in Chinese).
- [29] Kohno H, Ordonio-Aguilar R, Ohno A, *et al.* Osteological development of the feeding apparatus in early stage larvae of the seabass, *Lates calcarifer*[J]. Ichthyological Research, 1996, 43(1): 1.
- [30] 邓平平, 施永海, 徐嘉波, 等. 美洲鲈仔稚鱼脊柱及四肢骨骼系统的早期发育[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 73-81.
Deng P P, Shi Y H, Xu J B, *et al.* Early development of the vertebral column and appendicular skeleton of *Alosa sapidissima*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(1): 73-81 (in Chinese).
- [31] 张宗锋, 施永海, 张根玉, 等. 刀鲚脊柱及四肢骨骼早期发育研究[J]. 水产科技情报, 2015, 42(4): 175-178.
Zhang Z F, Shi Y H, Zhang G Y, *et al.* Early development of the vertebral column and the appendicular skeleton in the *Coilia nasus*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2015, 42(4): 175-178 (in Chinese).
- [32] Sfakianakis D G, Doxa C K, Kouttouki S, *et al.* Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777)[J]. Aquaculture, 2005, 250(1-2): 36-46.
- [33] Huang C, Tan X Y, Wu K, *et al.* Osteological development and anomalies in larval stage of hatchery-reared yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(4): 1125-1140.
- [34] 陈刚, 张健东, 吴灶和. 军曹鱼骨骼系统的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(6): 6-10.
Chen G, Zhang J D, Wu Z H. Morphological observation on the skeleton of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus)[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2004, 24(6): 6-10 (in Chinese).

Development characteristics of the vertebral column and the appendicular skeleton in larval and juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)

MAO Feifan, CHEN Gang*, MA Qian*, ZHOU Qiling,
SHI Gang, HUANG Jiansheng, KUANG Jiehua
(College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Cobia (*Rachycentron canadum*) is an increasingly important marine fish with significant potential for aquaculture in China. Several studies have shown that this fish exhibits distinct locomotion patterns, feeding behaviors and nutritional demands during the larvae and juvenile stages. In order to explore the developmental characteristics of the spine and appendage bones in the early stages of cobia, this paper described the morphologic ossification characteristics of the vertebrae and appendages of larval and juvenile cobia [1 to 33 days post hatching (dph)] using a cartilage bone clearing and staining technique to obtain information on the structural development and functional adaptation of larvae and juveniles organs. After cartilage and bone were stained with alcian blue and alizarin red, vertebral columns were observed to develop from haemal arches and neural arches at 7 dph. Then, the centrum, haemal arches, and neural arches began to ossify at 13 dph. The dorsal rib and ventral rib began to ossify at 17 and 20 dph, respectively, and the vertebrae were fully ossified at 29 dph. The appendicular skeleton developed in the following order: the pectoral fin is the first to develop, followed by the caudal, ventral, dorsal, and anal fins. The pectoral fin began to develop from the cleithrum at 4 dph. The supracleithrum of the pectoral fin ossified at 12 dph and at the same time, the scapula foramen appeared, while the coracoid and scapula began to ossify at 20 dph. The hypural 1 of the caudal fin appeared at 15 dph, the urostyle, parhypural, and fin ray began to ossify at 15 dph, whereas the hypural began to ossify at 18 dph. The ventral fin plate extended to the cleithrum at 17 dph and simultaneously, the ventral fin began to ossify. At 17 and 18 dph, the dorsal and anal fins were ossified in the same pattern. The appendicular skeleton, with the exception of the urostyle, cleithrum, and pelvic girdle, underwent cartilaginous ossification. The development of the vertebral column and appendicular skeleton, on the other hand, is accompanied by changes in feeding patterns and locomotion patterns, such as the emergence of pectoral fin primordia that created conditions for the beginning of larval movement, the development of tail fin folds that enhanced its swimming ability, and the development of pectoral and tail fins in furtherance of cobia's quick swimming. The results of the study show that exercise skeletons were preferentially developed, such as ossification of the vertebral column and the appendicular skeleton, which enhanced cobia's forced swimming ability. In addition, hypural healing has been found during skeletal development. In accordance with this process, this paper considered that the morphotype transition of the caudal fin is associated with hypural healing. It is suggested that the osteological ontogenesis of larval and juvenile cobia is closely related to changes in their movement patterns. At 22 dph, scale outgrowth could be found on the caudal peduncle, the vertebral column and appendicular skeleton tended to be fully ossified, and the body features of the fish are the same as adult fish except for the shape of the caudal fin. This study proposes the use of the start of vertebrae ossification as a criterion to distinguish between larval and juvenile cobia, which are considered to enter the juvenile stage at 13 dph. The results suggest that the early bone developmental characteristics of cobia larvae and juveniles are closely related to their functional adaptation. Research on the development of the vertebral column and the appendicular skeleton of cobia is important to enhance the understanding of environmental preferences and functional morphology.

Key words: *Rachycentron canadum*; larva and juvenile; vertebrae; appendicular skeleton; development characteristics

Corresponding authors: CHEN Gang. E-mail: cheng@gdou.edu.cn;

MA Qian. E-mail: maq@gdou.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47); Program for Scientific Research Start-up Funds of Guangdong Ocean University (R19022); Science and Technology Program of Guangdong Province (2017B020245001)