

doi: 10.7541/2018.017

不同鱼类肌间骨的骨化模式研究

聂春红^{1,2} 陈祖萱¹ 戴彩娇¹ 万世明^{1,2} 高泽霞^{1,2,3}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业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. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070; 3. 池塘健康养殖湖北省工程实验室, 武汉 430070)

摘要: 为研究鱼类肌间骨的骨化模式, 采用整体骨骼染色方法, 对黄鳝(*Monopterus albus*)和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) 2种处于不同进化地位且游动模式不同的鱼类肌间骨发生发育进行了系统观察。结果显示合鳃鱼目合鳃鱼科且游动模式属于鳗鲡模式的黄鳝在孵出后30d (体长40 mm)时, 其头部开始出现椎体小骨; 随后依次向尾部骨化, 在孵出后55d (体长约100 mm)时, 肌间骨相继出现完毕, 所有椎体小骨均为“T”形。鲤形目鳅科且游动模式为鲇科模式的泥鳅在孵出后27d (体长17 mm)时, 肌间骨开始在尾部出现, 包括髓弓小骨和脉弓小骨; 随后依次向头部骨化, 在孵出后40d (体长35 mm)时, 肌间骨全部出现, 形态包括“T”、“Y”和“卜”形。此外, 研究利用成骨细胞特异性转录因子绿色荧光蛋白(Osterix GFP)斑马鱼品系, 通过观察此osterix GFP活体斑马鱼, 可发现斑马鱼肌间骨从尾部向头部依次骨化的过程。研究结果揭示鱼类肌间骨的骨化规律与其游动模式密切相关, 且肌间骨的形态种类的多态性与其游动模式和体型有一定的关系。

关键词: 黄鳝; 泥鳅; 斑马鱼; 游动模式; 肌间骨; 骨化模式

中图分类号: Q959.54

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2018)01-0131-07

肌间骨(Intermuscular bone, IB)由肌膈中的间充质细胞骨化而来, 是一种膜性硬骨, 根据附着部位可分为髓弓小骨、脉弓小骨、椎体小骨三种类型^[1,2]。肌间骨的存在与鱼类的分类地位有极大的关系, 其仅存在低等真骨鱼类中, 系统演化过程表现为数目由少到多, 多到少, 再到无的过程^[2-4]。近年来有关鱼类肌间骨的研究大多集中在研究肌间骨的数目及形态, 如Patterson和Johnson^[2]对125属真骨鱼的代表种肌间骨进行了详细的观察和分析; 吕耀平等^[3]对骨舌鱼总目、海鲢总目、鲱形总目和骨鳔总目等低等真骨鱼类中的代表性鱼类的肌间骨数量、形态和分布进行了比较分析; 董在杰等^[5]对几种常见的鲤科养殖鱼类肌间骨形态及数目进行了系统的分析。然而, 对鱼类肌间骨的骨化过程研究的较少。在鲤科鱼类上, 仅秉志^[6]、Bird和Mabee^[7]、柯中和等^[8]、万世明等^[9]、吕耀平等^[10,11]分别研究

了鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、唇鲮(*Hemibarbus labeo*)和瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)等鱼类的肌间骨骨化过程, 结果显示均是从尾部向头部发育。鲤科鱼类肌间骨的形态比较复杂, 基本被分为6种形态, 且其他复杂的形态都是由“T”形演化而来的。姚文杰等^[12,13]对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)肌间骨骨化过程研究却发现其是从头部向尾部发育, 这与已报道的鲤科鱼类的截然相反, 据此推测鱼类肌间小骨的骨化可能与其不同的游动方式有关。

为进一步探讨鱼类肌间骨的骨化方式是否与游动方式相关, 或者是与鱼类的进化相关, 鲤科鱼类表现为从尾部向头部的骨化方向, 而非鲤科鱼类的日本鳗鲡却表现为从头部向尾部的骨化方向。本研究选择了合鳃鱼目合鳃鱼科的黄鳝(*Monopte-*

收稿日期: 2017-02-06; 修订日期: 2017-05-28

基金项目: 国家自然科学基金(31472271); 武汉市青年科技晨光计划(2016070204010143); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-46-08)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31472271); Wuhan Youth Science and technology plan (2016070204010143); Modern Agriculture Industry Technology System Construction Projects of China titled as Staple Freshwater Fishes Industry Technology System (CARS-45-08)]

作者简介: 聂春红(1993—), 女, 河南濮阳人; 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: nch44@webmail.hzau.edu.cn

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

rus albus)和鲤形目鳅科的泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*), 系统研究了2种鱼类的肌间骨发生发育过程。此外, 本研究还采用成骨细胞特异性转录因子(*osterix*)绿色转基因荧光蛋白斑马鱼, 对其肌间骨的发生发育进行了活体的系统观察。研究结果将为鱼类肌间骨的发生发育模式的探讨提供更丰富的材料, 为今后研究鱼类肌间骨发生发育的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黄鳝样本来自荆州长江水产研究所的友情提供, 仔、稚鱼样本从受精卵孵出后开始采集, 每隔5d采集一次样本, 每次5—10尾, 一直采集到孵出后60d; 黄鳝成体为一龄鱼。泥鳅样本来自华中农业大学水产学院养殖基地自繁群体, 样本采集从受精卵孵出后开始一直到孵出后40d, 每隔3天采集一次, 每次5—10尾; 泥鳅成体为一龄鱼。

1.2 骨骼染色方法

幼体染色方法: 整体骨骼染色的方法参照柯中和等^[8]方法, 但其步骤稍有改动。用MS-222将鱼麻醉(100 mg/L)后用95%的酒精保存标本; 标本经75%、50%和30%的酒精梯度复水, 每次15—20min; 转移至1%双氧水中漂白30—60min, 蒸馏水浸泡30min左右, 1% KOH溶液中透明20—30min; 后转移至新的1% KOH溶液中, 加适量的茜素红染液, 直至溶液变为深紫色, 染色20min左右后将标本转移至新的1% KOH溶液中, 洗去标本表面的染色液; 然后将标本转移至50%的甘油中, 直至体表的染色褪去; 最后将标本放在100%的甘油中保存。

成体染色方法: 整体骨骼染色的方法参照柯中和等^[8]方法, 但其步骤稍有改动。用MS-222将鱼麻醉(200 mg/L)后用95%的酒精保存标本; 经50%和30%酒精梯度复水; 将标本转移至1%的双氧水中漂白10h左右后转移至蒸馏水过夜处理; 转移至1% KOH溶液中透明8h左右, 后转移至新的1% KOH溶液中, 加适量的茜素红染液, 直至溶液变为深紫色, 染色至少6h, 直至骨骼被染成紫红色后将标本转移至新的1% KOH溶液中, 洗去标本表面的染色液; 然后将标本转移至50%的甘油中, 直至体表的染色褪去; 最后将标本放在100%的甘油中保存。

骨骼染色标本通过SZX-16型日本奥林巴斯显微镜观察和拍照, 记录肌间骨数目、位置及形态。

1.3 转基因斑马鱼肌间骨发育观察

成骨细胞特异性转录因子绿色转基因荧光蛋白(*Osterix GFP*)斑马鱼亲本由台湾中原大学萧崇德教授提供, 本实验室繁殖子代后进行观察。自孵出

后开始一直到孵出后30d(体长20 mm), 每隔3d选取5—10尾幼鱼, 用MS-222将鱼麻醉(100 mg/L)后, 放置于体式荧光显微镜(Leica, M205 FA)下进行观察拍照。斑马鱼成体染色参照1.2中描述的成体染色方法进行。

2 结果

2.1 黄鳝的肌间骨骨化过程

黄鳝幼鱼孵出25d(体长约35 mm)前肌间骨还没有出现, 但其主轴骨骼及附肢骨骼已骨化完成(图1A); 在孵出30d(体长约40 mm)时, 肌间骨从头部开始少量出现, 形态为“I”形, 且只有椎体小骨(图1B); 在孵出45d(体长约55 mm)时, 黄鳝的主轴骨骼进一步发育, 椎体小骨从头部向尾部开始大量出现(图1C); 在孵出55d(体长约100 mm), 肌间骨基本全部出现, 形态清晰, 附着在椎体上(图1D)。由此可见黄鳝的椎体小骨的骨化顺序是从头部向尾部骨化的, 形态仅有“I”形, 无其他形态的肌间骨发育。此外, 黄鳝成鱼经骨骼染色后, 其肌间骨的形态及位置可以被清楚地观察到(图2A), 仅有“I”形的椎体小骨, 成体黄鳝共有180—188根小骨, 肌节数为150—166, 平均每一肌节的肌间骨数目为1.08—1.25。李仲辉^[14]在对黄鳝的骨骼研究中对黄鳝的骨骼做了详细的观察, 发现黄鳝仅存在上肋骨, 没有下肋骨。为了区别黄鳝上肋骨与椎体小骨, 图3显示了成体黄鳝的椎体小骨与上肋骨分别存在的位置。

2.2 泥鳅的肌间骨骨化过程

泥鳅幼鱼在孵出后24d(体长15 mm), 其骨骼包括主轴骨骼及附肢骨骼已骨化完全, 但肌间骨还没有出现(图4A)。孵出后27d(体长17 mm), 肌间骨从尾部开始出现, 有1—2根, 形态为“I”形(图4B), 为脉弓小骨。泥鳅孵化33d左右(体长20 mm), 大量肌间骨已出现在尾部, 包括髓弓小骨和脉弓小骨, 但没有发育到背部(图4C)。孵出后37d(体长25 mm), 肌间骨出现于背鳍下方, 形态都为“I”形。孵出后40d(体长35 mm), 肌间骨全部出现, 尾部肌间骨形态发生分化, 少量的“卜”形出现(图4D)。此外, 泥鳅成鱼骨骼经染色后观察发现其具有髓弓小骨和脉弓小骨(图2B), 肌间骨的形态有“I”、“Y”和“卜”形三种形态; 成体泥鳅肌间骨的数目约100—104根, 肌节数为40—44, 平均每肌节的肌间骨数目为2.27—2.60。

2.3 荧光斑马鱼的肌间骨骨化过程

*Osterix*绿色转基因荧光蛋白斑马鱼幼鱼孵出后15d(体长5 mm), 鱼体主轴骨骼已发育完全, 且肌间骨并没有出现(图5A); 孵出后21d(体长6.5 mm)

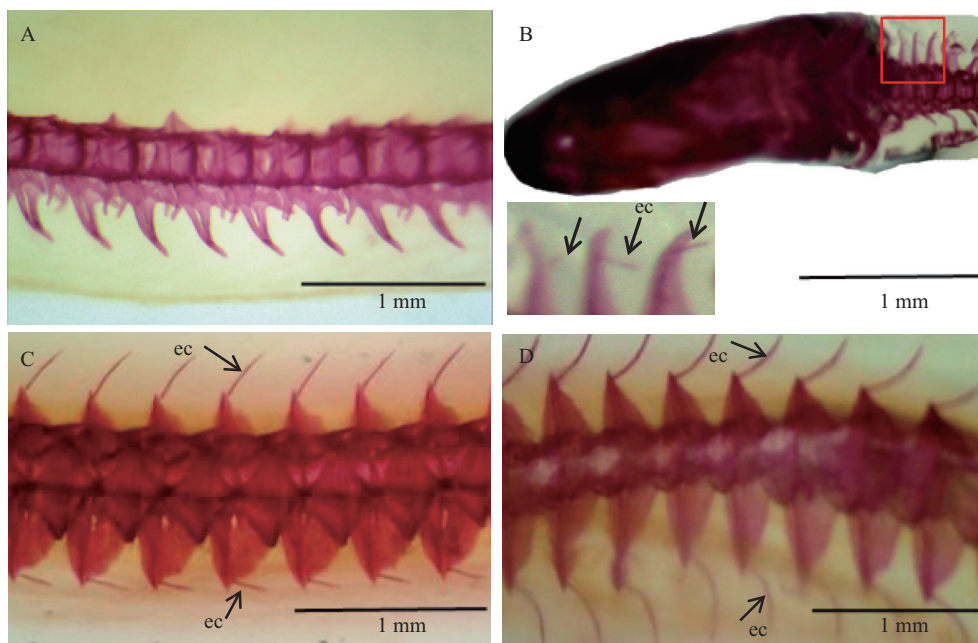


图1 不同发育时期黄鳝肌间骨骨化过程

Fig. 1 The ossification process of intermuscular bones at different stages of *Monopterus albus*

A. 25d, 其主轴骨骼及附肢骨骼已经骨化; B. 30d, 肌间骨在头部开始少量出现; C. 45d, 肌间骨从头部向尾部出现; D. 55d, 肌间骨基本全部出现; 箭头所示为肌间骨; 每张图片所示从左至右方向为鱼体身体头部至尾部; ec. 椎体小骨

A. at 25d, the spindle bones and appendicular skeleton appeared; B. at 30d, a few intermuscular bones appeared in anterior part; C. at 45d, the intermuscular bones gradually emerged from the anterior to the posterior parts; D. at 55d, all the intermuscular bones developed. The arrowhead indicates the intermuscular bone. Each picture showing the direction from left to right is the direction of fish anterior part to posterior part. ec. epicentral bone

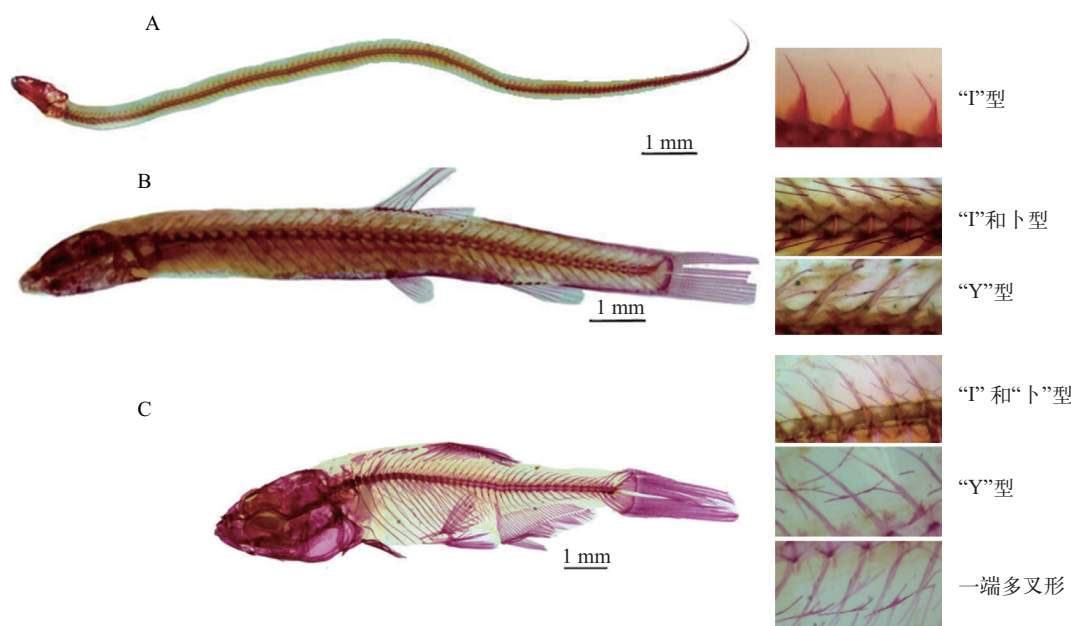


图2 黄鳝、泥鳅和斑马鱼成鱼骨骼染色显示成鱼肌间骨的形态

Fig. 2 Whole-mount staining of skeleton for *M. albus* (A), *M. anguillicaudatus* (B) and *D. rerio* (C) to show different morphological types of intermuscular bones

时, 肌间骨从尾部开始出现, 形态为“T”形, 为脉弓小骨(图5B); 孵出后27d (体长10 mm)时, 肌间骨在尾部大量出现, 但还没有发育到背部, 髓弓小骨与脉

弓小骨均出现(图5C); 孵出后30d (体长15 mm), 肌间骨已生长到背鳍下方, 且形态开始复杂化发育(图5D)。随着荧光斑马鱼的生长, 鳞片的出现覆盖

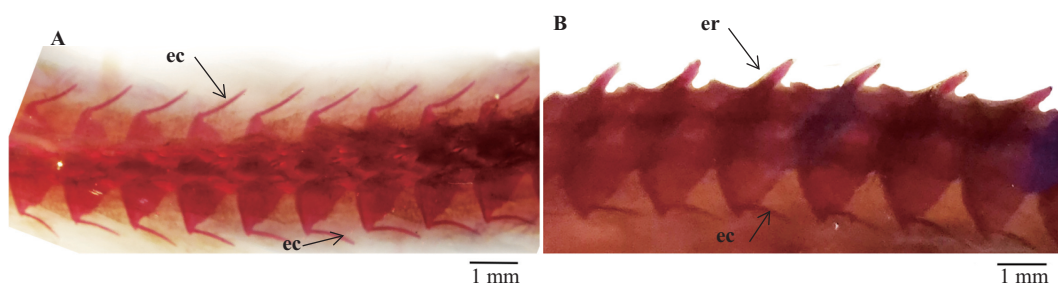


图 3 成体黄鳝椎体小骨和上肋骨的位置差异

Fig. 3 Position difference of epicentrals and epipleural ribs in *M. albu*

ec. 椎体小骨; er. 上肋骨; ec. epicentral bone; er. epipleural rib

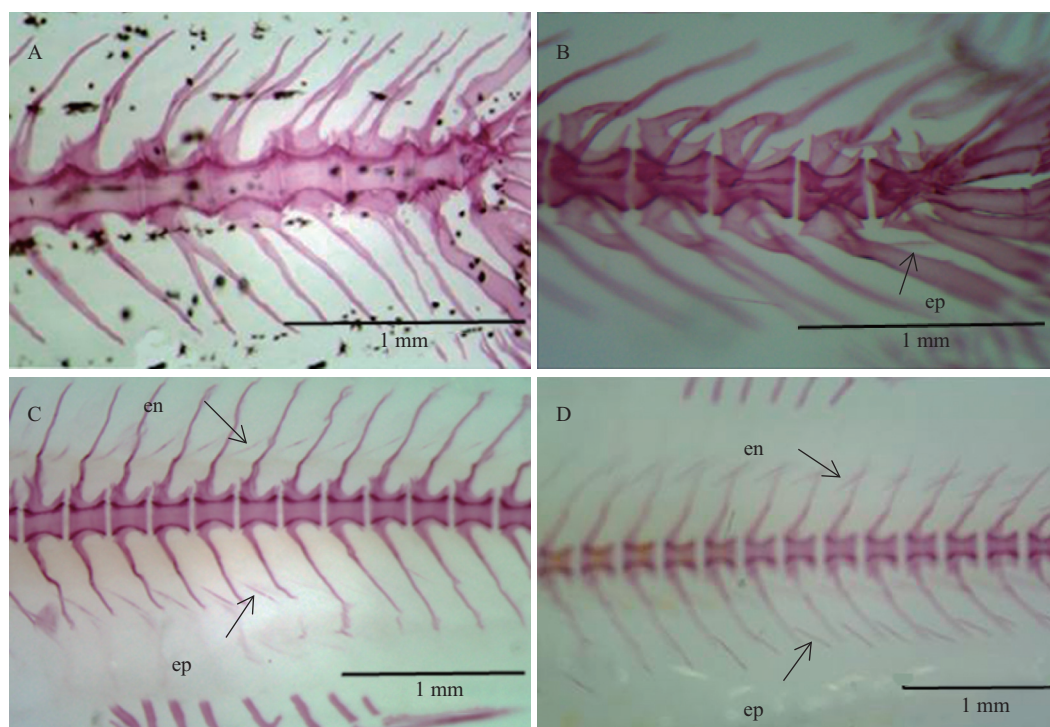


图 4 不同发育时期泥鳅肌间骨骨化过程

Fig. 4 The ossification process of intermuscular bones at different stages of *Misgurnus anguillicaudatus*

A. 24d, 其主轴骨骼及附肢骨骼已经骨化; B. 27d, 肌间骨在尾部开始少量出现; C. 33d, 肌间骨从尾部向头部出现; D. 37d, 肌间骨大量出现至背鳍下方。箭头所示为肌间骨。每张图片所示从左至右方向为鱼体身体头部至尾部; en. 髓弓小骨; ep. 脉弓小骨

A. at 24d, the spindle bones and appendicular skeleton appeared; B. at 27d, a few intermuscular bones appeared in posterior part; C. at 33d, the intermuscular bones gradually emerged from the posterior to the anterior parts; D. at 37d, many intermuscular bones appeared in the anterior part under the dorsal fin. The arrowhead indicates the intermuscular bone. Each picture showing the direction from left to right is the direction of fish anterior part to posterior part. en. epineural bone; ep. epipleural bone

了骨骼的荧光。因此, 我们利用整体骨骼染色方法对成鱼的斑马鱼进行骨骼染色观察(图 2C), 结果显示斑马鱼存在髓弓小骨和脉弓小骨两种类型, 肌间骨的形态有“T”、“卜”、“Y”和一端多叉形。

3 讨论

鱼类骨骼的骨化是一个复杂的过程, 不同鱼类有不同的骨化模式。本文研究了3种鱼类的肌间骨骨化模式, 黄鳝与泥鳅和斑马鱼的骨化模式是相反

的。泥鳅属于鲤形目鳅科花鳅亚科, 斑马鱼属于鲤科鱼丹亚科, 两种鱼的肌间骨的骨化顺序是从尾部向头部依次出现, 有髓弓小骨和脉弓小骨。这种肌间骨骨化方式与已报道的分别属于鲤科的鲃亚科团头鲂、鲃亚科唇鱼骨和鲢亚科鲢的肌间骨骨化顺序是一致的^[7-10]。黄鳝, 属于合鳃鱼目, 合鳃鱼科, 肌间骨的骨化顺序是从头向尾部依次骨化的; 这与已报道的日本鳗鲡的骨化顺序是一致的^[12]。表 1 是近年来所有已研究鱼类的肌间骨骨化模式。

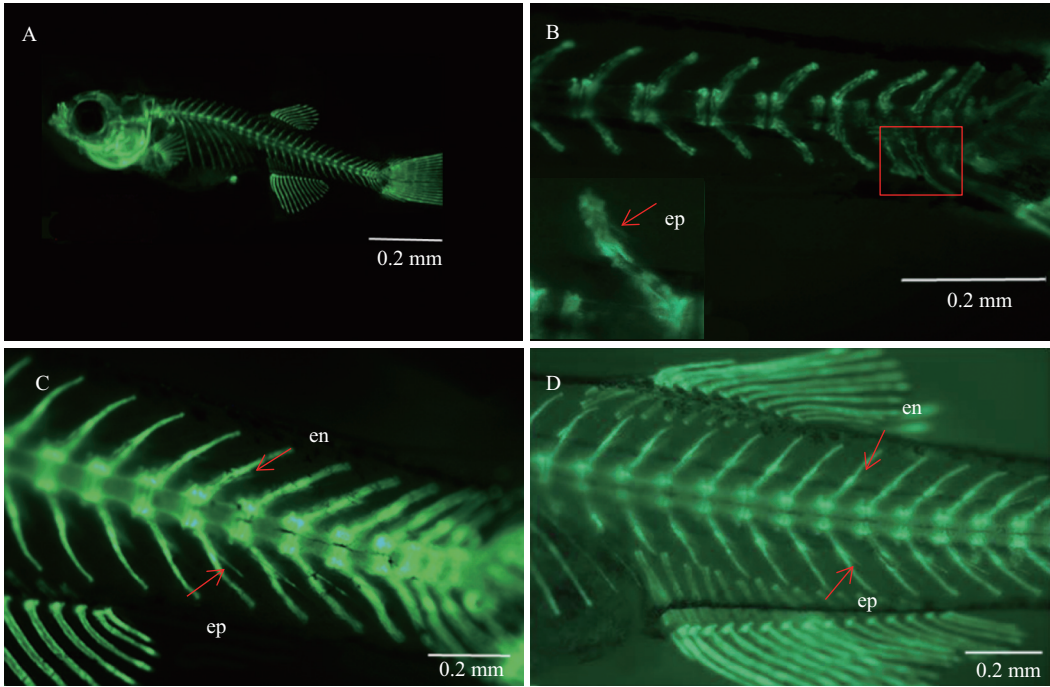


图 5 不同发育时期斑马鱼肌间骨骨化过程

Fig. 5 The ossification process of intermuscular bones at different stages of *Danio rerio*

A. 15d, 其主轴骨骼及附肢骨骼已经骨化; B. 21d, 肌间骨在尾部开始少量出现; C. 27d, 肌间骨从尾部向头部出现; D. 30d, 肌间骨大量出现至背鳍下方; 箭头所示为肌间骨; 每张图片所示从左至右方向为鱼体身体头部至尾部; en. 髓弓小骨; ep. 脉弓小骨

A. at 15d, the spindle bones and appendicular skeleton appeared; B. at 21d, 1—2 intermuscular bones appeared in posterior part; C. at 27d, the intermuscular bones gradually emerged from the posterior to the anterior parts; D. at 30d, many intermuscular bones appeared in the anterior part under the dorsal fin. The arrowhead indicates the intermuscular bone. Each picture showing the direction from left to right is the direction of fish anterior part to posterior part. en. epineurial bone; ep. epipleural bone

表 1 本文及已报道的不同鱼类肌间骨骨化模式的比较

Tab. 1 The documents about ossification patterns of intermuscular bones among different fish species in this study and other previous reports

种类 Species	分类地位 Taxonomic status	体形 Body shape	肌间骨骨化顺序 Ossification patterns of IB	肌间骨类型 Type of IB	肌间骨形态 IB morphology	游动方式 Swimming modes	文献 Reference
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	鲤形目鲤科鲢亚科	纺锤形	从尾向头	髓弓小骨, 脉弓小骨	I, Y, 卜, 一端多叉, 两端多叉, 树枝形	鲃科模式	[8]
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	鲤形目鲤科鲃亚科	侧扁形	从尾向头	髓弓小骨, 脉弓小骨	I, Y, 卜, 一端多叉, 两端多叉	鲃科模式	[9]
唇鱼骨 <i>Hemibarbus labeo</i>	鲤形目鲤科鲃亚科	—	从尾向头	髓弓小骨, 脉弓小骨	I, Y, 卜, 一端分叉, 两端分叉	鲃科模式	[10]
瓯江彩鲤 <i>Cyprinus carpio var. color</i>	鲤形目鲤科鲤亚科	纺锤形	从尾向头	髓弓小骨, 脉弓小骨	I, Y, 卜, 一端多叉, 两端两叉, 两端多叉, 树枝形	鲃科模式	[11]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	鲤形目鲤科鱼丹亚科	纺锤形	从尾向头	髓弓小骨, 脉弓小骨	I, Y, 卜, 一端分叉	鲃科模式	[7]及本研究
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	鲤形目鳅科花鳅亚科	—	从尾向头	髓弓小骨, 脉弓小骨	I, Y, 卜	鲃科模式	本研究
黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	合鳃鱼目合鳃鱼科黄鳝亚科	圆筒形	从头向尾	椎体小骨	I	鳗鲡模式	本研究
日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	鳗鲡目鳗鲡科鳗鲡亚科	圆筒形	从头向尾	椎体小骨, 髓弓小骨, 脉弓小骨	I	鳗鲡模式	[12]

由此可见, 泥鳅和斑马鱼、团头鲂、唇鱼骨、鲢都属于鲤形目, 分属鳅科和鲤科, 但具有相同的肌间骨骨化顺序。而非鲤形目的日本鳗鲡表现为从头部向尾部依次骨化的肌间骨骨化方式, 姚文杰等^[12]

据此推测鱼类肌间骨的骨化可能与其不同的游动方式有关。本文研究的黄鳢的游动方式与日本鳗鲡相同,都属于鳗鲡模式,而其他已报到肌间骨从尾向头部骨化的鱼类的游动方式均为鲹科模式。本文结果进一步证实了鱼类肌间骨的骨化可能与其不同的游动方式有关。但另一方面,因为目前已报道的肌间骨从尾向头部骨化的鱼类都属于鲤形目,而肌间骨从头部向尾部骨化的黄鳢和日本鳗鲡分别属于合鳃鱼目和鳗鲡目,因此鱼类肌间骨骨化方式是否与进化有一定关系,还需要进一步采集更多属于不同分类地位的鱼种进行更全面的研究。

吕耀平等^[3]和蒋燕等^[15]分别对骨舌鱼总目、海鲢总目、鲱形总目和骨鲮总目等低等真骨鱼类肌间骨的类型分析结果显示,在低等真骨鱼类的系统演化过程中,骨舌鱼总目只有髓弓小骨和脉弓小骨,不包含椎体小骨,而海鲢总目与鲱形总目的鱼类含有三种类型的肌间骨,而随后的骨鲮总目中椎体小骨已退化。由此可见,椎体小骨在鱼类进化上出现的时间比髓弓小骨和脉弓小骨要晚,但其退化比髓弓小骨和脉弓小骨却早很多。本研究中的泥鳅和斑马鱼属于骨鲮总目,仅有髓弓小骨和脉弓小骨存在,与上述研究结果一致。黄鳢属于棘鳍总目,却含有椎体小骨,而无髓弓小骨和脉弓小骨,表明椎体小骨在骨鲮总目退化后又在棘鳍总目中出现,这与蒋燕等^[15]报道的椎体小骨退化比髓弓小骨要早很多,且椎体小骨的演化史要比髓弓小骨和脉弓小骨短得多的结论是相悖的,表明椎体小骨的演化史还需要进一步探讨。

肌间骨是存在肌隔间的一种膜性小骨,其形态表现出多样性^[16]。吕耀平等^[3]将肌间骨(髓弓小骨和脉弓小骨)的形态分为有“I”形、“卜”形、“Y”形、一端多叉形、两端两叉形、两端多叉形、树枝形等七种形态,认为肌间骨的复杂形态是由“I”形演化而来的,且从骨舌鱼总目到骨鲮总目,肌间骨形态表现为从简单向复杂形态演化,然后出现退化的现象。本文研究的泥鳅的肌间骨形态有“I”、“卜”和“Y”形三种形态,与吕耀平等^[3]报道的泥鳅的肌间骨研究结果一致。黄鳢的椎体小骨仅有“I”形,与日本鳗鲡的肌间骨形态一致^[12],但海鲢总目中海鲢的椎体小骨的形态相对复杂,包括“I”、“Y”和一端多叉形^[3],表明鱼类椎体小骨形态经历了从简单到复杂,再退化到简单的演化过程。此外,从已报道的鱼类肌间骨的形态来看,黄鳢、日本鳗鲡、海鳗等体型为圆筒形且游动方式为鳗鲡模式的鱼类相较于鲢、团头鲂、瓯江彩鲤等体型为纺锤形或侧扁形且游动方式为鲹科模式的鱼类,肌间骨的形

态类型要简单得多,绝大部分以“I”形为主。因此,推测鱼类肌间骨的形态与其体型和游动方式可能有一定的关系。

此外,本文首次采用成骨细胞特异性转录因子(osterix)绿色转基因荧光蛋白斑马鱼,对其肌间骨的发生发育进行了活体的系统观察,结果显示肌间骨发生发育过程都可以通过此荧光鱼观察到,这为今后通过斑马鱼在活体水平研究基因在肌间骨发生发育中的功能奠定了很好的材料基础。以此尝试通过基因敲除、遗传改良、添加基因抑制剂等技术抑制肌间骨形成,从分子水平上探讨培育高产、优质、肌间刺少的养殖新品种的技术手段。

参考文献:

- [1] Meng Q W, Su Q W, Li W D. Comparative Anatomy of Fishes [M]. 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]
- [2] Patterson C, Johnson G D. The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes [J]. *Smithsonian Contribution to Zoology*, 1995, **559**: 1—85
- [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. 水产学报, 2007, **31**(5): 661—668]
- [4] Nelson J S. Fishes of the World (Third edition) [M]. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994, 600
- [5] Dong Z J, Huang D Z, Li L J, et al. Preliminary study on intermuscular bones of several cultured cyprinids [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, **15**(4): 425—429 [董在杰, 黄代中, 李丽娟, 等. 几种常见鲤科鱼类肌间刺的初步研究. 上海水产大学学报, 2006, **15**(4): 425—429]
- [6] Bing Z. On the myoseptal spines of the carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1962, **14**(2): 175—178 [秉志. 幼鲤大侧肌肌隔骨针的观察. 动物学报, 1962, **14**(2): 175—178]
- [7] Bird N C, Mabee P M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae) [J]. *Developmental Dynamics*, 2003, **228**(3): 337—357
- [8] Ke Z H, Zhang W, Jiang Y, et al. Developmental morphology of the intermuscular bone in *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, **43**(6): 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**(6): 88—96]
- [9] Wan S M, Yi S K, Zhong J, et al. Developmental and morphological observation of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Acta Hydrobiologica Sini-*

- ca, 2014, **38**(6): 1144—1152 [万世明, 易少奎, 仲嘉, 等. 团头鲂肌间骨发育的形态学观察. 水生生物学报, 2014, **38**(6): 1144—1152]
- [10] Lü Y P, Chen J, Bao B L, *et al.* The ossificational process of the intermuscular bones in *Hemibarbus labeo* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2012, **21**(4): 549—553 [吕耀平, 陈洁, 鲍宝龙, 等. 唇鲮肌间小骨的骨化过程. 上海海洋大学学报, 2012, **21**(4): 549—553]
- [11] Lü Y P, Zhou C C, Yang L M, *et al.* Ossification pattern of the intermuscular bone in *Cyprinus carpio* var. color [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, **23**(1): 58—63 [吕耀平, 周晨晨, 杨丽美, 等. 瓯江彩鲤肌间小骨的骨化模式. 上海海洋大学学报, 2014, **23**(1): 58—63]
- [12] 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*, 2015, **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. 上海海洋大学学报, 2015, **23**(6): 810—813]
- [13] Yao W, Lü Y, Gong X, *et al.* Different ossification patterns of intermuscular bones in fish with different swimming modes [J]. *Biology Open*, 2015, **4**(12): 1727—1732
- [14] Li Z H. Study on the bones of *Monopterus albus* [J]. *Zoological Research*, 1981, **2**(3): 215—222 [李仲辉. 黄鳝 (*Monopterus albus* (Zuiew)) 骨骼的研究. 动物学研究, 1981, **2**(3): 215—222]
- [15] Jiang Y, Yang L L, Bao B L. The epicentrals in several lower teleosts [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, **21**(4): 549—553 [蒋燕, 杨琳琳, 鲍宝龙. 几种低等鱼类的椎体小骨. 上海海洋大学学报, 2008, **21**(4): 549—553]
- [16] Li Z, Zhou L, Wang Z W, *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. 水生生物学报, 2017, **41**(4): 860—869]

OSSIFICATION PATTERNS OF INTERMUSCULAR BONES IN DIFFERENT FISH SPECIES

NIE Chun-Hong^{1,2}, CHEN Zu-Xuan¹, DAI Cai-Jiao¹, WAN Shi-Ming^{1,2} and GAO Ze-Xia^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Lab. of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

3. Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China)

Abstract: Intermuscular bones, existing only in teleosts among advanced vertebrates, are segmental, serially homologous ossifications in the myosepta. However, there is limited information on the development and ossification of intermuscular bones. In the present study, the morphological development of intermuscular bone in rice eel (*Monopterus albus*) and weather loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) was investigated using bone clearing and staining method. Study of these two species may imply the evolutionary ossification in teleost due to their different evolutionary status and different swimming modes. The results showed that in *M. albus*, a typical anguilliform swimmer and belonging to Synbranchidae of Synbranchiiformes, initial intermuscular bones (epicentrals) were ossified at anterior part at 30 days post hatching (dph) with the body length (BL) of 40 mm. Then intermuscular bones were ossified from the anterior to the posterior part. At 55 dph (BL 100 mm), all the intermuscular bones were basically appeared with all type “I” epicentral bones. However, in *M. anguillicaudatus*, carangiform swimmer and belonging to Cobitidae of Cypriniformes, initial intermuscular bones including epineurals and epipleural bones were ossified at posterior part at 27 dph (BL 17 mm). Then intermuscular bones were ossified from the posterior to the anterior part. At 40 dph (BL 35 mm), all the intermuscular bones were basically appeared with the types of “I”, “Y” and “卜”. Moreover, through the use of osteoblast specific transcription factor (osterix) green fluorescent protein transgenic (osterix GFP) zebrafish (*Danio rerio*), the process of development and ossification of intermuscular bones were observed *in vivo* and the results showed that the intermuscular bones were ossified from the posterior to the anterior parts in *D. rerio*. The results from this study indicated that the ossification of intermuscular bones might be related to fish swimming mode, and their morphological polymorphism may be correlated with fish swimming mode and body type. However, whether the ossification of intermuscular bones has relation with fish phylogenetic evolution needs to be further explored.

Key words: Rice eel; Weather loach; Osterix GFP zebrafish; Swimming mode; Intermuscular bones; Ossification process