

文章编号: 1674 - 5566(2014)06 - 0810 - 04

## 日本鳗鲡肌间小骨的骨化过程

姚文杰<sup>1</sup>, 龚小玲<sup>1</sup>, 吕耀平<sup>2</sup>, 鲍宝龙<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 浙江省丽水学院 生态学院, 浙江 丽水 323000)

**摘要:** 利用形态解剖和整体骨骼染色的方法, 对日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 成鱼肌间小骨的形态、分布, 以及早期发育阶段肌间小骨的形态发生和骨化过程进行观察。结果表明: 在玻璃鳗阶段, 日本鳗鲡的主轴骨骼和附肢骨骼均已骨化完全, 但肌间小骨并未出现。在鳗线阶段, 体长 5.2 cm 以上的日本鳗鲡椎体小骨、髓弓小骨和脉弓小骨均已出现。其肌间小骨的骨化顺序不同于其他鲤科鱼类从尾部向前依次骨化, 而是从头部向尾部依次骨化。这提示鱼类肌间小骨的骨化可能与其不同的游泳方式有关, 为今后研究肌间小骨发生的分子机制提供了形态学基础。

**研究亮点:** 发现鳗鲡科日本鳗鲡的肌间小骨骨化顺序不同于鲤科鱼类肌间小骨的骨化顺序。其肌间小骨从头部向尾部依次骨化, 提示肌间小骨的骨化可能受不同游泳方式的影响。

**关键词:** 日本鳗鲡; 肌间小骨; 骨化顺序

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 属于鳗鲡目 (Anguilliformes), 鳗鲡科 (Anguillidae), 鳗鲡属 (*Anguilla*)。日本鳗鲡在淡水水域生长, 在海洋中产卵<sup>[1]</sup>。其发育经过胚胎、柳叶鳗、玻璃鳗、鳗线、黄色鳗、银鳗 6 个发育阶段<sup>[2]</sup>。鳗鲡肉质细嫩、味美, 蛋白质和脂肪含量丰富, 是一种高级食用鱼类, 但存在肌间小骨, 影响食用及深加工。

肌间小骨是一种仅存在于真骨鱼类的膜性硬骨, 位于肌隔, 通过结缔组织连接于髓弓、椎体、脉弓或韧带上。根据其不同的连接位置, 可被分为: 连接于髓弓上位于轴上肌肌隔的髓弓小骨; 连接于椎体上位于水平肌隔的椎体小骨; 连接于脉弓或韧带上位于轴下肌肌隔的脉弓小骨。仅骨舌鱼总目月目鱼属 (*Hiodon*) 鱼类的髓弓小骨与髓弓直接融为一体, 但其椎体小骨和脉弓小骨通过韧带连接到椎骨和脉弓上<sup>[3-6]</sup>。PATTERSON 和 JOHNSON 对共 125 属的真骨鱼类进行了详细的观察和统计分析, 发现低等真骨鱼类普遍存在肌间小骨, 而高等真骨鱼类肌间小

骨已经退化, 没有骨化的肌间小骨<sup>[4]</sup>。如我国重要淡水养殖对象鲤科鱼类, 其肌间刺形态最为复杂; 从鲑形目鱼类开始出现退化, 但是仍残留一些简单的肌间小骨; 但高等类群如黄鱼、带鱼等则完全没有肌间小骨<sup>[7]</sup>。

到目前为止, 对于真骨鱼类个体发育过程中肌间小骨骨化模式的研究非常少, 国内外仅对斑马鱼、鲢鱼、唇鲮和欧江彩鲤等极个别真骨鱼类个体发生过程中的肌间小骨形态发生进行过调查<sup>[8-11]</sup>。其骨化过程均为从尾部向前依次骨化, 各种形态的肌间小骨都是从最简单的 I 形发展而来的。目前国内外还没有关于非鲤科鱼类肌间小骨骨化过程的研究, 本研究通过对海鲢总目的日本鳗鲡肌间小骨骨化过程的观察, 为探讨肌间小骨形成原因奠定形态学基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

日本鳗鲡的玻璃鳗于 2010 年 3 月 17 日采自

收稿日期: 2014-03-11 修回日期: 2014-04-20

基金项目: 国家自然科学基金(31201995); 上海市科技兴农重点攻关项目(2013-2-2); 浙江省自然科学基金项目(Y3110477)

作者简介: 姚文杰(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发育生物学。E-mail: yaowenjie1@hotmail.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

长江口九段沙,随机取 50 尾中的 7 尾进行骨骼染色,统计肌间小骨的形态和分布;鳗线于 2005 年 6 月 21 日采自上海吴淞口,随机取 50 尾中的 12 尾进行骨骼染色,统计肌间小骨形态和分布;成鱼于 2005 年采自长江口九段沙,均保存于 95% 乙醇中,取 3 尾统计成体日本鳗鲡肌间小骨的形态和分布。

## 1.2 整体骨骼染色

整体骨骼染色主要参考柯中和等<sup>[9]</sup>的方法。首先将 95% 乙醇固定的日本鳗鲡依次经过 90%、75%、50%、30% 和 15% 乙醇梯度复水,每次 25 min;然后用 TBST[50 mmol/L Tris pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100]漂洗 30 min,以去除样本脂肪组织;转移标本至 1% KOH 溶液中浸泡 30 min,使组织透明,根据日本鳗鲡体长适当调整浸泡时间以确保组织完全透明。经透明的标本转移至新配置的 1% KOH 溶液中,滴加茜素红染色液进行染色,后以 1% KOH 溶液洗去组织中残余的染色液;加入 1% 体积的双氧水,强光下去色素;经 90%、75%、50%、30% 和 15% 甘油梯度脱水,最终加入纯甘油中保存标本。骨骼染色的标本经尼康 SMZ1500 解剖镜观察和拍照,

记录日本鳗鲡肌间小骨数目、位置及形态。

## 1.3 成体日本鳗鲡肌间小骨观察方法

用保鲜膜包裹成体样本,放入灭菌锅中在 0.05~0.10 MPa 的压力范围内蒸 10 min,放置于解剖盘降温,用镊子先去掉皮肤组织,再依次从前往后剔除肌肉组织,并分离出肌节间的椎体小骨、髓弓小骨和脉弓小骨,并按照肌间小骨在鱼体内的位置摆放肌间小骨,记录成体肌间小骨的分布及形态。肌间小骨的形态分型,采用吕耀平等<sup>[6]</sup>的标准。为了便于描述肌间小骨的分布和形态,将肌间小骨按体内的顺序依次用数字编号。

## 2 结果

### 2.1 日本鳗鲡肌间小骨的形态与分布

日本鳗鲡具有髓弓小骨、脉弓小骨和椎体小骨,且均为 I 形。日本鳗鲡成体两侧肌间小骨的分布情况见表 1,左右两侧肌间小骨的数目略有不同,但差异不大。每侧椎体小骨的数目均在 30~32 之间,相对比较稳定。日本鳗鲡成体每一肌节肌间小骨数目为 1.748~1.755。

表 1 成体日本鳗鲡肌间小骨分布的统计

Tab. 1 The statistics of intermuscular bones distribution in adult *A. japonica*

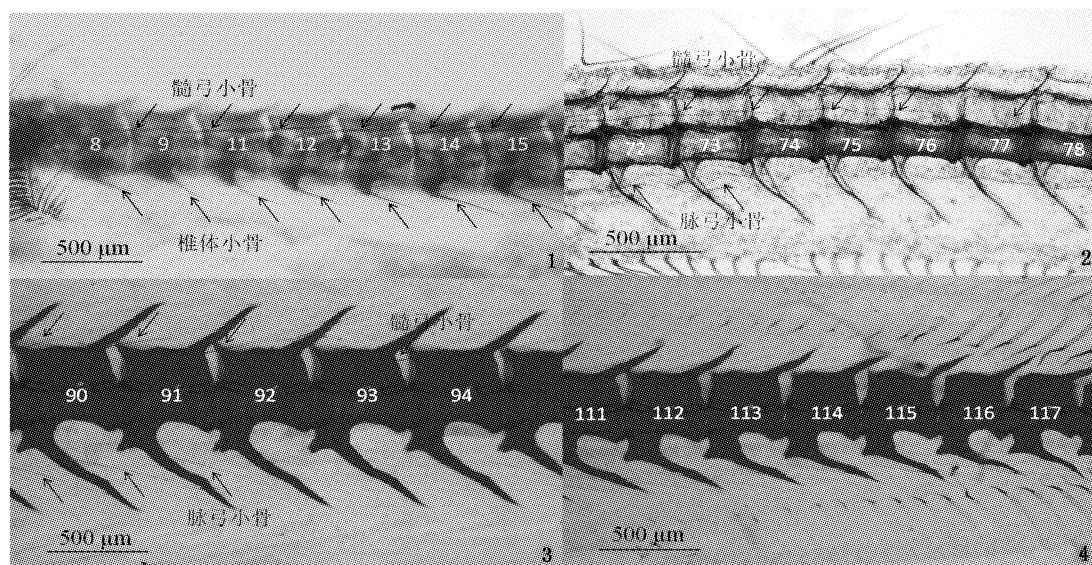
体长 /cm	左侧			右侧			肌间小 骨总数	肌节数	平均肌间小骨 数/肌节
	髓弓小骨	脉弓小骨	椎体小骨	髓弓小骨	脉弓小骨	椎体小骨			
45	90	54	30	92	53	32	351	200	1.755
50	92	52	32	95	56	32	359	204	1.755
52	94	55	31	93	56	31	360	206	1.748
均值	92 ± 2	53.667 ± 1.528	31 ± 1	93.333 ± 1.528	55 ± 1.732	31.667 ± 0.577	356.667 ± 4.933	203.333 ± 3.033	1.753 ± 0.004

### 2.2 日本鳗鲡肌间小骨骨化过程

本研究所检测的日本鳗鲡幼体为玻璃鳗和鳗线。7 尾玻璃鳗体长在 4.984~5.477 cm 之间,均无肌间小骨存在。体长 5.278~10.912 cm 之间的 12 尾鳗线的主轴骨骼和附肢骨骼已经骨化完全,且有骨化的肌间小骨。

通过整体骨骼染色可以发现,髓弓小骨和椎体小骨在身体前部开始出现(图版-1),随后身体较后部位的髓弓小骨和脉弓小骨开始出现(图版-2),随着身体的进一步生长,其肌间小骨在身体越接近尾部的位出现(图版-3),但在所检测的鳗线标本中,部分鳗线尾部的肌间小骨仍

没有全部骨化完(图版-4)。很显然,鳗鲡的肌间小骨是从身体前部开始出现,且每肌节间髓弓小骨和脉弓小骨的骨化时间基本一致。对已出现肌间小骨日本鳗鲡的体长、髓弓小骨平均数目、脉弓小骨平均数目和椎体小骨平均数目进行了统计(表 2)。鳗线每侧椎体小骨平均数目为 31~32,髓弓小骨平均数目在 74~93 之间,脉弓小骨数目在 37~56 之间;同时发现肌间小骨数目随着体长的增加而增加;10.7~10.9 cm 体长的日本鳗鲡肌间小骨数目与成体肌间小骨数目基本一致。



图版 日本鳗鲡鳗线整体骨骼染色结果

Plate Whole-mount staining of skeleton on of elvers *A. japonica*

箭头指示已经骨化的肌间小骨(髓弓小骨和脉弓小骨)。红色信号表明骨骼已经骨化,数字表示脊椎骨数。

表 2 日本鳗鲡鳗线肌间小骨分布的统计

Tab. 2 The statistics of intermuscular bones distribution in elvers *A. japonica*

n = 3

体长/cm	左侧			右侧			总肌间小骨数目
	髓弓小骨	脉弓小骨	椎体小骨	髓弓小骨	脉弓小骨	椎体小骨	
5.2 ~ 5.5	75 ± 3	37 ± 2	31 ± 1	74 ± 2	38 ± 3	32 ± 1	287 ± 1
5.5 ~ 5.8	78 ± 1	38 ± 2	31 ± 0	78 ± 1	38 ± 2	32 ± 1	297 ± 1
5.8 ~ 6.1	80 ± 3	41 ± 2	32 ± 1	81 ± 1	40 ± 2	32 ± 1	306 ± 2
10.7 ~ 10.9	92 ± 3	56 ± 1	32 ± 0	93 ± 2	56 ± 2	31 ± 1	360 ± 2

## 3 讨论

随着真骨鱼类的进化,鱼类肌间小骨的数目逐渐增多,形态也日趋复杂,鲤科鱼类中肌间小骨形态已十分复杂,其后随着鱼类演化又出现退化现象。日本鳗鲡肌间小骨均为 I 形,较其他鲤科鱼类形态简单<sup>[7-8]</sup>。日本鳗鲡成体每一肌节肌间小骨数目比双须舌骨鱼要多,较鲱形总目和骨鳔总目也多<sup>[6]</sup>。可见在真骨鱼类肌间小骨的进化过程中,鳗鲡肌间小骨处于进化阶段。

日本鳗鲡肌间小骨的骨化是在中轴骨骼和附肢骨骼骨化之后发生的,这同在鲤科鱼类中观察到的情况一致。根据柯中和、吕耀平等对斑马鱼、鲢鱼、唇鲮和瓯江彩鲤等肌间小骨的骨化过程的描述<sup>[8-11]</sup>,鲤科鱼类的肌间小骨主要从尾部向前依次骨化。然而不同于鲤科鱼类,日本鳗鲡肌间小骨则是从头部向尾部依次出现。肌间小骨曾被认为可以支持大侧肌的运动,可在鱼类肌

肉中起传递力量的作用,如鲤科等肉质较为疏松的鱼类,其肌间小骨形态十分复杂,甚至出现树枝状分叉<sup>[12-13]</sup>。因此推测日本鳗鲡不同于鲤科鱼类的骨化顺序可能与运动过程中的机械力传导有关。斑马鱼等鲤科鱼类游泳方式属于鲈科模式,其运动时仅身体后 1/3 运动,力从尾部向头部传递;而鳗鲡游泳方式属于鳗鲡模式,其运动时头部先开始摆动,力从头部向尾部依次传递<sup>[14]</sup>。研究认为肌间小骨具有机械力传导的作用,肌间小骨是真骨鱼类进化到一定阶段机械力作用而出现的产物<sup>[15]</sup>,认为一些鱼类的肌肉蛋白质含量比较高,其肌肉力量的传导主要依靠肌肉纤维,因此肌间小骨的数目也比较少;肌间小骨可增强植食性鱼类肌肉的力量,以利于其更好地游泳以适应危险环境及躲避天敌<sup>[16]</sup>。因此我们推测可能由于不同的游泳方式产生不同力的传递方式,因此产生不同的骨化顺序。

研究鳗鲡科鱼类日本鳗鲡的肌间小骨的发

育过程,使人们对鱼类肌间小骨骨化顺序有更充分的了解。日本鳗鲡肌间小骨骨化时,不同于斑马鱼、鲢鱼、唇鲮和欧江彩鲤等鲤科鱼类等肌间小骨从尾部依次向前的骨化顺序,启发我们肌间小骨的骨化可能与运动过程中的机械力传导有关。为我们利用斑马鱼等模式生物开展分子遗传机制研究提供了新的切入点,并对今后主要经济鱼类的推广和改良提供了一定的研究基础。

#### 参考文献:

- [1] KATSUMI T. Oceanic biology: Spawning of eels near a seamount [J]. *Nature*, 2006, 439(7079): 929.
- [2] 张春光. 中国动物志(硬骨鱼纲鳗鲡目背棘鱼目)[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 132.
- [3] 孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. 鱼类比较解剖[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 102 - 103.
- [4] PATTERSON C, JOHNSON G D. The intermuscular bones and ligaments of Teleostean Fishes [M]. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 1995, 559: 1 - 85.
- [5] 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[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(4): 425 - 429.
- [6] 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*, 2008, 17(4): 493 - 496.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 柯中和, 张炜, 蒋燕, 等. 鲢肌间小骨发育的形态学观察[J]. *动物学杂志*, 2008, 43(6): 88 - 96.
- [10] 吕耀平, 陈洁, 鲍宝龙, 等. 唇鲮肌间小骨的骨化过程[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(4): 549 - 553.
- [11] 吕耀平, 周晨晨, 杨丽美, 等. 欧江彩鲤肌间小骨的骨化模式[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(1): 58 - 63.
- [12] 秉志. 幼鲤大侧肌肌隔骨针的观察[J]. *动物学报*, 1962, 14(2): 175 - 178.
- [13] JOHNSON G D, PATTERSON C. The intermuscular system of acanthomorph fishes: a commentary [J]. *American Museum Novitates*, 2001, 3312(1): 1 - 24.
- [14] SFAKIOTAKIS M, LANE D M, DAVIES J B. Review of fish swimming modes for aquatic locomotion [J]. *Journal of Oceanic Engineering*, 1999, 24(2): 237 - 252.
- [15] DANOS N, STAAB K L. Can mechanical forces be responsible for novel bone development and evolution in fishes [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(2): 156 - 161.
- [16] 马良骁, 董在杰, 苏胜彦, 等. 鱼类肌间刺的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(4): 234 - 235, 240.

## The ossification process of the intermuscular bones in *Anguilla japonica*

YAO Wen-jie<sup>1</sup>, GONG Xiao-ling<sup>1</sup>, LÜ Yao-ping<sup>2</sup>, BAO Bao-long<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology, Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. College of Chemistry and Life Sciences, Lishui University, Lishui 323000, Zhejiang, China)

**Abstract:** To further understand the development process of intermuscular bones in teleosts, a modified bone clearing and staining experiment was conducted to investigate morphological development of intermuscular bone in Japanese eel *Anguilla japonica*. It is showed that all the axial skeleton and appendicular skeleton both have completely ossified in the glass eel stage. However, the intermuscular bone does not ossify. During the elvers period, the ossification of epineurals, epicentrals and epipleurals is observed in the anterior part of the body. Each of the intermuscular bones is ossified posteriorly, which is very different to that in other species in Cyprinidae. The results indicate that the forming process of intermuscular bones might have relation with the swimming modes. This study provides some very important information about the morphological development of intermuscular bone in Japanese eel, which will be helpful for us to further understand the molecular mechanism underlying intermuscular bone development.

**Key words:** *Anguilla japonica*; intermuscular bones; ossification process