

## 棘頰海葵魚之初期骨骼發育

鄭明忠<sup>1</sup> · 江玉瑛<sup>1,2</sup> · 何源興<sup>1\*</sup> · 張文炳<sup>3,4</sup> · 彭仁君<sup>2</sup> · 陳文義<sup>1</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所東部海洋生物研究中心

<sup>2</sup>國立台東大學生命科學研究所

<sup>3</sup>國立海洋生物博物館

<sup>4</sup>國立東華大學海洋生物多樣性及演化研究所

### 摘 要

在水溫 24 ~ 28 °C 之飼育條件，棘頰海葵魚 (Spine-cheek anemonefish, *Premnas biaculeatus*) 於孵化後，即可觀察許多骨骼之發育已達一定程度並可於第 1 日開始攝食。此時頭部所有骨骼均以軟骨形式存在，上頷骨、齒骨與咽齒骨會隨著口部發育於第 2 日開始骨化，第 2 與第 3 日的仔魚可見前頷骨、頷骨、齒骨、鰓蓋條和主匙骨陸續骨化，因游泳能力不佳，仔魚必須依靠密克爾氏軟骨、篩骨板、舌骨等來支撐仔魚口部，因此餌料選擇以游動性相對較慢的輪蟲為主。第 4 ~ 5 日，仔魚口徑為  $0.68 \pm 0.26$  mm，此時骨化之咽齒有助於碾碎和破壞獵物結構，因此餌料補充可兼投橈足類，且此時準備進入脊索末端上屈中期；第 7 ~ 8 日，下尾骨開始骨化並可發現牙齒形成，仔魚游泳速度加快並可咬合獵物，因此餌料可改變為較大型之橈足類；第 10 日，脊索末端上屈後期且鰓條開始發育，仔魚游泳能力明顯增強；第 13 ~ 15 日，仔魚各部位鰓條大多骨化完成且體色開始轉變，魚苗游泳能力及口徑發育更加完備，此時開始進入沈降期階段，可補充游泳能力更快、體型更大之豐年蝦及配合飼料馴餌；第 20 日，仔魚標準體長為 6.38 mm，可開始接受人工粒狀飼料；第 31 日，標準體長為 7.65 mm，開始進入稚魚階段。

關鍵詞：棘頰海葵魚、魚苗、骨骼發育

### 前 言

棘頰海葵魚 (Spine-cheek anemonefish) 俗名透紅小丑，屬雀鯛科 (Pomacentridae) 海葵魚亞科 (Amphiprioninae) 之魚類。本亞科可分成海葵魚屬 (*Amphiprion*) 及棘頰海葵魚屬 (*Premnas*)，棘頰海葵魚鰓蓋骨下方有兩支骨質蓋刺，為本屬主要特徵 (Fautin and Allen, 1997)。

初期仔魚在成長過程中，由於各部位器官尚未發育完成，主動攝食及避敵能力有限，而對於可攝食餌料生物之大小，則受限於仔魚口徑大小與攝食骨骼之發育程度 (莊與岳, 1993)。

在魚類攝食機制中，涉及一套複雜頭部骨骼、肌肉、韌帶及肌腱之連動，初次攝食之仔魚具有一個簡單攝食機制，主要由舌骨與下頷骨聯繫，接近變態時期，由舌骨、下頷骨及鰓蓋骨之聯繫以完成更複雜之捕食功能，以有效捕捉到獵物 (Hunt von Herbing, 2001; Turingan *et al.*, 2005)。在海水魚類仔魚研究中，探討攝食偏好和形態功能之關係與攝食骨骼構造發育程度，限制了仔魚期攝食成功之能力 (Wittenrich *et al.*, 2007, 2009)。Wittenrich *et al.* (2007) 記錄夜棲鋸鱗蝦虎魚 (*Priolepis nocturna*) 仔稚魚初期發育及攝食能力，因受限於發育未完全之攝食結構影響，仔魚只能攝食游動力弱之甲藻 (Dinoflagellates) 和鈴纖蟲 (Tintinnids)，因此在開始初次攝食階段，攝食構造發育程度可能是成功捕獲獵物的一個重要因素 (Wittenrich *et al.*, 2007)。

\*通訊作者 / 台東縣成功鎮五權路 22 號; TEL: (089) 850-090 轉 401; FAX: (089) 850-092; E-mail: yshu@mail.tfrin.gov.tw

對於魚類仔稚魚發育之研究，隨著育苗技術進步，仔稚魚各發育階段之樣本容易取得，也克服野生樣本收集困難問題，骨骼發育除了提供個體發育之基本知識外，亦可用於系統分類 (Liu, 2001; Hilton and Johnson, 2007) 與骨骼異常發生 (Gavaia *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2004) 之研究，為了解魚苗發育過程中骨骼異常發生，建立正常骨骼發育之基礎資料仍有其重要性 (Koumoundouros *et al.*, 1997; Faustino and Power, 1999)。骨骼發育有助於理解生物在不同發育階段之形態功能和環境偏好 (Fukuhara, 1992)，對於培育過程中改善飼育條件有正面價值 (Koumoundouros *et al.*, 1999, 2001a; Sfakianakis *et al.*, 2005)。

棘頰海葵魚之研究除了生殖及初期發育 (Kim *et al.*, 2007; 江等, 2012) 之外，尚有針對仔魚之視覺發育 (Job and Bellwood, 1996) 與餌料生物滋養對仔稚魚成長表現 (Kim *et al.*, 2009) 等相關研究。本研究則在人工條件下，進行棘頰海葵魚仔稚魚培育，藉由觀察仔魚之攝食及游泳等相關骨骼發育特徵，進而了解棘頰海葵魚初期發育階段與餌料生物轉變之關係，以作為未來種苗量產之參考。

## 材料與方法

### 一、種魚培育

本研究之棘頰海葵魚購自坊間水族館 12 尾 (印尼海域)，種魚培育之初始體長為 7.5 ~ 12 cm，年齡約為 8 個月至 2 歲。以 1.8 t FRP 水槽 (尺寸為 200 × 80 × 60 cm<sup>3</sup>)，天然採光，置入 4 ~ 5 個巨大異幅海葵，供試驗魚配對及共生，水槽中加設控溫設備，水溫維持在 27 ± 1.5 °C，鹽度為 32 ~ 33 psu，每日餵食二次並交替新鮮蝦肉、魚肉及乾性粒狀配合飼料餵飼。

### 二、仔魚培育

初孵化仔魚具趨光性，使用聚光燈及虹吸管收集仔魚進行培育，育苗水溫為 26 ± 2 °C，鹽度為 34 ± 1 psu，培育槽為 300 L 之圓形 FRP 桶。仔魚孵化後即提供輪蟲 (*Brachionus plicatilis*) 作為開口餌料生物，輪蟲投餵期間，仔魚培育採

水式，以滴流方式添加擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 穩定水質，水中透明度維持在 60 ± 10 cm，第 6 日以後開始兼投橈足類 (Copepod) 並與輪蟲混合投放，第 8 日開始投餵橈足類作為仔魚餌料，每日更換海水 20 ~ 30%，第 15 日開始以微粒浮性飼料馴餌，每日下午抽底一次，並開始流水養殖，每日換水率為 150 ~ 200%。

### 三、仔魚標本採樣與固定

受精卵孵化後進行仔魚培育，第 1 ~ 20 天上午，利用塑膠白碗每日隨機採樣 6 尾，每 3 尾以塑膠吸管置入 3 ml 微量離心管中，以針筒抽出多餘海水後加入市售之 10% 中性福馬林固定。第 20 ~ 32 天則每 3 日採樣 6 尾，每 1 尾以吸管置入 3 ml 微量離心管中，以針筒抽出海水後加入市售之 10% 中性福馬林固定。

### 四、透明骨骼製作

參考 Song and Parenti (1995) 與 Potthoff (1984) 提出之染色法製作，經透明與染色步驟後可觀察到硬骨呈紅色、軟骨呈藍色之骨骼標本，經修改製作流程後可適用於棘頰海葵魚仔稚魚骨骼染色，相關流程如下：

#### (一) 固定

樣本以 10% 中性福馬林固定 24 h 以上。

#### (二) 水洗

以蒸餾水浸泡樣本 24 h 以上。

#### (三) 漂白

為去除魚體表色素，將標本浸泡於 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中進行漂白，待魚體色素消失即可。

#### (四) 脫水

將標本依序浸泡於 30、50、70 及 95% 之酒精溶液中進行脫水，每個濃度間隔約 30 ~ 45 min，視魚體大小而定。

#### (五) 軟骨染色

將 80 ml 95% 酒精 + 20 ml 冰醋酸 + 10 mg

Alcian blue 染劑混合配製軟骨染液冷藏備用，將標本浸泡於染液中 30 ~ 60 min，染色時間視染色程度而異。

#### (六) 中和

軟骨染色後將標本依序浸泡於 95、70、50 及 30% 酒精溶液中脫色，每個濃度間隔 30 min，最後將標本置於蒸餾水中 30 min。

#### (七) 透明

配製酵素溶液 (30 ml 飽和硼酸鈉溶液 + 70 ml 蒸餾水 + 1 g Trypsin)，將標本置入浸泡至肌肉呈現透明為止。

#### (八) 硬骨染色

將標本置入 0.5% KOH 溶液中，加入少許 Alizarin red S 染劑，讓溶液呈紫紅色，標本浸泡時間為 30 ~ 60 min，視染色程度而定。

#### (九) 脫色透明

將標本置入 0.5 % KOH 溶液中 1 天，12 h 後更換 0.5 % KOH。

#### (十) 保存

將標本浸泡於不同比例之 0.5 % KOH 與甘油混合溶液中 (0.5% KOH : 甘油 = 7 : 3、1 : 1、3 : 7) 各 1 天，3 天後置入甘油中保存。

### 五、標本拍攝與觀察

標本製作完成後以解剖顯微鏡搭配數位影像測量分析軟體 (NIS-Elements D 2.30, Nikon) 觀察並拍照記錄骨骼發育，經由染色過程中 Alcian blue 染色並呈現藍色主要為軟骨 (cartilage) 及未骨化 (unossified) 的結構，利用 alizarin red 複染呈現紫紅色則表示已達硬骨骨化 (ossifying) 部份。以標準體長 (Standard length; SL) 為紀錄，各部位骨骼名稱參考 Sfakianakis *et al.* (2005) 及 Koumoundouros *et al.* (1999) 所描述。

#### (一) 頭部骨骼

觀察及記錄上頷骨 (maxilla)、前上頷骨 (premaxilla)、牙齒 (teeth)、密克爾氏軟骨 (Meckel's cartilage)、齒骨 (dentary)、方骨

(quadrate)、角舌骨 (ceratohyal)、下舌骨 (hypohyal)、間舌骨 (interhyal)、鰓蓋條 (branchiostegals)、舌頷骨 (hyomandibular)、續接骨 (symplectic)、鰓蓋系列 (opercular series)、咽齒 (pharyngeal teeth)、小梁軟骨 (trabecula)、篩骨板 (ethmoid plate) 及主匙骨 (cleithrum) 等之發育情形。

#### (二) 脊椎

觀察及記錄脊椎骨中的椎體 (vertebral central)、神經棘 (弓) (neural processes)、血管棘 (弓) (haemal processes)、椎體橫突 (parapophyses) 及腹肋 (pleural rib) 等之發育情形。

#### (三) 背鰭

觀察及記錄前背骨 (predorsals)、近擔鰭骨 (proximal radials)、遠擔鰭骨 (distal radials)、硬棘 (hard spines)、鱗質鰭條 (lepidotrichia) 以及擔鰭骨突 (stay) 等之發育情形。

#### (四) 臀鰭

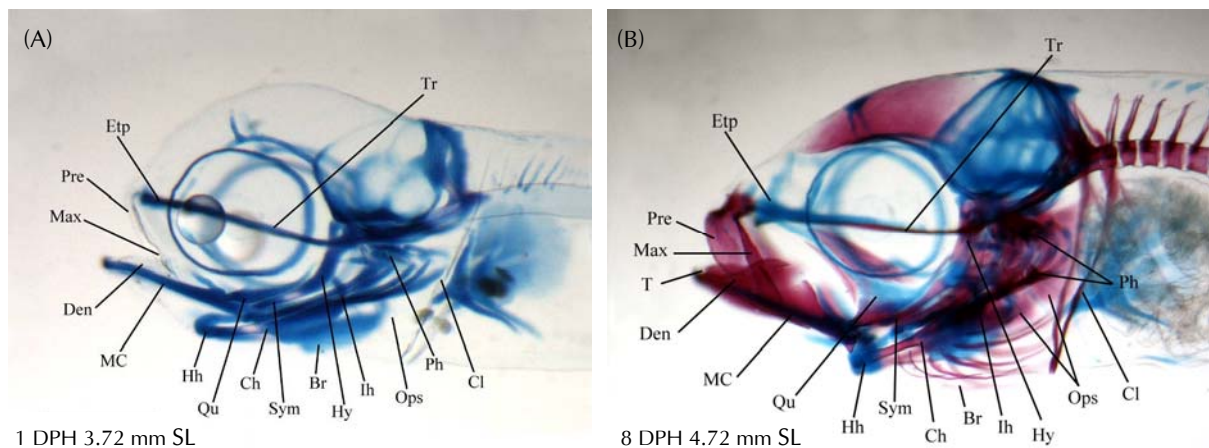
觀察及記錄近擔鰭骨、遠擔鰭骨、硬棘、鱗質鰭條以及擔鰭骨突等之發育情形。

#### (五) 尾鰭

觀察及記錄下尾骨 (hypurals)、上尾骨 (epurals)、準下尾骨 (parhypural)、尾神經骨 (uroneural)、主要鰭條 (principal caudal ray)、次要鰭條 (secondary caudal ray) 及附屬軟骨 (accessory cartilage) 之發育情形。

## 結果與討論

根據研究發現，附著性卵魚類卵徑較大且孵化期長 (Green and McCormick, 2001)，如江等 (2012) 在棘頰海葵魚、何等 (2007) 在眼斑海葵魚 (*A. ocellaris*)、何等 (2009) 在白條海葵魚 (*A. frenatus*)、Kavanagh and Alford (2003) 在多刺棘光鰓雀鯛 (*Acanthochromis polyacanthus*) 及 Wittenrich *et al.* (2007) 在夜棲鋸鱗蝦虎魚 (*Priolepis nocturna*) 等之研究結果，初孵化仔魚不論是攝食骨骼或是游泳能力發育均較完整，如此有助於增加攝餌成功率及逃避敵害。而浮性卵魚

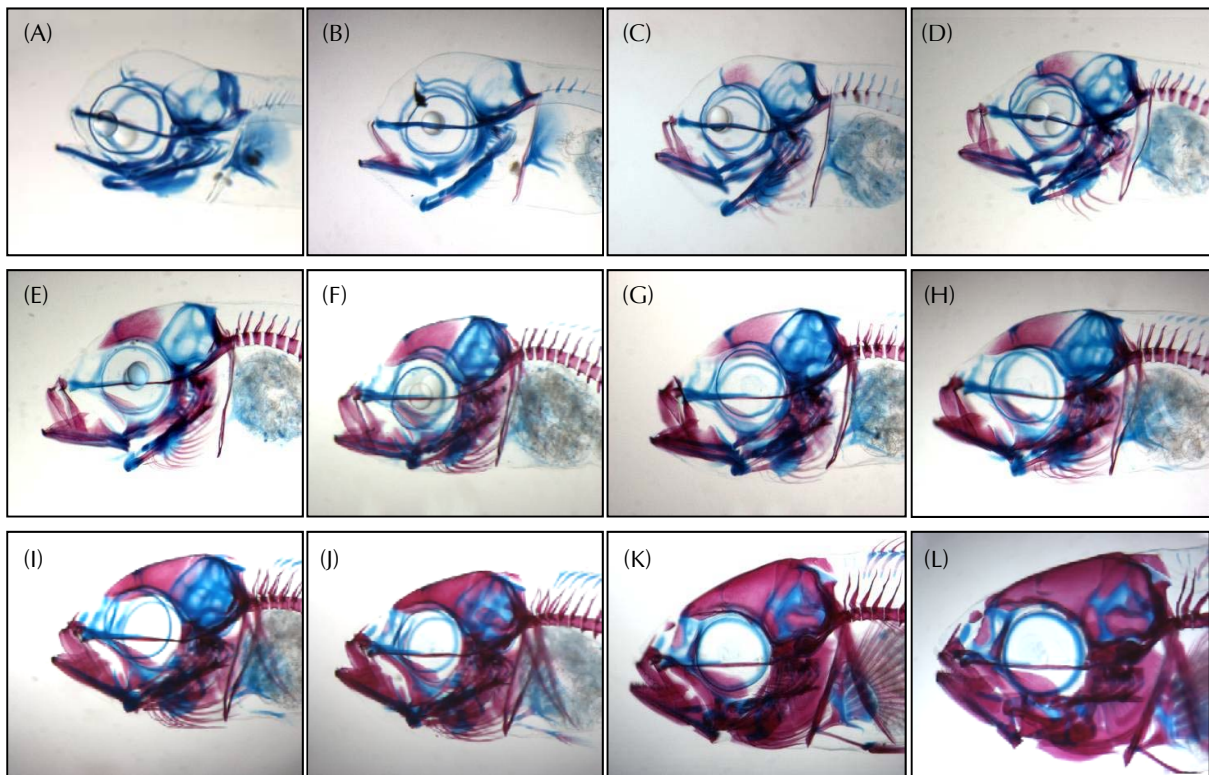


**Fig. 1** Representative cleared and stained specimens of *P. biaculeatus* at (A) 1 DPH and (B) 8 DPH. Elements stained with alcian blue are unossified whereas elements stained with alizarin red are ossified. Elements observed include : Br, branchiostegals; Ch, ceratohyal; Cl, cleithrum; Den, dentary; Etp, ethmoid plate; Hh, hypohyal; Hy, hyomandibular; Ih, interhyal; Max, maxilla; MC, Meckel's cartilage; OpS, opercular series; Ph, pharyngeal teeth; Pre, premaxilla; Quad, quadrate; Sym, symplectic; T, teeth; Tr, trabecula.

類卵徑較小孵化期短，初孵化仔魚之攝食骨骼及游泳能力發育較不完整，例如金頭鯛 (*Sparus aurata*) (Koumoundouros *et al.*, 1997)、細點牙鯛 (*Dentex dentex*) (Koumoundouros *et al.*, 1999) 及尖吻重牙鯛 (*Diplodus puntazzo*) (Sfakianakis *et al.*, 2005) 等孵化後骨骼才開始發育，因此初次攝餌發生在孵化後數日，導致仔魚初期易被其他生物掠食。

大多數魚類骨骼為硬骨結構，其形成方式分為兩種：一是由軟骨直接骨化而來，這類骨骼稱為軟骨化骨 (cartilage bone) 或替代骨 (replacing bone)；另一種方式是在膜質 (結締組織) 上直接骨化而成，中間越過軟骨階段，所形成硬骨稱為膜骨 (membrane bone) (黃, 1997)。Fig. 1 為棘頰海葵魚孵化第 1 天 (Fig. 1A) 與第 8 天 (Fig. 1B) 頭部骨骼發育骨化程度與骨骼名稱，其中密克爾氏軟骨為軟骨，方骨、角舌骨、下舌骨、間舌骨、舌頰骨、續接骨、咽齒、小梁骨、篩骨板為軟骨化骨，其他上頰骨、前上頰骨、牙齒、齒骨、鰓蓋條、鰓蓋系列及主匙骨為膜骨。孵化第 1 日仔魚 (Fig. 2A) 已觀察到篩骨板、密克爾氏軟骨及舌骨，其中密克爾氏軟骨為下頰之初始構造，篩骨板在初期攝食骨骼發育中扮演支撐上頰角色，而舌骨則有利於下頰活動 (Wittenrich *et al.*, 2007)，此時上頰尚無骨骼形成，但其後方已有篩骨板來支撐上頰，此時攝食骨骼皆以軟骨形式存在且仔

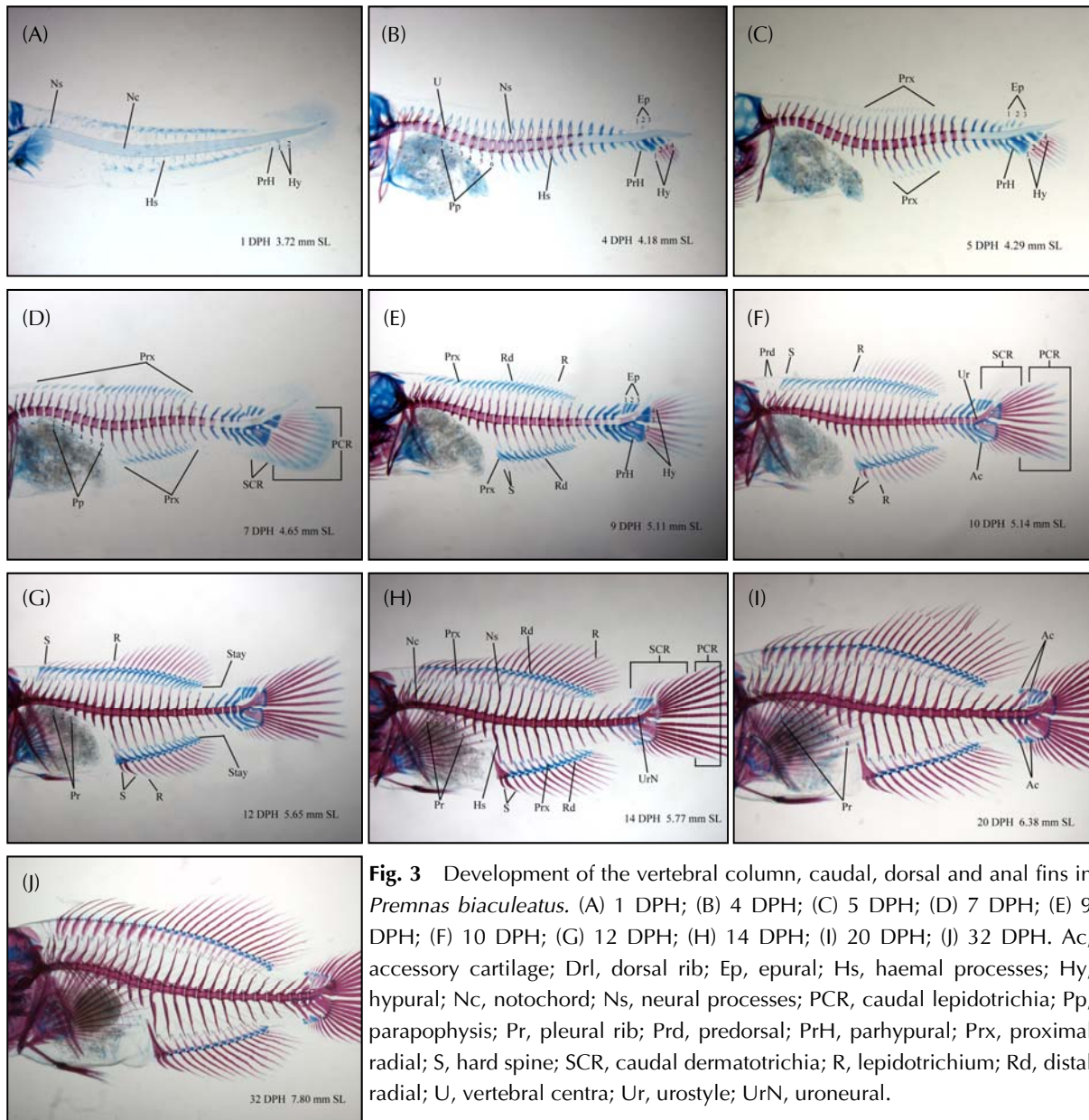
魚已可開口攝食，而輪蟲游泳速度較慢、外殼薄易碎及適口性佳，作為棘頰海葵魚初期餌料非常合適，在眼斑海葵魚 (何等, 2007) 與白條海葵魚 (何等, 2009) 也同樣以輪蟲作為魚苗初期餌料。棘頰海葵魚第 2 日仔魚 (Fig. 2B) 除了頰骨與齒骨之外，主匙骨也開始骨化，其作用為支撐胸骨舌骨肌 (sternohyoideus)，參與開口攝食功能 (Matsuoka, 1987)，另外咽齒骨出現有助於仔魚攝食。第 3 日仔魚 (Fig. 2C) 前頰骨、頰骨、齒骨及鰓蓋條陸續骨化，而方骨、角舌骨、下舌骨、間舌骨、舌頰骨、續接骨、咽齒、小梁骨、篩骨板仍呈軟骨狀態，下頰之齒骨開始骨化後會漸漸地包覆密克爾氏軟骨；第 4 日仔魚 (Fig. 2D) 咽齒已完全骨化，研究指出咽齒骨之作用為碾碎和破壞獵物結構 (甲殼)，以提升消化食物及養分吸收 (Hunt von Herbing *et al.*, 1996; Wainwright and Bellwood, 2002)，在克氏海葵魚 (*A. clarkii*) (Anto *et al.*, 2009) 之研究發現孵化後第 5 日咽齒骨才骨化，並可順利捕食豐年蝦無節幼蟲。第 5~6 日仔魚方骨、舌頰骨和續接骨開始骨化 (Fig. 2E & 2F)；第 7 及 8 日仔魚上頰與下頰牙齒以膜骨形式出現並骨化 (Fig. 2G & 2H) 上、下頰牙齒出現，使魚苗在攝食過程中有助於捕獲獵物以防止逃脫，此時提供較大型橈足類為主；第 9 日仔魚舌頰骨與續接骨完全骨化 (Fig. 2I)；第 10 日仔魚間舌骨與篩骨板開始骨化 (Fig. 2J)；第 13 日仔魚



**Fig. 2** Representative developmental sequence of the feeding apparatus in *Premnas biaculeatus* through ontogeny. Alcian blue stained elements are unossified and alizarin red stained elements are ossified. (A) 1 DPH, 3.72 mm SL; (B) 2 DPH, 3.74 mm SL; (C) 3 DPH, 3.95 mm SL; (D) 4 DPH, 4.18 mm SL; (E) 5 DPH, 4.29 mm SL; (F) 6 DPH, 4.79 mm SL; (G) 7 DPH, 4.65 mm SL; (H) 8 DPH, 4.72 mm SL; (I) 9 DPH, 5.11 mm SL; (J) 10 DPH, 5.14 mm SL; (K) 13 DPH, 5.76 mm SL; (L) 15 DPH, 5.91 mm SL.

(Fig. 2K) 方骨、角舌骨與下舌骨完全骨化；第 15 日仔魚 (Fig. 2L) 間舌骨與鰓蓋系列完全骨化，此時仔魚各部位攝食骨骼大多骨化完成，開始會聚集於水槽底部及角落，觀察仔魚開始進入沈降期階段，在眼斑海葵魚 (蘇, 2010) 及白條海葵魚 (Green and McCormick, 2001) 仔魚開始進入沈降期階段分別在第 10 及第 8 天，可見棘頰海葵魚與其他海葵魚比較，其沉降時間明顯較晚，蘇 (2010) 推測攝食骨骼在這個時間點有明顯變化是為了因應生活史轉變，沈降後食物種類更多元，所以需要更強而有力之攝食骨骼。Aristazabal (2005) 在赤鯛 (*Pagrus pagrus*) 研究指出，初期仔魚於孵化後第 3 日開口，頭部初始骨骼構造長度增加與骨化，提高吸之攝食方式，同時增加所攝食之輪蟲量，咽齒與牙齒出現有利於抓住食物，結合吸與抓之攝食方式，伴隨攝食與游泳相關骨骼骨化，有利於游泳能力改善以提高餌料生物之捕食。

棘頰海葵魚脊椎骨之椎體、神經棘、血管棘、椎體橫突及腹肋之發育情形如 Fig. 3 所示，其中椎體與腹肋為膜骨，其餘為軟骨化骨。在卵黃囊及初孵化仔魚階段椎體尚未發育，可見一直條狀之脊索，第 3 日仔魚由前端開始發育出椎體，第 10 日時達定數 (Fig. 3F)，椎體之骨化是循著尾部方向慢慢形成，與大多數鱸形目魚類有相似之結果 (Houde and Potthoff, 1976; Mook, 1977; Potthoff *et al.*, 1987; Matsuoka, 1987; Faustino and Power, 1998; Koumoundouros *et al.*, 1999)；而 Fraser *et al.* (2004) 在尖吻鱸研究觀察到椎體是以軟骨化骨方式形成，並從第七節附近開始出現後再分別朝吻端及尾部方向陸續形成椎體，與棘頰海葵魚有所差異；脊索末端上屈 (notochord flexion) 開始於體長 4.36 mm，而赤鰭笛鯛 (黃, 2009) 仔魚則在體長 3.68 mm 脊索末端開始上屈，顯示掠食性魚類必需快速發育脊索末端，以利仔魚尾鰭發育且易於攝食。

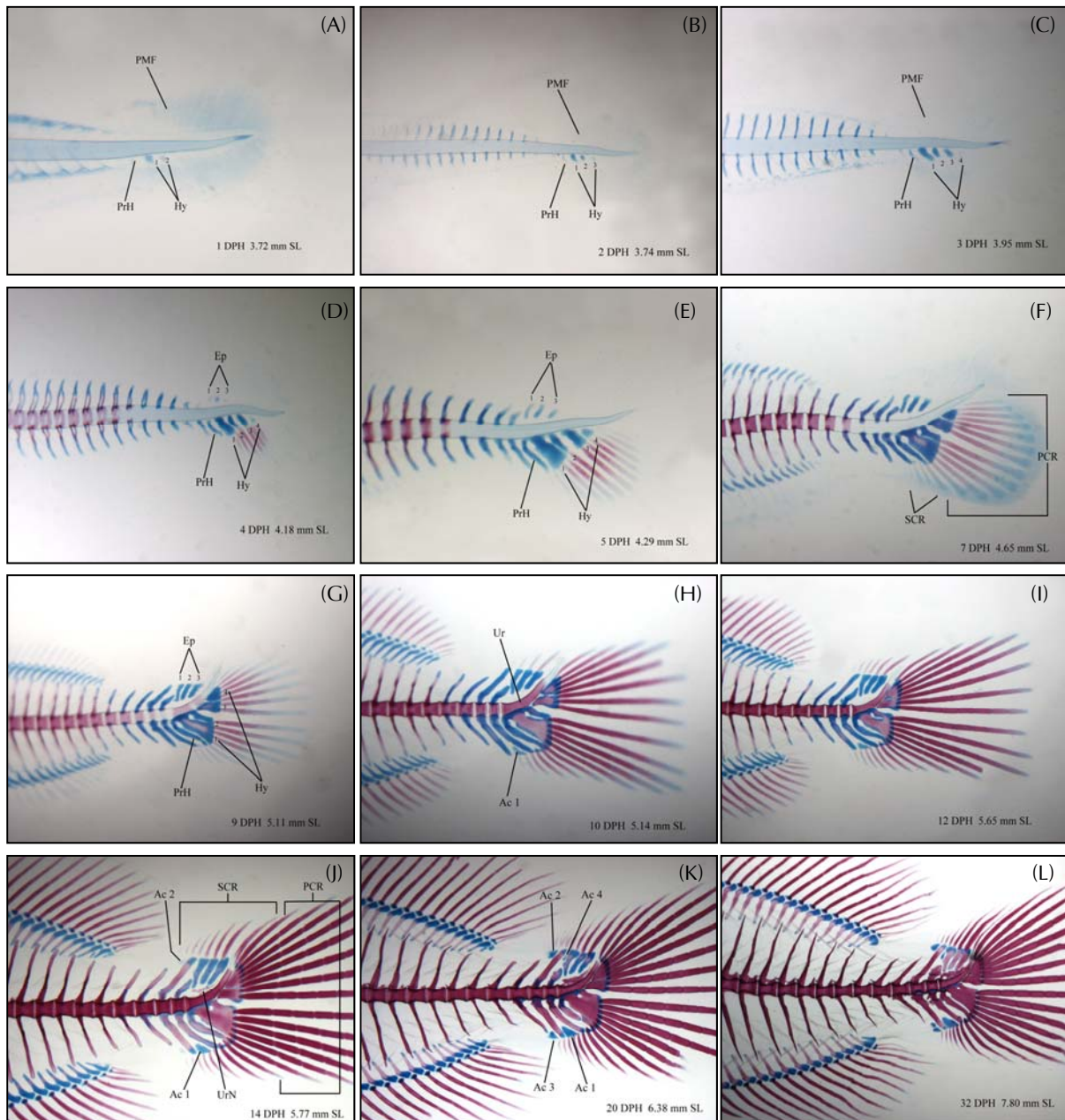


**Fig. 3** Development of the vertebral column, caudal, dorsal and anal fins in *Premnas biaculeatus*. (A) 1 DPH; (B) 4 DPH; (C) 5 DPH; (D) 7 DPH; (E) 9 DPH; (F) 10 DPH; (G) 12 DPH; (H) 14 DPH; (I) 20 DPH; (J) 32 DPH. Ac, accessory cartilage; Drl, dorsal rib; Ep, epural; Hs, haemal processes; Hy, hypural; Nc, notochord; Ns, neural processes; PCR, caudal lepidotrichia; Pp, parapophysis; Pr, pleural rib; Prd, predorsal; PrH, parhypural; Prx, proximal radial; S, hard spine; SCR, caudal dermatotrichia; R, lepidotrichium; Rd, distal radial; U, vertebral centra; Ur, urostyle; UrN, uroneural.

棘頰海葵魚背鰭之前背骨、近擔鰭骨、遠擔鰭骨、硬棘、鱗質鰭條及擔鰭骨突之發育情形如 Fig. 3 所示，其中硬棘及鱗質鰭條為膜骨，其餘為軟骨化骨。背鰭最早出現之骨骼為第 5 日形成之近擔鰭骨 (Fig. 3C)，近擔鰭骨是由靠近脊柱中央位置出現，再分別朝吻端及尾部延續形成，眼斑海葵魚、沙重牙鯛 (*Diplodus sargus*) (Koumoundouros *et al.*, 2001b) 及尖吻重牙鯛 (Sfakianakis *et al.*, 2005) 有相同情形，但 Coban *et al.* (2009) 觀察到赤鯛之近擔鰭骨是由前端開始循著尾部方向陸續形成，與上述魚種之發育順序

有所不同；近擔鰭骨於第 9 日 (5.11 mm) 時達定數，而眼斑海葵魚 (蘇, 2010) 則於體長 4.6 mm 即達到定數，可見棘頰海葵魚近擔鰭骨之發育較慢。遠擔鰭骨出現於第 9 日 (Fig. 3E)，於體長 5.41 mm 時達定數，唯，觀察至第 32 日仍未骨化完全 (Fig. 3J)。近擔鰭骨於第 14 日及前背骨於第 20 日時開始出現局部骨化現象，但持續至第 32 日已達稚魚期仍未骨化完全。

棘頰海葵魚臀鰭之近擔鰭骨、遠擔鰭骨、硬棘、鱗質鰭條及擔鰭骨突之發育情形如 Fig. 3 所示，除硬棘及鱗質鰭條為膜骨外，其餘為軟骨化



**Fig. 4** Development of the caudal fins in *Premnas biaculeatus*. (A) 1 DPH; (B) 2 DPH; (C) 3 DPH; (D) 4 DPH; (E) 5 DPH; (F) 7 DPH; (G) 9 DPH; (H) 10 DPH; (I) 12 DPH; (J) 14 DPH; (K) 20 DPH; (L) 32 DPH. Ac, accessory cartilage; Ep, epural; Hy, hypural; PCR, caudal lepidotrichia; PMF, Primordial fin; PrH, parhypural; SCR, caudal dermatotrichia; Ur, urostyle; UrN, uroneural.

骨。臀鰭最早出現之骨骼為近擔鰭骨 (Fig. 3C)，由中央位置出現，再分別朝吻端及尾部延續形成 (Fig. 3D)，並於第 9 日達定數 (Fig. 3E)。遠擔鰭骨於第 9 日形成，並於體長 5.41 mm 達定數。擔鰭骨突於體長 5.41 mm 出現，於第 12 日時與最末端近擔鰭骨融合 (Fig. 3G)，背鰭及臀鰭之擔鰭骨突可視為退化之魚鰭支撐骨，擔鰭骨突之出

現可使最末端鰭條往前移，使末端擔鰭骨出現二條分叉軟條 (double fin-ray) (Liu, 2001)，在紅甘鯪 (*Seriola dumerili*) (Liu, 2001)、劍旗魚 (*Xiphias gladius*) (Potthoff and Kelley, 1982) 及鯛科魚類 (Koumoundouros *et al.*, 2001; Sfakianakis *et al.*, 2004) 也都發現擔鰭骨突及分叉軟條二個特徵，而 Potthoff (1980) 在鬼頭魚 (*Coryphaena hippurus*)

及棘鬼頭刀 (*C. equiselis*) 研究觀察則無發現擔鰭骨突及分叉軟條存在。棘頰海葵魚臀鰭之近擔鰭骨於體長 5.41 mm 開始骨化，與遠擔鰭骨觀察至第 32 日稚魚期 (Fig. 3J) 仍未完全骨化；臀鰭之鱗質鰭條與硬棘於第 10 日同時出現並已達定數 (Fig. 3F) 與背鰭之鱗質鰭條與硬棘達定數時間不同，蘇 (2010) 觀察發現白條海葵魚及眼斑海葵魚近擔鰭骨、遠擔鰭骨、硬棘、鱗質鰭條與擔鰭骨突之形成比本種快速。

棘頰海葵魚尾部之下尾骨、上尾骨、準下尾骨、尾神經骨、主要鰭條、次要鰭條及附屬軟骨之發育情形如 Fig. 4 所示，其中尾神經骨、主要鰭條、次要鰭條為膜骨，其餘為軟骨化骨。第 1 日仔魚已形成第 1、第 2 下尾骨與準下尾骨 (Fig. 4A)，第 2 ~ 3 日形成第 3 及第 4 下尾骨 (Fig. 4B & 4C)，第 4 ~ 5 日形成第 1 ~ 3 上尾骨 (Fig. 4D & 4E)，於體長 4.36 mm 時脊索開始上屈，第 7 ~ 9 日準下尾骨、第 1 及第 2 下尾骨靠近脊索端融合 (Figs. 4F & 4G)，尾鰭下端開始出現附屬軟骨 (Fig. 4H)，第 12 日第 3 及第 4 下尾骨融合 (Fig. 4I)，在大西洋笛鯛 (*Lutjanus campechanus*) (Potthoff *et al.*, 1988)、鯛科魚類 (Koumoundouros *et al.*, 2001a, b) 及紅甘鯪 (Liu, 2001) 也觀察到融合現象，Johnson (1981) 提出下尾骨融合通常發生在快速游泳之魚類，其目的可能是為了更有效之游泳能力；在個體發育之轉換過程，骨骼之減少和融合，對於不同骨骼之起源和可能之同源性提供了關鍵價值 (Fritzsche and Johnson, 1980)。第 14 日尾鰭上端附屬軟骨 (Fig. 4J) 出現，尾神經骨開始出現並骨化，第 20 日尾鰭下端附屬軟骨 (Fig. 4K) 出現，觀察至第 32 日 (Fig. 4L)，下尾骨及上尾骨皆仍未完全骨化。

初孵化仔魚僅具有原始之鰭褶 (fin fold)，本種第 4 日由下尾骨末端形成主要尾鰭條 (Fig. 4D)，第 10 日時主要尾鰭條達定數共 16 條，上半段由第 3 及第 4 下尾骨末端形成之鰭條數為 8 條，下半段由準下尾骨、第 1 及第 2 下尾骨末端形成的鰭條數亦為 8 條。第 10 日時次要尾鰭條出現 (Fig. 4H)，上半段次要鰭條數為 8 條，下半段次要鰭條為 7 條。尾鰭是棘頰海葵魚最早出現鰭條之部位，此與眼斑海葵魚及白條海葵魚 (蘇, 2010)、安邦雀鯛 (*Pomacentrus amboinensis*)

(Murphy, 2007) 及鯛科魚類 (Koumoundouros *et al.*, 2001a, b; Sfakianakis *et al.*, 2005) 之觀察相同，但不同魚種為適應環境可能會有不同之鰭條發育順序，例如深棕連鰭鰈 (*Enchelyurus brunneolus*) (Watson, 1987) 及雲紋裸皮鮪 (*Gymnapistes marmoratus*) (Neira, 1989) 胸鰭是最早發育鰭條之部位。鰭除了有平衡和協助運動作用外，為了適應棲地和不同生活方式，鰭會特化成不同形狀或構造，以協助魚類進行攝食、呼吸、生殖、爬行、滑翔、跳躍、吸附、發聲和防禦等作用 (Koumoundouros *et al.*, 2001a; 邵與陳, 2004)。

幼魚尋找未來棲息地之行為在魚類行為學上稱為「著苗行為」(Settlement behavior)，此階段對海洋生物而言十分重要，著苗時幼魚需要考慮該棲地之水質、週遭地形還有天敵威脅等變因 (李, 2006)。Green and McCormick (2001) 在三色小丑 (*Amphiprion melanopus*) 的觀察發現，水溫  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  下，於孵化後第 3 日，卵黃消耗的同時消化道也開始發育，接著下頷開始骨化，重要的攝食構造正在形成與發育，此急速結構性的變化可能是其發育的關鍵時期。於孵化後第 8 日，仔魚的各部位的鰭完全骨化且轉變至成魚的體色外形，此時進入變態期正值沈降期 (settlement) 階段；鰭有助於機動性的在海葵與珊瑚礁附近活動，而顏色有助於偽裝和辨識同種個體。另外，蘇 (2010) 在眼斑海葵魚的觀察發現，水溫  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  下，於孵化後第 10 日觀察到明顯硬骨化的前上頷骨、上頷骨與齒骨，此時正好是其生活史由浮游期轉變為沈降期的階段，因此可推測攝食骨骼在這個時間點有明顯的變化是為了因應生活史的轉變，沈降後食物種類更多元化，除了浮游性生物外還增加了底棲性浮游動物以及藻類，所以需要更強而有力的攝食骨骼發育。由骨骼與形質結果可知，仔魚發育初期主要將能量運用於攝食相關形質發育上，仔魚之攝食機能發育必需優先於游泳機能，如此可確保仔稚魚在初期階段不會因飢餓及營養不良而遭到淘汰。本研究觀察棘頰海葵魚仔魚之攝食及游泳等相關骨骼發育特徵，將有利於育苗過程中選擇合適之餌料生物，並了解仔魚游泳能力與避敵反應，以提高仔魚活存率，以作為產業培育海水觀賞魚之參考。



## 謝 辭

本研究經費由行政院農業委員會觀賞魚類研究團隊-開發觀賞魚產業關鍵技術 (99 農科-10.3.1-水-A8) 計畫項下支助, 執行期間承蒙前蘇所長偉成、前蘇副所長茂森及劉主任秘書燈城惠賜寶貴建議與鼓勵, 東部海洋生物研究中心所有同仁之努力協助, 使本研究能順利完成, 併此表達由衷之謝意。

## 參考文獻

- 江玉瑛, 鄭明忠, 何源興, 陳文義 (2012) 棘頰海葵魚之生殖行為及初期發育. 水產研究, 20(1): 35-49.
- 何源興, 陳文義, 施勝中, 彭仁君, 張文炳 (2007) 眼斑海葵魚之生殖行為及育苗研究. 水產研究, 15(2): 43-58.
- 何源興, 施勝中, 鄭明忠, 江玉瑛, 董家宏, 李任棋, 陳文義, 張文炳 (2009) 白條海葵魚之生殖行為及育苗研究. 水產研究, 17(1): 67-79.
- 李承錄 (2006) 有趣的珊瑚礁魚類繁衍行為. 自然保育季刊, 55: 47-53.
- 邵廣昭, 陳麗淑 (2004) 魚類入門. 遠流出版社, 22-23.
- 莊健隆, 岳文勛 (1993) 種魚營養需求及魚類生殖. 水產動物營養及飼料, 239-319.
- 黃振嘉 (2009) 人工飼育條件下赤鰭笛鯛 *Lutjanus erythropterus* 之初期發育及種苗生產. 國立澎湖科技大學海洋創意產業研究所碩士論文.
- 黃貴民 (1997) 魚類學概論. 水產出版社, 133-143.
- 蘇奕彰 (2010) 眼斑海葵魚初期骨骼發育以及鹽度與餌料對其存活及生長之影響. 國立東華大學海洋生物多樣性及演化研究所碩士論文.
- Anto, J., J. Majoris and R. G. Turingan (2009) Prey selection and functional morphology through ontogeny of *Amphiprion clarkii* with a congeneric comparison. J. Fish Biol., 75: 575-590.
- Aristazabal, E. O. (2005) Morphological development of the mouth and improvement in feeding ability in the early larval stages of red porgy, *Pagrus pagrus* (L.). Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero, 17, 43-53.
- Coban, D., C. Suzer, H. O. Kamaci, S. Saka and K. Firat (2009) Early osteological development of the fins in the hatchery-reared red porgy, *Pagrus pagrus* (L. 1758). J. Appl. Ichthyol., 25: 26-32.
- Faustino, M. and D. M. Power (1998) Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. J. Fish Biol., 52: 11-22.
- Faustino, M. and D. M. Power (1999) Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. J. Fish Biol., 54: 1094-1110.
- Fautin, D. G. and G. R. Allen (1997) Anemonefishes and Their Host Sea Anemones: A Guide for Aquarists and Divers (Revised Edition). Western Australian Museum, 160 pp.
- Fraser, M. R., T. A. Anderson and R. de Nys (2004) Ontogenetic development of the spine and spinal deformities in larval barramundi (*Lates calcarifer*) culture. Aquaculture, 242, 697-711.
- Fritzsche, R. A. and G. D. Johnson (1980) Early osteological development of white perch and striped bass with emphasis on identification of their larvae. Trans. Amer. Fish., 109 (4): 387-406.
- Fukuhara, O. (1992) Study on the development of functional morphology and behaviour of the larvae of eight commercially valuable teleost fishes. Contrib. to the Fish. Res. in the Japan Sea Block, 25: 1-22.
- Gavaia, P. J., M. T. Dinis and M. L. Cancela (2002) Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 211: 305-323.
- Green, B. S. and M. I. McCormick (2001) Ontogeny of the digestive and feeding systems in the anemonefish *Amphiprion melanopus*. Environ. Biol. Fishes, 61: 73-83.
- Hilton, E. J. and G. D. Johnson (2007) When two equals three: developmental osteology and homology of the caudal skeleton in carangid fishes (Perciformes: Carangidae). Evolut. & Develop., 9(2): 178-189.
- Houde, E. D. and T. Pothoff (1976) Egg and larval development of the sea bream. *Archosargus rhomboidalis* (Linnaeus): Pisces, Sparidae. Bull. Mar. Sci., 26: 506-529.
- Hunt von Herbing, I., T. Miyake, B. K. Hall and R. G. Boutilier (1996) Ontogeny of feeding and respiration in larval Atlantic cod *Gadus morhua* (Teleostei, Gadiformes): I. Morphology. J. Morphol., 227: 15-35.
- Hunt von Herbing, I. (2001) Development of feeding structures in larval fish with different life histories: winter flounder and Atlantic cod. J. Fish Biol., 59: 767-782.

- Job, S. D. and D. R. Bellwood (1996) Visual acuity and feeding in larval *Premnas biaculeatus*. *J. Fish Biol.*, 48: 952-963.
- Johnson, G. D. (1981) The limits and relationships of the Lutjanidae and associated families. *Bull. Scripps Instit. Oceanogr.*, 24: 1-114.
- Kavanagh, K. D. and R. A. Alford (2003) Sensory and skeletal development and growth in relation to the duration of the embryonic and larval stages in damselfishes (Pomacentridae). *Biol. J. Linnean Soc.*, 80: 187-206.
- Kendall, A. W., E. H. Ahlstrom and H. G. Moser (1984) Early life history stages of fishes and their characters. *In Ontogeny and Systematics of Fishes* (H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall, S. L. Richardson, eds.), Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol., Spec. Pub. No. 1., Allen Press Inc, Lawrence, Kansas, 11-22.
- Kim, J. S., Y. U. Choi, S. Rho, Y. S. Yoon, M. M. Jung, Y. B. Song, C. H. Lee and Y. D. Lee (2007) Spawning behavior, egg and larvae developments of Maroon clownfish, *Premnas biaculeatus*. *J. Aquacul.*, 20 (2): 96-105.
- Kim, J. S., S. Rho, Y. U. Choi, W. P. Kim and M. M. Jung (2009) Feeding regime of phyto- and zoo live food organisms for the optimum growth and survival of maroon clown fish, *Premnas biaculeatus* early larvae. *J. Korean Fish. Soc.*, 42 (1): 56-62.
- Kohno, H., R. Ordonio-Aguilar, A. Ohno and Y. Taki (1996) Osteological development of the feeding apparatus in early stage of larvae of the seabass, *Lates calcarifer*. *Ichthyol. Res.*, 43: 1-9.
- Koumoundouros, G., F. Gagliardi, P. Divanach, C. Boglione, S. Cataudella and M. Kentouri, (1997) Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture*, 149: 215-226.
- Koumoundouros, G., P. Divanach and M. Kentouri (1999) Osteological development of the vertebral column and of the caudal complex in *Dentex dentex*. *J. Fish Biol.*, 54: 424-436.
- Koumoundouros, G., P. Divanach and M. Kentouri (2001a) Osteological development of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae): dorsal, anal, paired fins and squamation. *Mar. Biol.*, 138: 399-406.
- Koumoundouros, G., D. G. Sfakianakis, E. Maingot, P. Divanach and M. Kentouri (2001b) Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Diplodus sargus* (Teleostei: Perciformes: Sparidae). *Mar. Biol.*, 139: 853-862.
- Liu, C. H. (2001) Early osteological development of the yellow tail *Seriola dumerili* (Pisces: Carangidae). *Zool. Stud.*, 40: 289-298.
- Matsuoka, M. (1987) Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in the red sea bream. *Bull. Seikai Regional Fish. Res. Lab.*, 65: 1-114.
- Mook, D. (1977) Larval and osteological development of the sheepshead, *Archosargus probatocephallus* (Pisces: Sparidae). *Copeia*, 1: 126-133.
- Murphy, B. F., J. M. Leis and K. D. Kavanagh (2007) Larval development of the ambon damselfish *Pomacentrus amboinensis*, with a summary of pomacentrid development. *J. Fish Biol.*, 71: 569-584.
- Neira, F. J. (1989) Larval development of the Australian Devilfish, *Gymnapistes marmoratus* (Teleostei: Scorpaenidae). *Fish. Bull.*, 87: 889-898.
- Potthoff, T. (1980) Development and structure of fins and fin supports in dolphin fishes *Coryphaena hippurus* and *Coryphaena equiselis*. *Fish. Bull.*, 78: 277-312.
- Potthoff, T. and S. Kelley (1982) Development of the vertebral column, fins and fin supports, branchiostegal rays, and squamation in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Fish. Bull.*, 80: 161-186.
- Potthoff, T. (1984) Clearing and staining techniques. *In: Ontogeny and Systematics of Fishes* (H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall, S. L. Richardson, eds.), Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol., Spec. Pub. No. 1., Allen Press Inc, Lawrence, Kansas, 35-37.
- Potthoff, T., S. Kelley, V. Saksena, M. Moe and F. Young (1987) Description of larval and juvenile yellowtail damselfish *Microspathodon chrysurus*, Pomacentridae, and their osteological development. *Bull. Mar. Sci.*, 40: 330-375.
- Potthoff, T., S. Kelley and L. A. Collins (1988) Osteological development of the red snapper, *Lutjanus campechanus* (Lutjanidae). *Bull. Mar. Sci.*, 43: 1-40.
- Sfakianakis, D. G., Koumoundouros, G., Divanach, P., Kentouri, M. (2004) Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758): Temperature effect on the developmental plasticity and morphoanatomical abnormalities. *Aquaculture*, 232: 407-424.

- Sfakianakis, D. G., C. K. Doxa, S. Kouttouki, G. Koumoundouros, E. Maingot, P. Divanach and M. Kentouri (2005) Osteological Development of the Vertebral Column and of the Fins in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *Aquaculture*, 250: 36-46.
- Song, J. and L. R. Parenti (1995) Clearing and staining whole fish specimens for simultaneous demonstration of bone, cartilage, and nerves. *Copeia*, 1: 114-118.
- Turingan, R. G., J. L. Beck, J. M. Krebs and J. D. Licamele (2005) Development of feeding mechanics in marine fish larvae and the swimming behavior of zooplankton prey: implications for rearing marine fishes. *In* *Copepods in Aquaculture* (C. S. Lee, P. J. O'Bryen, N. M. Marcus eds.), Blackwell Pub., Amer., Iowa, USA, 234-248.
- Wainwright, P. C. and D. R. Bellwood (2002) Ecomorphology of feeding in coral reef fishes. *In* *Coral Reef Fishes* (P. F. Sale ed.), Academic Press, San Diego, 33-55.
- Watson, W. (1987) Larval development of the endemic Hawaiian blennioid, *Enchelyurus brunneolus* (Pisces: Blenniidae: Omobranchini). *Bull. Mar. Sci.*, 41: 856-888.
- Wittenrich, M. L., R. G. Turingan and R. L. Creswell (2007) Spawning, early development and first feeding the gobioid fish *Priolepis nocturna*. *Aquaculture*, 270: 132-141.
- Wittenrich, M. L., N. R. Rhody, R. G. Turingan and K. L. Main (2009) Coupling osteological development of the feeding apparatus with feeding performance in common snook, *Centropomus undecimalis*, larvae: Identifying morphological constraints to feeding. *Aquaculture*, 294: 221-227.

## Early Osteological Development of the Spine-cheek Anemonefish (*Premnas biaculeatus*) in Taiwan

Ming-Jong Cheng<sup>1</sup>, Yu-Ying Jiang<sup>1,2</sup>, Yuan-Shing Ho<sup>1\*</sup>, Wen-Been Chang<sup>3,4</sup>

Jen-Jiun Perng<sup>2</sup> and Wen-Yie Chen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eastern Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Institute of Life Science, National Taitung University

<sup>3</sup>National Museum of Marine Biology and Aquarium

<sup>4</sup>Institute of Marine Biodiversity and Evolution, National Dong Hwa University

### ABSTRACT

At the water temperature of 24 ~ 28 °C, the osteological development of Spine-cheek anemonefish, *Premnas biaculeatus* (Bloch, 1790) larvae had partially proceeded after hatching. Larvae were fed on the first day post hatch (DPH), while all cephalic skeletons were still cartilaginous. On the 2nd DPH, the maxillary, dentary and pharyngeal teeth started to ossify. Premaxilla, maxilla, dentary, branchiostegals and celeithum ossified on the 2nd and 3rd DPH. Due to the poor swimming capability only and the Meckel's cartilage, ethmoid plate, and hyoid bone to support the structure of mouth, larvae were fed on rotifers that have relatively slow motility. Mouth opening of larvae was  $0.68 \pm 0.26$  mm on the 4th ~ 5th DPH. The ossified pharyngeal teeth helped shredding and wrecking food including copepods which were also supplied concurrently. Notochord flexion was also occurring. The hypurals and dentary teeth ossified on the 7th ~ 8th DPH that larvae could swim faster and eat larger adult copepods. The development of notochord postflexion was completed, caudal rays began to develop and larval swimming increased significantly on the 10th DPH. Most rays in the various parts of the larvae well ossified and body coloration pattern changed on the 13th ~ 15th DPH. The ability of larval swimming well developed and mouth opening increased as the sedimentation stage. Larval swam faster than large-size *Artemia* and mixed food can be fed. The larvae began to eat the larger artificial pellet feed (SL,  $6.38 \pm 0.8$  mm) on the 20th DPH and reached the juvenile stage (SL, 7.65 mm) on the 31th DPH.

**Key words:** *Premnas biaculeatus*, larva, osteological development

---

\*Correspondence: 22 Wu-Chuan Rd., Chengkung, Taitung 961, Taiwan. TEL: (089) 850-090 ext. 401; FAX: (089) 850-092; E-mail: yshu@mail.tfrin.gov.tw