

厦门 2种文昌鱼的实验室饲养与繁殖

张秋金^{1,2} 陈路¹ 吕小梅³ 李光¹ 方少华³ 王义权¹

(1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005 2. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350108 3. 福建海洋研究所, 厦门 361012)

THE LABORATORY CULTURE AND REPRODUCTION OF TWO IANCELETS IN XIAMEN

ZHANG Qiu-Jin^{1,2}, CHEN Lu¹, LÜ Xiao-Mei³, LI Guang¹, FANG Shao-Hua³ and WANG Yi-Quan¹

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005 2. College of Life Sciences, Fujian Normal University,

Fuzhou 350108 3. Fujian Institute of Oceanology, Xiamen 361012)

关键词: 白氏文昌鱼; 日本文昌鱼; 实验室饲养; 繁殖; 子二代

Key words *Branchiostoma belcheri*; *B. japonicum*; Laboratory culture; Reproduction; The second filial generation

中图分类号: S965.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)02-0348-04

文昌鱼属于脊索动物门头索动物亚门, 由于独特的进化地位, 生物学家普遍认为文昌鱼在不久的将来会成为实验室模式动物^[1,2], 全世界许多科学家正致力于文昌鱼的模式化工作, 要使文昌鱼成为实验室模式动物, 首先要实现它在实验室的连续繁育, 保证它能一代又一代的繁育下去。另一方面, 文昌鱼具有潜在的经济价值, 厦门曾经拥有世界上唯一的文昌鱼渔场, 但随着人口剧增、人类生产生活严重破坏了文昌鱼的栖息环境, 导致文昌鱼渔场的消失, 目前文昌鱼已被列为国家二级重点保护对象, 要利用文昌鱼的经济价值, 也需要通过人工增殖进行大量繁殖, 而实验室的饲养与繁殖是人工增殖的基础。

在实验室饲养、繁殖文昌鱼方面, 很多学者作了大量有益的试验, 但大多报道只涉及文昌鱼室内产卵^[3-16], 而未见孵化后幼体成功饲养的报道, 长期以来都未能在实验室连续繁育文昌鱼^[17]。为了解决这个难题, 我们利用厦门海滨的有利条件, 进行文昌鱼实验室饲养及人工繁殖, 取得了重要进展, 在国内外首次获得了子二代, 从而成功实现文昌鱼的实验室连续繁育^[18], 使得文昌鱼模式化进程有了新的起点, 也为文昌鱼人工增殖奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验室饲养的亲体 我们实验室从 2003年 9月开始

采集、饲养文昌鱼。根据潮汐变化选择潮位较低的日期在厦门文昌鱼自然保护区内的黄厝、南线及蟹口等海区, 按照当地渔民捕捉文昌鱼的方法进行标本采集, 采集之后运回实验室。由于起初并不清楚其中有 2 个物种, 因此所有采得的水文鱼混在一起饲养, 后来研究发现原先所称的厦门文昌鱼其实包含有 2 个独立物种, 即日本文昌鱼 *Branchiostoma japonicum* 和白氏文昌鱼 *B. belcheri*^[19,20], 因此从 2004年底开始将 2 种分开饲养。2006年实验室饲养的水文鱼包括: 2004年和 2005年野外采获的水文鱼, 同种合并饲养; 2006年采获的水文鱼, 按照不同采集时间分容器饲养; 2005年实验室繁殖的子一代。

1.2 成体的饲养与管理 根据成体数量的多少, 把文昌鱼饲养在形状、大小不同的容器中^[18], 容器有 50cm × 35cm × 30cm 透明塑料桶、直径 40cm 高 16cm 的不透明灰白塑料盆和直径 28cm 高 11cm、不同颜色的塑料盆等。养文昌鱼的容器内, 垫以 5—10cm 的海沙, 海沙取自文昌鱼生活的海区, 经金属网筛 (1mm 网格) 筛过、先用淡水浸泡 2 d 再用新鲜海水浸洗 2 次。加入经沙滤处理的天然海水, 水面高出沙面 5—10cm, 连续充气, 置于室内自然光照, 全年水温通过空调器控制在 10℃ (冬季) 和 30℃ (夏季) 之间。饲养密度取决于文昌鱼个体大小及沙层表面积, 一般每平米饲养成体 2000—3000 尾。每天喂以单细胞藻 2 次, 8:00am—9:00am、5:00pm—6:00pm 各一次, 投饵前更换部分海水; 投饵量视容

收稿日期: 2007-02-06 修订日期: 2008-01-19

基金项目: 国家自然科学基金 (30570208); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20070384041) 资助

通讯作者: 王义权, E-mail: wangyc@xmu.edu.cn

器内文昌鱼个体大小及数量而定,一般以投饵 3—4 h后肉眼仍可见桶中海水略显混浊为度。每次喂养之前观察记录饲养容器的海水水温、盐度和 pH 变化,尽量保持这些因素与其采集地一致。每隔 30 天左右清洗一次养殖容器内的沙层,以保持清洁。洗沙时,将沙连同文昌鱼一起放入金属网筛(1mm 网格),在海水中轻轻不断摇动,沙可落过网筛,鱼在网筛中,容易将鱼与沙分开,筛出的沙用淡水清洗、海水浸泡后可再使用。

1.3 幼体的饲养与管理 文昌鱼从开口到变态完成成为幼体(Larvae)阶段。饲养幼体的容器与成体一样,但在幼体早、中期的饲养容器底部不必垫沙。幼体开口后,应及时投喂单细胞藻类,幼体的饲养密度视幼体大小控制在每毫升海水 10—40 尾。刚孵化的个体小、密度可高些,邻近变态时个体较大、密度应低些。同亲体一样,保持通气,每天投喂 2 次,投饵前适量替换部分海水,替换海水时用 300 目筛绢遮于饲养盆上方,从筛绢上方舀出海水,然后加入适量新鲜海水并投喂藻类。饲养幼体的容器每过一段时间就会沉积食物残渣及幼体排出的粪便,会严重影响幼体的存活,必须及时清理。清理时,先把水体上层干净的海水连同浮在水体中的幼体倒入另一干净的大盆,而盆底部分可用替换海水时采用 300 目筛绢过滤的方法把脏物浓缩,然后转移到玻璃培养皿,于解剖镜下用吸管慢慢将脏物吸去,留下幼体。待幼体发育到 8 鳃裂以上,可以开始添加细沙以便于幼体变态后能及时潜入沙中,用于饲养亚成体文昌鱼的细沙比成体细,可用金属网筛(0.5mm 网格)筛过,为了便于清理,起始阶段沙层不宜厚,控制在 1cm 以下。

1.4 亚成体的饲养与管理 把文昌鱼变态完成到性腺开始发育称为亚成体(Juveniles)阶段,其饲养管理方法与成体基本相似。保持通气、定时投喂足量饵料;保持养殖盆细沙的干净对提高亚成体的成活率很重要,每月清洗沙层 1—2 次。洗沙时与成体稍有不同,因为亚成体文昌鱼很小,不易与细沙分开,清洗时分批把少量细沙连同文昌鱼一起放到大的培养皿中,然后加入适量的干净海水,轻轻摇动,趁文昌鱼露出沙面后,把海水连同文昌鱼一起倒出到另一盆中,不断重复直到细沙里文昌鱼全部筛出为止,然后再把文昌鱼中的脏物吸去(体长 1cm 以上的亚成体,可借助 50—100 目的筛绢把文昌鱼和脏的海水分开)。随着文昌鱼的生长,应该逐渐增加沙层厚度,并适当加些饲养成体用的粗沙。

1.5 文昌鱼的饵料—单细胞藻类的培养 文昌鱼幼体开口后就终生以单细胞藻类为食,文昌鱼人工饲养繁殖能否成功的一个很重要因素是必须提供充足的饵料。因此在实验室内,以 f/2 藻类培养液在透明塑料桶中,24h 光照大量培养小球藻 *Chlorella* sp.、角毛藻 *Chaetoceros muelleri*、叉鞭金藻 *Dicrateria* sp.、等鞭金藻 *Isodrysis* sp.、巴夫藻 *Pavlova viridis* 等(图 1)。



图 1 文昌鱼饵料室内培养

Fig. 1 The culture of algae in the laboratory

2 结果

2.1 文昌鱼实验室饲养

以文昌鱼能否存活并正常生长、性腺能否发育成熟并产卵繁殖作为室内饲养成功与否的衡量标准。我们实验室饲养的 2 种文昌鱼,都可以存活、正常生长,而且性腺都发育成熟、产卵繁殖。从子一代的生长过程看^[18],2005 年 8 月底孵化的日本文昌鱼变态后从 10 月 28 日体长 7.96mm 增长到 12 月的 14.86mm,满 1 龄时体长达到 27.72mm;7 月底孵化的白氏文昌鱼变态后从 9 月 28 日体长 7.21mm 增长到 12 月 30 日的 16.96mm,一龄时体长达到 28.23mm。日本文昌鱼和白氏文昌鱼从变态后到当年 12 月份月平均增长分别 3.45mm 和 3.25mm,与海区文昌鱼的生长状况基本一致^[21],甚至比海区的生长还略快些。这说明实验室的饲养模式适合于文昌鱼的生长发育。

2.2 文昌鱼实验室繁殖

2004 年,4 月 6 日采自黄厝的亲体在 5 月 2 日有过一次产卵,由于缺乏经验而未及时发现。2005 年,8 月 26 日从欧厝南线采获的日本文昌鱼于 8 月 26—29 日连续 4 个晚上,成功繁育出子一代;7 月 22 日从欧厝蟹口采获的白氏文昌鱼于 7 月 24—27 日连续 4 个晚上产卵,同样繁育出子一代。2006 年,实验室饲养的 2 种文昌鱼大量产卵,日本文昌鱼从 5 月 2 日至 10 月 23 日,共有 53 个晚上产卵,白氏文昌鱼从 6 月 16 日至 9 月 9 日,共有 30 个晚上产卵,有 11 个晚上 2 种同时产卵(图 2)。室内文昌鱼每晚的产卵数量不等,多者可达数十万枚,少则只收集到数百枚。

2006 年饲养的 2 种文昌鱼,除了 9 月 5 日采获的白氏文昌鱼(采获时部分个体还具有成熟性腺)没有产卵外,其他所有饲养盆都见有产卵。每个容器饲养的文昌鱼个体数,日本文昌鱼最少 8 尾、最多 800 多尾,白氏文昌鱼 28—500 尾。可见室内产卵可能与种群大小没有关系,在模式化过程中,有望成对单独饲养并促使其产卵。

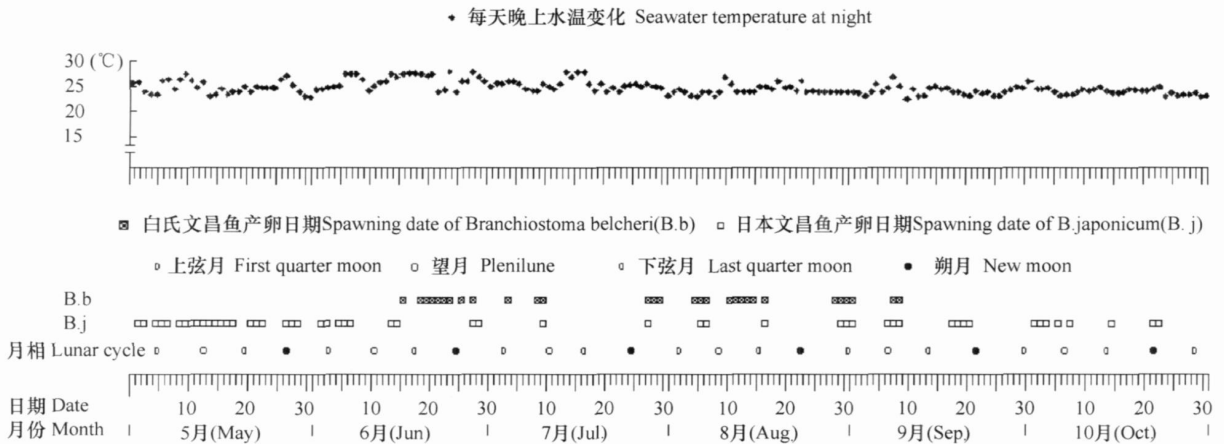


图 2 2种文昌鱼室内产卵日期与月相、水温变化的关系

Fig 2 The relationship between the spawning dates of two lancelets and lunar cycle as well as seawater temperature

2006年实验室内,文昌鱼从5月2日开始产卵,一直到10月23日才结束。从5月1日至10月31日夜间,饲养盆水温为 24.83 ± 1.30 ($22.5 - 28.1$) $^{\circ}\text{C}$;而在日本文昌鱼和白氏文昌鱼发生产卵的夜间水温分别为 25.01 ± 1.35 ($23 - 28$) $^{\circ}\text{C}$ 和 25.07 ± 1.40 ($23 - 23.7$) $^{\circ}\text{C}$,二者没有显著性差异 ($p = 0.87$);产卵时海水盐度波动在 $28\% - 31.5\%$ 。在产卵发生日期,天气多种多样,显示室内产卵与天气的变化关系不明显;产卵的发生与月相之间也没有必然的联系(图2)。

3 讨论

3.1 文昌鱼实验室饲养

关于文昌鱼的人工饲养方法缺乏较详细的研究,已有的报道大多属于短期暂养,即在繁殖季节从海区采集性腺发育成熟的文昌鱼于室内暂养以获取胚胎进行相关研究,然而关于文昌鱼产卵、孵化、孵化后幼体的饲养与管理的报道极少,更未见室内长期饲养、连续繁殖的报道。我们针对文昌鱼不同发育时期,采取不同的饲养管理方法,成功实现了文昌鱼的实验室连续饲养,能把室内孵化的幼体饲养到性腺发育成熟并产卵繁殖。

在实验室养活文昌鱼并不困难^[21],但要使文昌鱼性腺发育成熟并产卵则不容易。影响文昌鱼生长发育的因素很多,其中海水温度、盐度、酸碱度,光照、通气等条件较容易得以满足,但饲养文昌鱼还须考虑容器、沙层、饲养密度、饵料等问题。室内各种不同容器都可以饲养文昌鱼^[6-14,21],我们把文昌鱼饲养在不同形状、大小、质地的容器内也都可以产卵,但必须预防容器过浅、水面过高导致文昌鱼在夜间跳出容器。在文昌鱼的饲养中,大多在容器底部放置4-20 cm不等的沙层,从文昌鱼分布海区取回的沙都含有颗粒大小不同的贝壳,这有利于通气,我们用金属网筛滤去大的沙粒和贝壳,不但有利于文昌鱼潜沙,也便于日常管理;无沙的饲养易造成文昌鱼身体前端发生损伤而导致死亡。目前文昌鱼的饲养还只能利用天然海水,利用人工海水的饲养尚待进一步试验。

是提供充足的饵料,保证文昌鱼正常生长发育,使性腺发育成熟,这是文昌鱼繁殖的基础;如果饵料不足,会延缓性腺发育,导致性腺发育不同步,延迟产卵期^[7],从野外采集的已经有性腺的文昌鱼在缺乏饵料条件下,其性腺会逐渐被吸收而退化^[15],成功培养单细胞藻类是成功饲养繁殖文昌鱼的基础。二是文昌鱼栖息沙层的清洁,在文昌鱼的实验室饲养报道中,从未提及室内文昌鱼栖息环境的清洁问题。因为室内饲养容器体积小,缺乏海区的自净化能力,文昌鱼产生的粪便及食物残渣的积累会严重影响文昌鱼的生存,因此必须及时清理。文昌鱼幼体栖息的水体很容易在底部积累粪便及食物残渣,盆底幼体的前端容易被这些残物粘住,造成幼体前端发育异常而死亡;幼体为了避免残物进入口或鳃裂,始终使身体前端处于收缩状态,这样不利于其摄食生长,导致幼体发育缓慢、畸形而致死。同样,变态后文昌鱼栖息沙层是否干净对文昌鱼的成活至关重要。我们首次关注文昌鱼实验室养殖时环境的清洁问题,并且根据不同发育时期采用不同的处理方法,成功地保证文昌鱼的正常生长发育。

3.2 文昌鱼实验室繁殖

以往认为文昌鱼很难在人为的饲养条件下产卵,同时也不能用人工方法授精^[3]。关于文昌鱼的人工繁殖,最早是1937年童第周等在实验室培养条件下,青岛的日本文昌鱼初次产卵成功,1952年他们还成功进行了人工授精,获得能正常发育的受精卵^[3];之后,文昌鱼的室内产卵报道日益增多^[4-16],这些研究中的亲本大多是从野外采回的具有成熟性腺的个体,在室内短时间饲养几天或几周之后产卵。室内的文昌鱼大多是自然产卵^[7-12],也有报道经过各种刺激处理促使其产卵^[5,6,13,15],目前我们饲养的文昌鱼也是自然产卵,尝试过人为诱导产卵,但未获成功。

目前文昌鱼在实验室内产卵的时间无法准确控制。在自然条件下,文昌鱼要到产卵当天,初级卵母细胞才发生第一次减数分裂,而次级卵母细胞停留时间很短,卵产出后还停留在第二次减数分裂中期,受精后才完成第二次减数分裂。因此,只有第一次减数分裂发生后的卵子才能达到最终的成熟,这时的卵子才可以产出并受精。目前还不清楚文昌鱼初级卵母细胞发生第一次减数分裂的诱因^[17],在诸多环

境因子中, 水温与文昌鱼性腺发育及繁殖季节的出现密切相关, 但是, 与佛罗里达文昌鱼 *B. floridae* 一样, 厦门 2 种文昌鱼的产卵日期与水温变化、月相变化、海水盐度波动、天气变化都没有密切关系^[22]。研究文昌鱼初级卵母细胞发生减数分裂的机制和条件是实实验室室内控制文昌鱼产卵的关键。

3.3 子二代文昌鱼的获得

迄今, 国内外不少实验室都繁殖过文昌鱼, 繁殖出来的子一代文昌鱼饲养时间大多短暂^[6, 16], 少数饲养时间较长, 但是也没有成功繁殖出子二代, 未能解决文昌鱼实验室的连续繁育的问题。这可能是因为文昌鱼尤其是其幼体和亚成体的饲养比较困难, 一方面文昌鱼的成活率极低^[18], 大多数个体在变态之前或变态后性腺发育之前就夭折; 另一方面可能是未能提供充足的饵料和清洁的栖息环境。我们实验室 2005 年 2 种文昌鱼繁殖获得实验室子一代, 经过细心饲养, 提供足够饵料、做好卫生清理, 使得子一代文昌鱼正常生长发育, 成功地在 2006 年繁殖出子二代^[18]。文昌鱼实验室子二代的获得在国内外尚属首次, 从而实现文昌鱼实验室的连续繁育, 真正实现文昌鱼的人工繁殖, 使得文昌鱼模式化进程有了新的起点, 也为文昌鱼人工增殖奠定了基础。

参考文献:

- [1] Holland L Z, Laudet V, Schubert M. The chordate amphioxus: An emerging model organism for developmental biology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61**(18): 2290—2308
- [2] Schubert M, Escrivá H, Xavier-Neto J *et al*. Amphioxus and tunicates as evolutionary model systems [J]. *Trends Ecol Evol*, 2006, **21**: 269—277
- [3] Tung T C, Wu S C, Tung Y Y F. The development of isolated blastomers of Amphioxus [J]. *Sci Sin*, 1958, **7**: 1280—1320
- [4] Jin D X. Observation on early embryonic development of the Amoy amphioxus *Branchiostoma belcheri* [J]. *Chin J Zool*, 1964, **4**: 169—172 [金德祥. 厦门文昌鱼早期胚胎发育的观察. 动物学杂志, 1964, **4**: 169—172]
- [5] Fang Y Q, Qi X, Hong G Y. Study of gonadotropin releasing hormone analogue induced spawning of amphioxus [J]. *J Oceanogr Taiwan Strait*, 1989, **8**(3): 278—280 [方永强, 齐襄, 洪桂英. 促性腺激素释放素类似物诱导文昌鱼产卵的初步研究. 台湾海峡, 1989, **8**(3): 278—280]
- [6] Du Q, Cheng Z D. Preliminary results on artificial culture of lancelets [J]. *Fujian Fisheries*, 1990 (3): 16—22 [杜琦, 程兆第. 文昌鱼人工育苗初探. 福建水产, 1990, (3): 16—22]
- [7] Wu X H, Zhang S C, Wang Y Y, *et al*. Laboratory observation on spawning fecundity and larval development of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunense*) [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 1994, **12**: 289—294
- [8] Wu X H, Zhang B L, Guo Z Y, *et al*. Artificial culture of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunense*) [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2000, **18**: 334—337
- [9] Zhang S C, Zhu J T, Li G R, *et al*. Reproduction of the laboratory-maintained lancelets *Branchiostoma belcheri tsingtaunense* [J]. *Ophelia*, 2001, **54**: 115—118
- [10] Fang Y Q, Weng Y Z, Dai Y Y, *et al*. Study on the artificial breeding larval development and metamorphosis of Xiamen amphioxus *Branchiostoma belcheri* [J]. *Acta Oceanol*, 2005, **27**(4): 102—107 [方永强, 翁幼竹, 戴燕玉, 等. 厦门文昌鱼人工繁殖和幼虫发育及其变态的研究. 海洋学报, 2005, **27**(4): 102—107]
- [11] Kubokawa K, Mizuta T, Morisawa M, *et al*. Gonadal state of wild amphioxus populations and spawning success in captive conditions during the breeding period in Japan [J]. *Zool Sci*, 2003, **20**: 889—895
- [12] Mizuta T, Kubokawa K. Non-synchronous spawning behavior in laboratory reared amphioxus *Branchiostoma belcheri* Gray [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, **309**: 239—251
- [13] Fuentes M, Schubert M, Dalfo D, *et al*. Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity [J]. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 2004, **302B**: 384—391
- [14] Yasui K, Umeta M, Yamaguchi N, *et al*. Laboratory culture of oriental lancelet *Branchiostoma belcheri* [J]. *Zool Sci*, 2007, **24**: 514—520
- [15] Holland N D, Holland L Z. Fine structural study of the cortical reaction and formation of the egg coats in a lancelet (= Amphioxus), *Branchiostoma floridae* (Phylum Chordata: Subphylum Cephalochordata = Acrania) [J]. *Biol Bull*, 1989, **176**: 111—122
- [16] Stokes M D, Holland N D. Embryos and larvae of a lancelet *Branchiostoma floridae* from hatching through metamorphosis growth in the laboratory and external morphology [J]. *Acta Zool (Stockholm)*, 1995, **76**: 105—120
- [17] Holland L Z, Yu J K. Cephalochordate (amphioxus) embryos: procurement culture and basic methods [J]. *Methods Cell Biol*, 2004, **74**: 195—215
- [18] Zhang Q J, Sun Y, Zhong J *et al*. Continuous culture of two lancelets and production of the second filial generations in the laboratory [J]. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 2007, **308B**: 464—472
- [19] Xu Q S, Ma F, Wang Y Q. Morphological and 12S rRNA gene comparison of two *Branchiostoma* species in Xiamen waters [J]. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 2005, **304B**: 259—267
- [20] Wang Y Q, Fang S H. Taxonomic and molecular phylogenetic studies of amphioxus: a review and prospective evaluation [J]. *Zool Res*, 2005, **26**: 666—672 [王义权, 方少华. 文昌鱼分类学研究及分子系统学展望. 动物学研究, 2005, **26**: 666—672]
- [21] Chin T G. Studies on the biology of the Amoy amphioxus *Branchiostoma belcheri* Gray [J]. *Philipp J Sci*, 1941, **75**: 369—424
- [22] Stokes M D, Holland N D. Reproduction of the Florida lancelet (*Branchiostoma floridae*): spawning patterns and fluctuations in gonad indexes and nutritional reserves [J]. *Invertebr Biol*, 1996, **115**: 349—359