

文昌鱼的实验室繁育及子二代获得

王义权^{1,*}, 张秋金^{1,2}, 吕小梅³, 钟婧¹, 孙毅¹(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007;
3. 福建海洋研究所, 福建 厦门 361012)

摘要: 文昌鱼特殊的进化地位、简单的器官系统和终生透明的躯体等特征, 使其很有希望成为一个新型实验室模式动物。要实现文昌鱼的模式动物化, 实验室内全人工条件下繁殖是关键的第一步。为此, 我们于 2003 年 9 月和 2004 年 4 月两次采集产于厦门海域的 2 种文昌鱼, 开展实验室内养殖研究。经过 3 年多的持续实验室养殖, 继 2005 年夏季于实验室内繁殖出子一代文昌鱼后, 又在 2006 年夏季成功获得了这两种文昌鱼的子二代, 初步实现文昌鱼在实验室内全人工养殖。对于子代文昌鱼养殖的初步观察发现, 不同水温对生长发育速度有一定影响, 提示有可能通过水温控制实现文昌鱼一年多次产卵的目的。目前这两种文昌鱼子二代幼体已完成变态, 进入亚成体生长发育阶段, 其体长分别已达 14.6 mm (日本文昌鱼 *Branchiostoma japonicum*) 和 6.5 mm (白氏文昌鱼 *B. belcheri*)。

关键词: 文昌鱼; 模式动物; 实验室养殖; 子二代

中图分类号: Q959.287 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2006) 06–0631–04

Laboratory Culturing and Acquirement of the Second Filial Generation of Amphioxus

WANG Yi-quan^{1,*}, ZHANG Qiu-jin^{1,2}, LÜ Xiao-mei³, ZHONG Jing¹, SUN Yi¹

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China;

3. Fujian Institute of Oceanology, Xiamen 361012, China)

Abstract: Amphioxus is expected to be a model laboratory animal in the near future because of its important position in evolution, simplified internal organ systems and transparent body. In order to develop the animal into a new laboratory model, we sampled two species of amphioxus (*Branchiostoma belcheri* and *B. japonicum*) from Xiamen in September 2003 and April 2004. The captive lancelets were cultured in the laboratory and fed daily with unicellular algae. After three years of laboratory culturing, we successfully obtained a second filial generation of both species, meaning that a full reproductive cycle was achieved in the laboratory. Preliminary observations on the growth of the progeny indicated that warmer water temperature will speed up the growth and development of amphioxus. This hints that amphioxus probably spawns more often in the laboratory, where water temperature is controlled, than in the wild. Most of the second generation lancelets have now metamorphosed into the early sub-adult stage, and their maximum full body lengths were up to 14.6 mm (*B. japonicum*) and 6.5 mm (*B. belcheri*), respectively.

Key words: Amphioxus; Model animal; Laboratory culture; Second filial generation

文昌鱼 (amphioxus or lancelet) 隶属脊索动物门 (Chordata) 头索动物亚门 (Cephalochordata), 是脊椎动物 (vertebrate) 的近亲, 全世界现存头索

动物仅 30 种 (Poss & Boschung, 1996; Wang & Fang, 2005)。它们躯体结构简单, 器官发生与脊椎动物的器官系统高度同源, 个体不大, 终生躯体

* 收稿日期: 2006–09–20; 接受日期: 2006–10–06

基金项目: 国家自然科学基金 (30470938 和 30570208); 福建省自然科学基金 (D0510002); 厦门市科技计划重点项目 (3502Z20042015) 资助

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

透明,便于观察和实验室大量养殖;此外,文昌鱼的基因组小,美国 JGI (Joint Genome Institute) 已于近日完成了佛罗理达文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 的全基因组测序,科学家们普遍认为文昌鱼不久将成为一种新的实验室模式动物而得到广泛应用 (Schubert et al, 2006; Garcia-Fernández, 2006; Holland et al, 2004)。然而,实现文昌鱼的模式动物化,首先要解决在完全实验室条件下人工繁殖的问题,这是一个长期以来一直困扰着科学家们的难题,虽然国内外有许多研究者曾做过实验室繁殖试验 (Du et al, 1990; Zhang et al, 2001; Fuentes et al, 2004; Mizuta et al, 2004; Holland et al, 2004; Fang et al, 2005), 但均不是真正意义上的成功,因为亲本还是从海区采集回来的那些性腺发育成熟或接近成熟的文昌鱼。Wu et al (1994, 2000) 曾报道过实验室成功繁殖文昌鱼子一代,并在户外容器中饲养达 2 年以上,其中有些个体发育成熟产出精、卵,但没有得到实验室条件下的子二代,子一代的养育也在户外。本实验室自 2003 年起,持续进行了数年的完全实验室养殖,现已成功地在实验室繁育了子二代文昌鱼,初步实现了实验室内的全人工养殖,为最终将文昌鱼培育成符合现代生命科学和医学研究需要的模式动物打下了基础。

1 材料与方法

研究用的亲本于 2003 年 9 月、2004 年 4 月、2005 年 7、8 月采自厦门海区,每次采回 500—600 尾文昌鱼,每一条都经过仔细的形态学鉴定,包括白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 和日本文昌鱼 (*B. japonicum*) 2 个物种 (Xu et al, 2005; Zhang et al, 2006)。野外采回的文昌鱼中,以成体为主,混有少数体长小于 15 mm 的亚成体。将不同种的成体和亚成体按采集年度分别养于容积为 50 L 的方形塑料桶中,垫以适量经淡水处理过、粗细适中的海砂,加入经过消毒处理的天然海水,连续充气,置于室内自然光照和正常室温下。每天喂以单细胞藻液 2 次,投饵过程中同时更新部分海水;投饵量视桶中个体数量而定,一般以投饵 2—3 h 后肉眼仍可见桶中海水略显混浊为度。观察记录水温、盐度和 pH 变化,尽量保持这些因素与其采集地基本一致。每隔 30 天左右清洗一次养殖桶内的砂,以保持清洁。定期从桶中随机取 20 余尾,置培养皿中测量体长 (最前端至最末端的距离),于体视镜下

检查性腺发育程度,并在每个月的最低潮位时,去海区采集少量野生文昌鱼进行对比观察,同时测量其野外环境的水温、盐度和 pH,以评估实验室养殖的文昌鱼生长状况,这种日常的实验室观察和定期的野外调查持续 2 年。

2 结果

经过 3 年的实验室养殖观察发现:这两种文昌鱼适宜的海水盐度在 24%—31‰, pH 为 8.0—8.5;水温随室温的年度变化而改变,夏季最高水温为 30℃,冬季最低水温为 10℃;除水温外,各项环境因素的变化均在文昌鱼野外栖息的环境因素变化范围之内。由于我们的养鱼房最初未装取暖设施,冬季水温最低时曾一度低于野外的海水温度 2—3℃,此时文昌鱼表现仍然正常。

在这样的养殖条件下,人工养殖的 2 种文昌鱼与厦门海区自然条件下的文昌鱼生长发育基本一致。实验室养殖的日本文昌鱼成体于 11 月下旬可以观察到雌、雄个体的性腺开始发育,至 2 月下旬两性个体的性腺均已发育相当饱满,但直到 5 月 2 日,才有第一次产卵活动,子一代成熟个体于 6 月 5 日开始产卵;而野外的日本文昌鱼在 4 月 26 日野外调查时发现已产过卵。实验室养殖的白氏文昌鱼成体于 2 月下旬才观察到有性腺发育,整个生长发育和首次出现产卵活动的时间滞后于前者约 2—3 个月,于 6 月 16 日开始产卵,子一代成熟个体于 7 月 28 日开始首次产卵。

实验室养的文昌鱼产卵时间一般在夜晚 8:00—12:00 之间。产卵量与个体大小有关:体长在 25—40 mm 的亲鱼,每次产卵大多 1 000—3 000 枚,高者可达万枚以上。繁殖时雄、雌亲鱼先后迅速游向水面,分别向水中排出精子和卵子;卵产出后很快受精,并可见受精膜举起,在 26℃ 左右的水温条件下,约 40 min 后开始胚胎发育的第一次卵裂。我们首批采回的亲鱼在实验室内过冬后,于 2004 年 5 月 3 日开始产卵,因经验不足,当年所产的卵,其孵化和幼鱼培育均告失败,未得到有效的后代。2005 年 7 月和 8 月,室内 2 种文昌鱼亲鱼均再次产卵,并孵化、育苗成功,得到生长发育良好的实验室子一代文昌鱼。在 2006 年的繁殖季节中,实验室内文昌鱼产卵时水温通常在 25—29℃,23℃ 以下时停止产卵,自初次产卵之日起,断断续续,一直到 9 月中旬,白氏文昌鱼已产

卵 29 个晚上,日本文昌鱼产卵 45 个晚上,其中有 10 个晚上 2 种同时产卵,为杂交实验提供了条件。

受精卵孵化和幼鱼生长发育与水温有关,在平均温度约 26℃ 条件下,文昌鱼受精到发育完成并出膜约 10—12 h;出膜后于 2006 年 6 月 5 日开始产卵,幼鱼开口、出现第 1 个鳃孔,并开始摄食;30—40 d 后完成变态,成为亚成体,钻入细砂中,此时体长 4—6 mm。此后随着时间推移而长大,外形无大的变化,养殖管理与成体无异,体长大于 20 mm,开始见有性腺发育。

2005 年我们实验室繁殖的日本文昌鱼子一代从孵化到性成熟初次产卵,历时 9 个月,发育 12—

16 h;7 月 14 日观察时,6 月 5 日产出的日本文昌鱼子二代已于 7 月 14 日见有少数完成变态,9 月 19 日测量,最大体长已达 14.6 mm。2005 年得到的白氏文昌鱼子一代于 2006 年 7 月 28 日开始产卵,历时近 12 个月性成熟;7 月 29 日产出的白氏文昌鱼子二代于 9 月 13 日见有少数个体完成变态,至 9 月 19 日最大体长达 6.5 mm。现在这两种文昌鱼的子二代都进入了稳定的亚成体生长发育阶段(图 1)。至此,我们已在实验室成功地繁殖出这两种文昌鱼的子二代,初步实现了这两种文昌鱼在实验室条件下全人工养殖。

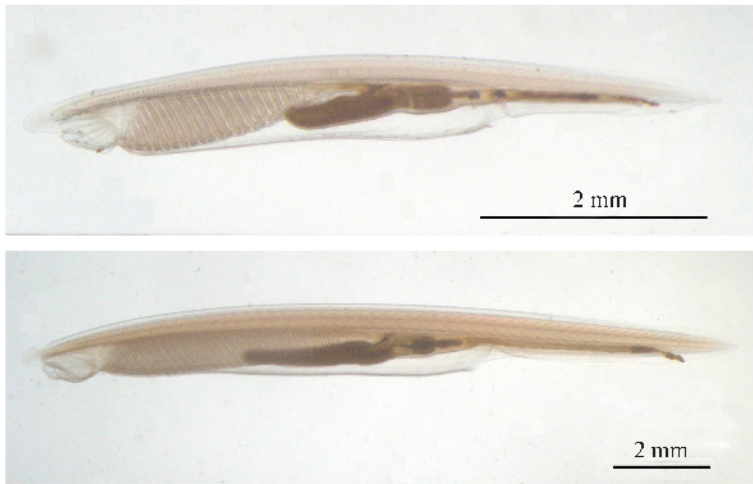


图 1 白氏文昌鱼(上)和日本文昌鱼(下)的子二代亚成体
Fig. 1 Sub-adults of *Branchiostoma belcheri* (above), *B. japonicum* (below) second filial generation

3 讨论

文昌鱼是一应用前景非常好的实验室模式动物,由于此前实验室全人工繁殖问题未能得到很好地解决,全人工繁殖问题成为实现文昌鱼模式化的最大障碍。本课题组利用位于海滨的地理优势,经过 3 年的连续养殖,成功地用实验室繁殖的 2 种文昌鱼的子一代,繁殖获得了实验室子二代文昌鱼,表明文昌鱼全人工条件下繁殖成功,积累了大量的第一手资料和丰富的养殖经验,为今后文昌鱼近交系培育和突变体筛选,调节控制实验室文昌鱼的产卵时间和发育周期,以及建立“干”实验室(内陆实验室)养殖技术等打下了坚实的基础。

关于厦门文昌鱼产卵时间,不同的研究者说法

不一,其原因可能是由于这些研究者混淆了本属 2 个不同物种的文昌鱼所致(Zhang et al, 2006)。从我们对野外文昌鱼的观察发现,野生的文昌鱼群体产卵时间非常集中,通常在 3—4 天内产完。日本文昌鱼通常在 4 月下旬和 8 月下旬各有一次产卵期(不同年份间略有差异);白氏文昌鱼往往仅在 7 月中旬有一次产卵期。在自然条件下,这两种文昌鱼在厦门的产卵时间不一致。

实验室内养殖的日本文昌鱼也在 4 月下旬和 8 月中下旬各出现一次产卵高峰期,白氏文昌鱼在 7 月中旬有一次产卵高峰期,与野外观察结果基本一致。但实验室养殖过程中虽然尽量控制各种因素与文昌鱼的野外栖息地的环境一致,仍有诸如海流、潮汐等因素无法模仿。野外文昌鱼在产卵季节中,

产卵日期非常集中,在数日内所有个体几乎全部产完;而在实验室,同一种文昌鱼养在不同桶内产卵的日期不尽完全同步,此外,同一养殖桶内的个体之间产卵日期也不十分集中。因此,实验室内2种文昌鱼虽有与野外文昌鱼几乎同步的产卵高峰,但前后持续的时间较长,2006年夏秋季分别有29个晚上(白氏文昌鱼)和45个晚上(日本文昌鱼)产卵。这从另一方面提示,文昌鱼的产卵时间并非绝对集中而不可改变,将来可以通过适当控制一些条件,来调节其产卵时间,至少可以在群体水平上实现一年当中有较多的产卵日期,这样更符合实验室模式动物的要求。

现存头索动物种类虽然不多,但在全世界各大洋都有分布,不同海域的种类不同,目前研究较多的有欧洲文昌鱼(*Branchiostoma lanceolatum*) (又称大西洋文昌鱼)、佛罗里达文昌鱼(*B. floridae*)、白氏文昌鱼(*B. belcheri*)和日本文昌鱼(*B. japonicum*) (原来称为青岛文昌鱼 *B. belcheri tsingtauense*) (Wang et al, 2005; Zhang et al, 2006)。后2种文昌鱼在我国沿海有分布,从现有资料看,白氏文昌鱼分布于厦门以南沿海,而日本文昌鱼分布于厦门以北沿海。我们实验室养殖这两

种文昌鱼时发现,在同样的实验室水温年变化周期下,白氏文昌鱼性成熟周期稍长一些,而日本文昌鱼性成熟周期较短,从这两种文昌鱼的地理分布看,前者主要分布区在南方,水温较高,后者生活于北方海域,水温较低。根据变温动物生长发育的“有效积温法则”的原理,对于一个特定的物种,其生长发育所需要的时间在一定范围内与温度呈负相关,即温度高生长发育快,温度低生长发育慢;对于两个近缘种来说,分布于北方的那个种发育所需的“有效积温”值,通常低于其分布在南方的近缘种。这里分布于北方的日本文昌鱼生长发育所需的有效积温,低于分布在南方的白氏文昌鱼。因此,在同样的温度下养殖,日本文昌鱼达到“有效积温”所需要的时间较白氏文昌鱼短,表现为发育的速度快一些,产卵次数多,而且持续时间长,提示今后可以通过适当提高水温,达到促进文昌鱼发育,实现每年多次产卵的目的。

致谢: 参与养殖管理的人员还有本实验室的李光、陈文、陈路和林鲁萍等研究生;福建海洋研究所方少华研究员提供帮助,一并表示感谢。

参考文献:

- Du Q, Cheng ZD. 1990. Preliminary results on artificial culture of amphioxus [J]. *Fujian Fisheries*, (1): 16–22. [杜琦,程兆第. 1990. 文昌鱼人工育苗初探. 福建水产, (1): 16–22.]
- Fang YQ, Weng YZ, Dai YY, Liu XM, Fang SH, Zhang YP. 2005. Study on the artificial breeding, larval development and metamorphosis of Xiamen amphioxus, *Branchiostoma belcheri* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 27 (4): 102–107. [方永强,翁幼竹,戴燕玉,吕小梅,方少华,张跃平. 2005. 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, 27 (4): 102–107.]
- Fuentes M, Schubert M, Dalfo D, Candiani S, Benito E, Gardenyes J, Godoy L, Moret F, Illas M, Patten I, Permanyer J, Oliveri D, Boeuf G, Falcon J, Pestarino M, Fernandez JG, Albalat R, Laudet V, Vernier P, Rscriva H. 2004. Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity [J]. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 302B: 384–391.
- Garcia-Fernández J. 2006. Amphioxus: A peaceful anchovy fillet to illuminate chordate evolution (II) [J]. *Int J Biol Sci*, 2 (3): 93–94.
- Holland LZ, Laudet V, Schubert M. 2004. The chordate amphioxus: An emerging model organism for developmental biology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 61 (18): 2290–2308.
- Holland LZ, Yu JK. 2004. Cephalochordate (amphioxus) embryos: Procurement, culture and basic methods [J]. *Methods in Cell Biology*, 74: 195–215.
- Mizuta T, Kubokawa K. 2004. Non-synchronous spawning behavior in laboratory reared amphioxus *Branchiostoma belcheri* Gray [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 309: 239–251.
- Poss SG, Boschung HT. 1996. Lancetes (Cephalochordata: Branchiostomatidae): How many species are valid [J]. *Isreal J Zool*, 42: S13–S66.
- Schubert M, Escriva H, Xavier-Neto J, Laudet V. 2006. Amphioxus and tunicates as evolutionary model systems [J]. *Trends Ecol Evol*, 21 (5): 269–277.
- Wang YQ, Fang SH. 2005. Taxonomic and molecular phylogenetic studies of amphioxus: A review and prospective evaluation [J]. *Zool Res*, 26 (6): 666–672. [王义权,方少华. 2005. 文昌鱼分类学研究及展望. 动物学研究, 26 (6): 666–672.]
- Wu XH, Zhang SC, Wang YY, Zhang BL, Qu YM, Jiang XJ. 1994. Laboratory observation of spawning, fecundity and larval development of amphioxus [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 12 (4): 289–294.
- Wu XH, Zhang BL, Guo ZY, Qu YM. 2000. Artificial culture of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 18 (4): 334–337.
- Xu QS, Ma F, Wang YQ. 2005. Morphological and 12S rRNA gene comparison of two *Branchiostoma* species in Xiamen waters [J]. *J Exp Zool Part B*, 204B: 259–247.
- Zhang QJ, Zhong J, Fang SH, Wang YQ. 2006. *Branchiostoma japonicum* and *B. belcheri* are distinct lancelets (Cephalochordata) in Xiamen waters in China [J]. *Zool Sci*, 23: 573–579.
- Zhang SC, Zhu JT, Li GR, Wang R. 2001. Reproduction of the laboratory-maintained lancelet *Branchiostoma belcheri tsingtauense* [J]. *Ophelia*, 54 (2): 115–118.