

# 文昌鱼实验室饲养与繁殖

## Breeding and reproduction of amphioxus in laboratory

张劲松<sup>1</sup>, 王昌留<sup>2</sup>, 张月圆<sup>2</sup>, 张晓燕<sup>2</sup>

(1. 鲁东大学 教育科学学院, 山东 烟台 264025; 2. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

中图分类号: Q959.287 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)01-0107-07  
doi: 10.11759/hyxx20130520001

文昌鱼(amphioxus 或 lancelet)属于脊索动物门(Chordata)、头索动物亚门(Subphylum Cephalochordata)、文昌鱼纲(Amphioxi)、文昌鱼目(Amphioxiforms)、文昌鱼科(Amphioxidae), 有 2 属或 3 属(有争议), 它们是鳃口文昌鱼属(*Branchiostoma*), 侧殖文昌鱼属(*Epigonichthys*), 偏文昌鱼属(*Asymmetron*)。早在 5.2 亿年前就已经出现, 是无脊椎动物进化到脊椎动物的过渡类型, 也是脊椎动物的祖先原型。因其具有个体小、产卵量大、体外受精和发育以及胚胎透明便于观察等作为实验动物的优点<sup>[1]</sup>, 特别是现在的文昌鱼基因组大约只是脊椎动物基因组的 17%<sup>[2-3]</sup>, 且脊椎动物(包括人)中绝大多数基因和基因家族均可在文昌鱼中找到高度同源的祖先型成员, 反映了脊椎动物祖先的基因组特征, 被认为是研究脊椎动物起源和进化的模式动物<sup>[4-5]</sup>。但是近年来由于环境污染、过度捕捞等原因, 使文昌鱼的生存环境受到严重破坏, 其数量在世界各分布区均呈下降趋势。为了保护文昌鱼这种珍稀资源, 中国先后在河北昌黎、山东青岛和福建厦门建立了国家和地方文昌鱼自然保护区, 以期遏制文昌鱼资源衰减的趋势<sup>[6]</sup>。有关文昌鱼繁殖生物学及人工养殖研究可追溯到 1937 年, 童第周等<sup>[7-8]</sup>率先在中国突破了文昌鱼室内繁殖技术, 并于 1952 年通过人工受精获得正常发育的卵子。后来, 国内外许多学者陆续开展了文昌鱼的实验室饲养与繁殖方面的研究工作: Zhang 等<sup>[9-10]</sup>将野外海区采集的文昌鱼饲养了 1a 以上并正常产卵与排精; Yasui 等<sup>[11]</sup>通过构建循环水培育系统完成了日本文昌鱼的室内饲养与繁殖, 并培育出子代文昌鱼; Wu 等<sup>[12-13]</sup>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 a 以上; 王义权等<sup>[14]</sup>获得了文昌鱼的子二代, 初步实现了文昌鱼在实验室内的全

人工养殖。作者就文昌鱼种类、分布与生活习性、饲养与繁殖等方面的研究成果进行综述, 为进一步加强文昌鱼人工繁育和养殖技术的探索, 特别是为文昌鱼资源的恢复和开发利用提供理论依据和技术参考。

### 1 种类、分布与生活习性

公元 819 年唐朝韩愈在潮州作刺史时, 因鳄鱼作恶, 杀鳄鱼时发现了文昌鱼, 由于这一发现没有鉴定、描述、定名、发表, 未被世界公认<sup>[15]</sup>。现认为首次对文昌鱼进行研究报道的是德国动物学家 Pallas 1774 年在英格兰南部发现了文昌鱼, 因其外形类似蛞蝓, 误认为是软体动物, 遂将这种文昌鱼定名为 *Limax lanceolatus*。1834 年意大利动物学家 Costa 改名为 *Branchiostoma lubricum*, 1836 年 Yarrel 将文昌鱼更名为 *Branchiostoma lanceolatum* 一直沿用至今<sup>[16-17]</sup>。据 Poss 等报道, 世界上现存的文昌鱼有 29 种<sup>[18]</sup>, 现认为大约 31 种<sup>[19-20]</sup>, 分布于南纬 40° 至北纬 48° 之间的广大海域, 包括大西洋、印度洋、太平洋沿岸的热带、亚热带、温带地区以及一些岛屿的周围海域<sup>[18,21-22]</sup>。迄今, 全世界已报道产文昌鱼的国家有: 英国、法国、德国、俄罗斯、意大利、尼日利亚、美国、以色列、墨西哥、日本、新西兰、澳大利亚、新加坡、斯里兰卡、印度和中国等<sup>[23-25]</sup>。

收稿日期: 2013-05-20; 修回日期: 2013-07-17

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2008AA092604); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2010CM030); 山东省教育厅科技计划资助项目(J08LE03)

作者简介: 张劲松(1964-), 女, 山东单县人, 高级实验师, 主要从事教学与实验室管理方面的研究, E-mail: zhangjinsongw@sina.com; 王昌留, 通信作者, 教授, Email: changliuwang@sina.com

在中国,文昌鱼的分布十分广泛,只要有适合文昌鱼栖息的沙滩,均有文昌鱼分布的可能,从南到北,包括海南、广西(合浦、北部湾)、广东(遂溪、汕头、南澳)、台湾(金门、马祖、南湾和基隆)、福建闽江口以南大部分海域、山东(青岛、威海、烟台、莱州湾)及河北秦皇岛等都发现了文昌鱼<sup>[19-20,26]</sup>。文昌鱼对生态环境的要求较高,既要有适合其生命活动的底质环境和生物饵料,又要有清洁的环境条件。大多数生活在水流较为平缓,水深为 8~16 m,水温 12~30℃,盐度 21~30, pH 值 8.09~8.18,具有中细沙混合的底质,水质清新,浮游生物丰富的海域中<sup>[22,27]</sup>。文昌鱼虽可游泳,但大部分时间身体埋于水底的砂砾或泥中,仅露出头部,但夜间较为活跃,凭借肌节的交错收缩,在海水中作短暂的停留。觅食时,将身体前部伸出砂砾表面以滤食流过鳃裂的硅藻等食物颗粒<sup>[28]</sup>。

## 2 饲养

据文献报道,目前有关文昌鱼饲养和繁殖研究较多的有白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)、青岛文昌鱼(*B. belcheri tsingtauense* 现有人称 *B. japonicum*, 有争议,作者沿用前者)、欧洲文昌鱼(*B. lanceolatum*)、佛罗里达文昌鱼(*B. floridae*)、马来文昌鱼(*B. malayanum*)<sup>[29]</sup>、尼日利亚文昌鱼(*B. nigeriense*)<sup>[30]</sup>、塞内加尔文昌鱼(*B. senegalense*)<sup>[31]</sup>、鲁卡偏文昌鱼(*Asymmetron lucayanum*)<sup>[32-33]</sup>也有少量报道。

### 2.1 养殖条件

Chin<sup>[34]</sup>最早阐述了如何在实验室饲养文昌鱼,他用方形的标本缸(15 cm×15 cm×25 cm)缸底铺设沙层 7 cm 左右,每缸饲养健康个体 5~10 尾,海水 pH 控制在 8.4 左右、温度 12~30℃、盐度 19~29,以浮游硅藻作为饵料,在实验室养活文昌鱼达 8 个月之久。文昌鱼的饲养必须考虑容器、沙粒、盐度、饵料、pH 值、光照、温度、溶氧量及饲养密度等诸多问题。容器的质地、大小和形状对文昌鱼的饲养影响不大,玻璃缸<sup>[34-35]</sup>、水泥池<sup>[36]</sup>、泥缸<sup>[37]</sup>、塑料缸(箱)<sup>[9,38]</sup>均可。文昌鱼对沙粒直径的要求较高,一般在 0.5~1 mm,沙粒太小会阻碍其呼吸<sup>[27]</sup>,但对沙层厚度要求不高,只要埋没身体即可,一般 5~15 cm。沙粒最好选自文昌鱼生活的海区,用前先经金属网筛(1 mm 网格)筛过,再用淡水浸泡 2 d,最后用新鲜海水彻底浸洗 2 次,晒干备用。也有用河沙经粗筛,选粒径与海沙相仿部分,用漂白粉消毒并洗净后晒干,

使用前以人工海水浸泡 2 d 的成功报道<sup>[39]</sup>。近来 Fuentes 等<sup>[40]</sup>用方形塑料桶无沙饲养欧洲文昌鱼(*Branchiostoma lanceolatum*)使其成功产卵, Yasui 等<sup>[11]</sup>借鉴斑马鱼室内循环水培育系统无沙饲养产于日本的白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*),并成功繁育出子代。文昌鱼对海水盐度的忍受力较强,在 25~33 范围内都可以正常生活,沙层上面海水深度 20 cm 左右,产卵季节为便于捕获游离于水面的文昌鱼可适当增加海水的深度。内陆实验室人工海水(盐度 29~31)饲养的文昌鱼其成活率、平均体质量及平均性腺直径均与天然海水的无显著差异<sup>[39]</sup>。文昌鱼主要以单胞藻为食,常用饵料综合起来有金藻门的球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)、湛江叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*)、绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)、硅藻门的牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)、钙质角毛藻(*Chaetoceros calcitrans*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)、纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)、*Chaetoceros calcitorance*, 绿藻门的青岛大扁藻(*Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis*)、小球藻(*Chlorella*)、扁藻(*Tetraselmis*)、盐藻(*Dunaliella salina*)、杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)、四鞭片藻(*Tetraselmis suecica*)、黄藻门的异胶藻(*Heterogroea*)、后棘藻(*Ellipsoidion*)及蓝藻门的螺旋藻(*Spirulina*)等。

### 2.2 亲鱼的饲养与管理

文昌鱼饲养密度取决于其个体大小及沙层表面积,一般每平米饲养成体 2000~3000 尾<sup>[22]</sup>,连续充气,自然光照和室温饲养(水温控制于 15~28℃),每天早晚投喂单细胞藻各 1 次,投饵前更换约 2/3 海水,新鲜海水需经事先过滤,投饵量视文昌鱼个体数量而定,单胞藻种类可以是单一种类或几种不同藻类的混合液,一般投喂后 3 h 左右海水略显浑浊为宜。饲养期间要及时去除附着于养殖缸(箱)壁的藻类、沙层表面的文昌鱼粪便及受刺激不能钻沙的不健康文昌鱼,每隔 30~40 d 定期全部更换沙层,以保持沙层整体的清洁。

## 3 繁殖

文昌鱼绝大多数为雌雄异体,目前发现雌雄同体报道的只有欧洲文昌鱼<sup>[41-42]</sup>、白氏文昌鱼<sup>[34,43]</sup>的极少数个体,但未见无性生殖的文献。大多数文昌鱼一生可以多次繁殖,仅尼日利亚拉各斯礁湖的繁殖过后就死亡<sup>[30]</sup>。

### 3.1 亲鱼的排精与产卵

研究天然文昌鱼的繁殖季节难度很大,一般是根据不同时期采集的大量标本依靠性腺发育、幼体的数量及发育状态等进行估算。一般认为不同种或同种不同地理种群的文昌鱼繁殖季节有差异,北半球的文昌鱼在5~6月产卵,南半球的在11~12月产卵,而热带地区的文昌鱼一年有2次或多次产卵<sup>[44]</sup>。研究室内文昌鱼的繁殖时间比较容易,童第周等1937年在实验室就成功获得青岛文昌鱼所产卵子,20世纪50年代彻底解决了其室内繁殖技术<sup>[7]</sup>,金德祥1964年以白氏文昌鱼为材料也在实验室内得到所产卵子<sup>[45]</sup>。至此有关文昌鱼繁殖生物学的报道开始增多,Wu等<sup>[12]</sup>和张士瑾等<sup>[10]</sup>观察到青岛文昌鱼先是雄性个体游出水面排精,而后雌性个体排卵,整个繁殖季节可从6月下旬持续到8月初,中间有几天休产期。Kubokawa等<sup>[46]</sup>用红外摄像观察了繁殖季节产于日本的白氏文昌鱼夜间的游泳行为,发现文昌鱼每次产卵都首先是雄性从沙层跃出,然后在近水面处排精,接下来雌雄产卵、排精没有固定的顺序,排精、产卵大多集中在第一尾雄性文昌鱼排精开始后的90 min内。方永强等<sup>[47]</sup>详细观察白氏雌、雄文昌鱼的产卵和排精行为:首先是个别雄鱼先跃出水面沿着缸旁急速游动后钻入沙中,后有雌鱼出现,雌雄文昌鱼从水缸底层的不同部位跃出,同时见多尾雌雄鱼互相追逐、转圈、波浪式快速游泳,从18:45开始产卵和排精到结束可持续4 h多。Stokes等<sup>[48]</sup>观察了从1991年初夏到1995年夏末在外海采集到的21 000余尾佛罗里达文昌鱼的生殖习性,在繁殖季节(春末至夏末),文昌鱼群体在日落后产卵,在某一既定日期产卵文昌鱼的比例占成年群体的一小部分至绝大部分(约90%),雄性个体和雌性可在繁殖季节中短短的1~2周再次成熟和排放精卵。Fuentes等<sup>[40]</sup>也证实分布于法国和西班牙边界的欧洲文昌鱼在5月底自然产卵,6月底还可以再次产卵。最近,Theodosiou等<sup>[49]</sup>用人工海水饲养欧洲文昌鱼使其顺利产卵并进行了精子冷冻保存的研究,Holland等<sup>[32-33]</sup>以鲁卡偏文昌鱼(*Asymmetron lucayanum*)为材料在27℃通过室内光照和黑暗处理可改变其传统的产卵季节。这些成果预示一旦人们全面掌握文昌鱼的饲养技术,人为控制文昌鱼的产卵季节,实现文昌鱼的一年多次产卵及建立“干”实验室(内陆实验室)养殖技术等是完全可行的<sup>[14]</sup>。

### 3.2 影响文昌鱼繁殖的环境因素

文昌鱼生活在浅水海滩,其繁殖具有明显的季节性,温度、光照、海水盐度、pH值、潮汐变化等

对其生殖细胞的发生都会产生影响<sup>[50]</sup>。室内文昌鱼人工饲养与繁殖成功的前提条件主要取决于2个因素:一是充足的饵料,以保证文昌鱼能正常生长发育,使性腺发育成熟;二是保持室内文昌鱼栖息环境的清洁,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<sup>[51]</sup>。迄今,许多学者进行了有关文昌鱼室内繁殖生物学的研究,对其影响因素已得到较为满意的结果。

#### 3.2.1 温度

温度是影响文昌鱼繁殖的主要环境因素,性腺的发育、成熟及产卵、排精的发生都与水温密切相关<sup>[52-53]</sup>。在天然海区,冬季水温较低(15℃),方永强等<sup>[54]</sup>发现该水温有利于白氏文昌鱼早期精巢的发育,而对卵巢则无明显的影响;水温在23~25℃可能是其性腺发育和成熟的较适温度,高于28℃对性腺发育不利。王嫣等<sup>[39]</sup>也发现无论是天然海水还是人工海水冬季水温偏高(20℃)雌性青岛文昌鱼性腺发育明显好于雄性。当然,不同纬度海区文昌鱼产卵繁殖的水温不尽相同:青岛文昌鱼繁殖时水温21~25℃,低于21℃则不产卵<sup>[12]</sup>;佛罗里达文昌鱼繁殖时水温在27℃以上,最适宜温度在30~32℃<sup>[50]</sup>;欧洲文昌鱼繁殖时水温为19~25℃<sup>[40]</sup>,如果其性腺充分发育并具备了合适的繁殖生理条件,适当提高水温会激发其产卵<sup>[55]</sup>。日本Seto Inland Sea西部海域的白氏文昌鱼在21~23℃的水温时才会产卵<sup>[56]</sup>,而厦门海区的白氏文昌鱼产卵时水温通常在25~29℃,23℃以下时停止产卵<sup>[14]</sup>。翁幼竹等<sup>[57]</sup>进一步研究了在不同水温条件下饲养性腺发生前的白氏文昌鱼,发现水温对其性腺分化、发育及产卵与排精影响显著,低温(16℃)有利于文昌鱼性腺向雌性分化,雌雄比例为4.2:1,中温(22℃)和高温(28℃)则不受影响,雌雄数量大致相等,高水温则有利于文昌鱼的精巢发育和生精活动,28℃海水适于文昌鱼的产卵和排精。

#### 3.2.2 光照

光照周期的长短对文昌鱼生殖细胞的发生和性腺生长及排精与产卵影响较为明显<sup>[28]</sup>。方永强等<sup>[58]</sup>详细研究了白氏文昌鱼的生殖细胞发生和早期性腺生长与光照周期的关系,发现长光照(16 L)有利于文昌鱼性腺发生并加速其生长,而短光照则效果不明显。在繁殖季节,所有文昌鱼的产卵都发生在夜间,即便是生殖细胞已经全部成熟的文昌鱼,夜间在光照条件下也不会发生排精和产卵<sup>[46,50]</sup>,日落后延迟人工光照2 h可以推

迟产卵发生,但日落前 2h 开始暗处理却并不能使文昌鱼产卵提前<sup>[59]</sup>。光照周期对文昌鱼排精和产卵影响的结果不尽一致,长光照(16L: 8D)不适于白氏文昌鱼排精和产卵,而 12 h 或 8 h 光照时间则有利于其排精和产卵<sup>[60]</sup>,但是佛罗里达文昌鱼产卵则需要长光照条件<sup>[50]</sup>。另外, Holland<sup>[33]</sup>发现光照周期对文昌鱼产卵的影响还与季节有关,在春季和秋季,暗刺激可促进鲁卡偏文昌鱼产卵,但冬季和夏季并无效果。

### 3.2.3 盐度与 pH 值

文昌鱼对海水盐度的忍受力比较强,在 25~33 范围内都可以正常繁殖<sup>[20]</sup>,但不同海水盐度和 pH 值对文昌鱼精子的运动方式、寿命有一定影响,方永强等<sup>[61]</sup>以白氏文昌鱼为材料证实精子对低盐度的忍受力较强,28 为其精子运动的最适盐度,低于 12 或高于 42 精子就很快死亡;他们发现精子对海水 pH 值变化较敏感,偏酸性海水会迅速引起精子死亡,偏碱性海水则有激活精子活动的作用,精子活动最适 pH 范围为 8.5~9.0,稍高于天然海水,在此范围内精子寿命最长,也更有利于受精。

### 3.3 人工催产与授精

至今人们仍不知道文昌鱼繁殖前有什么预兆,无法预测其确切的产卵日期<sup>[35]</sup>,只知道文昌鱼产卵都发生在日落以后,但每天的产卵时间并不固定。在实验室条件下,随着促使文昌鱼产卵的研究报道逐渐增多,人们对文昌鱼产卵的诱因也有了初步的了解。在其繁殖季节通过各种不同刺激可诱使文昌鱼排精和产卵,针对白氏文昌鱼,成功的报道有:金德祥<sup>[45]</sup>用极稀的 KOH 处理可使精子激活;张建等<sup>[62]</sup>用 LRH 类似物、方永强等<sup>[63]</sup>用促性腺激素释放素类似物 GnRH—A 注射成熟文昌鱼催产均获得成功,雌体按预定效应时间排卵,雄体排精,受精卵发育良好,可形成大量文昌鱼胚胎及幼体;杜琦等<sup>[36]</sup>用充气催产法、流水催产法、激素催产法也得到了满意的结果。随后,有关其他文昌鱼的人工催产也开始了陆续报道,如 Stokes 等<sup>[48,64]</sup>和 Holland 等<sup>[50]</sup>用电刺激的方法使佛罗里达文昌鱼产卵获得成功, Fuentes 等<sup>[40,55]</sup>通过温度刺激,使产过卵的欧洲文昌鱼性腺再次发育成熟并再次产卵。然而, Yasui 等<sup>[11]</sup>通过温度变化刺激、热刺激、酸碱度变化刺激、渗透压变化刺激及电刺激等方法促使产自日本的白氏文昌鱼产卵的实验未获成功,说明文昌鱼的种类和产地的不同其相应的催产条件也会不同。

有关文昌鱼通过人工授精获得受精卵的报道不多,最早进行文昌鱼人工授精工作的是童第周等<sup>[7-8]</sup>,他们 1952 年通过解剖性腺发育成熟的青岛文昌鱼成功获得了正常发育人工授精的卵子。后来,金德祥用玻璃针或缝花针挑破白氏文昌鱼的卵巢,让卵子分散在海水中然后放入精子,只需要 3~5 s,就可完成受精<sup>[45]</sup>; Holland 等<sup>[50,65]</sup>以佛罗里达文昌鱼为材料用直流电脉冲刺激 2 s 可诱发部分文昌鱼产卵,且其受精能力可保持大约 2 h。

### 3.4 卵的收集与孵化

不同种类和产地的文昌鱼的繁殖日期差别很大,在文昌鱼的产卵季节每天傍晚检查其产卵情况。一般情况下雄性文昌鱼先从沙中游出,并在水面上快速游动并完成排精,然后雌文昌鱼游出排卵。将雌性文昌鱼迅速捞出,使其排卵于平皿中,用含有文昌鱼精子的海水使其受精,以无菌海水洗涤受精卵后,让其在室温下自然发育<sup>[17]</sup>。在文昌鱼产卵当晚结束时,可用 150~200 目尼龙筛绢过滤养殖缸(箱)的海水,收集其受精卵或胚胎。所收集的受精卵或胚胎经无菌海水洗涤数次,然后将受精卵或胚胎放入新鲜海水中进行孵化,密度控制在 5~10 个/mL<sup>[12]</sup>。受精卵孵化和幼虫发育与水温有关,青岛文昌鱼的胚胎在 18 °C 以上才能正常发育,并随着温度的升高而加快,但超过 34 °C 胚胎解体,低于 14 °C 发育受阻<sup>[66]</sup>。正常温度下,从受精到胚胎出膜变为浮游幼虫约 10~12 h, 2~3 d 后幼虫开口成为幼体,出现第一个鳃孔,头部吻端清晰可见,胃肠已发育,并开始摄食<sup>[14,47]</sup>。

## 4 幼体饲养与管理

幼体从浮游生活到钻沙变为营底栖生活,是文昌鱼生活史中最重要的转折,文昌鱼人工育苗的死亡高峰期即出现于此<sup>[38]</sup>,开口后有约 40% 的幼体在第 3 个初级鳃裂出现之前就夭折<sup>[20]</sup>。幼体饲养成功与否的关键是除了水质条件外,能否提供质优、适口的饵料及适宜的饲养密度十分重要。吴贤汉等<sup>[37]</sup>报道文昌鱼幼体以 1~2 个/mL 的密度放在含细沙(透过 40 目筛绢)或不含沙的容器中培养,每日投喂单胞藻,藻液最终浓度为 10<sup>4</sup> 个细胞/mL,每次投喂前需更换 1/2 过滤的海水。至于饵料的选择,不同研究者差异较大,可能与文昌鱼种类与产地的生活习性相关。对于青岛文昌鱼,吴贤汉等<sup>[37]</sup>发现投喂蓝藻、小球藻,其幼虫无一变态,在实验开始的一周内

全部死亡,而喂养等鞭金藻两个月后仍存活 7%并已完成变态。Stokes 等<sup>[64]</sup>将佛罗里达文昌鱼幼体放在直径 14 cm 的培养皿,每天用后棘藻和等鞭金藻的混合液(最终浓度  $5 \times 10^6$  个细胞/mL)喂养,效果良好。Yasui 等<sup>[11]</sup>在产于日本的白氏文昌鱼幼体开口时用纤细角毛藻和盐藻的混合液喂养,大约 100 d 后改用单独的纤细角毛藻或 *Chaetoceros calciteorance* 喂养在 3 L 的塑料容器,发现放置 5 cm 厚的细沙较 33 L 玻璃容器不放细沙的成活率高。周仁杰等<sup>[38]</sup>根据厦门的白氏文昌鱼幼体不同发育阶段以不同藻类作为饵料进行喂养取得了可喜的效果,其 53 d 的育苗成活率达 20.7%,且存活幼体几乎可全部潜沙生活,并实施了国内外首次的文昌鱼资源人工增殖放流。他们的做法是:选用湛江叉鞭金藻作为文昌鱼浮游幼体的开口饵料,幼体发育至出现 6 个鳃裂之前,其饵料一直以湛江叉鞭金藻为主,每次投喂量约为 3.5 万个/mL,辅之以少量小球藻;6~12 个鳃裂阶段以湛江叉鞭金藻和牟氏角毛藻为主,每次投喂量约为 4.0 万个/mL,辅之以少量小球藻;出现 12 个鳃裂以后以青岛大扁藻为主,每次投喂量约为 0.3 万个/mL,辅之以少量小球藻以及湛江叉鞭金藻或牟氏角毛藻。

幼体发育到 8 鳃裂以上,可以开始加细沙以便于幼体变态后能及时潜入沙中,为了便于清理,起始阶段细沙层不宜厚,应控制在 1 cm 以下<sup>[20]</sup>。饲养幼体的容器每过一段时间就会沉积食物残渣、幼体排出的粪便及死亡的幼体,必须及时清理。幼体营浮游生活时,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容器,下层部分可用 300 目筛绢过滤,将浓缩物转移至培养皿,解剖镜下用吸管将脏东西吸去,留下幼体。幼体营潜沙生活时,分批把少量的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器皿,不断重复直到细沙里文昌鱼全部筛出为止<sup>[22]</sup>。随着文昌鱼的生长发育,个体逐渐增大,应增厚沙层,并适当添加饲养成体用的细沙(直径 0.5~1 mm)。其他管理类同亲体,保持通气,每天投喂饵料一次,投饵前更新部分海水。

## 5 展望

子二代文昌鱼的成功获得,实现了文昌鱼实验室连续繁育<sup>[14,20]</sup>,为文昌鱼人工增殖奠定了基础。从目前的实验结果来看,只要饵料、温度和水质状况得到改善和加以适当的控制,以人工海水、河沙在内陆

开展实验室饲养文昌鱼并使其产卵和排精也是完全可能的。通过深入研究各种文昌鱼的生长发育规律及其各种生态因子的影响,进一步发展和完善文昌鱼人工饲养与繁殖技术,人为控制和改变文昌鱼的生长发育周期,完全可以实现文昌鱼每年多次产卵的目的,达到文昌鱼的全人工繁育目标,以彻底摆脱对野生文昌鱼亲体资源的依赖,并通过实施文昌鱼的人工增殖放流,为文昌鱼资源恢复和开发利用提供保障。

### 参考文献:

- [1] 范宁宁,李萍,张士瑾.文昌鱼在中国的人工繁育[J].鲁东大学学报(自然科学版),2008,24(2):168-171.
- [2] Gibson-Brown J J, Osoegawa K, Mcpherson J, et al. A proposal to sequence the amphioxus genome submitted to the Joint Genome Institute of the US department of energy [J]. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2003, 300B(1): 5-22.
- [3] Holland P W. More genes in vertebrates? [J]. Journal of Structural and Functional Genomics, 2003, 3(1-4): 75-84.
- [4] Holland P W, Garcia-Fernandez J. Hox genes and chordate evolution [J]. Developmental Biology, 1996, 173(2): 382-95.
- [5] 张士瑾,袁金铎,李红岩.文昌鱼——研究脊椎动物起源和进化的模式动物[J].生命科学,2001,13(5): 214-218.
- [6] 黄瑛,王晓梅,张彬,等.我国文昌鱼资源现状及其保护[C].张显良,刘晴.渔业现代化与可持续发展.北京:海洋出版社,2009:405-410.
- [7] 童第周,吴尚勤,叶毓芬.文昌鱼卵子分裂球的发育能力的研究[J].实验生物学报,1958,6(1): 57-87.
- [8] Tung T C, Wu S C, Tung Y Y F. The development of isolated blastomeres of Amphioxus [J]. Scientia Sinica, 1958, 7(12): 1280-1320.
- [9] Zhang S C, Zhu J T, Jia C H, et al. Production of fertile eggs and sperms in laboratory-reared amphioxus *Branchiostoma beleheri tsingtauense*[J]. Chin J Oceanol Limnol, 1999, 17(1): 53-56.
- [10] 张士瑾,朱锦天,贾翠红,等.成体文昌鱼实验室培养产卵、排精及其受精卵早期发育的观察[C].中国科学院海洋研究所.海洋科学集刊(42).北京:科学

- 出版社, 2000: 74-76.
- [11] Yasui K, Urata M, Yamaguchi N, et al. Laboratory culture of the oriental lancelet *Branchiostoma belcheri* [J]. Zoological Science, 2007, 24(5): 514-520.
- [12] Wu X H, Zhang S C, Wang Y Y, et al. Laboratory observation of spawning, fecundity and larval development of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) [J]. Chin J Oceanol Limnol, 1994, 12 (4): 289-294.
- [13] Wu X H, Zhang B L, Guo Z Y, et al. Artificial culture of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) [J]. Chin J Oceanol Limnol, 2000, 18 (4) : 334-337.
- [14] 王义权, 张秋金, 吕小梅, 等. 文昌鱼的实验室繁育及子二代获得[J]. 动物学研究, 2006, 27 (6): 631-634.
- [15] 刘惠生. 厦门的文昌鱼与文昌鱼名辨析[J]. 福建水产, 1996, 2: 77-79.
- [16] Gans C. Study of lancelets: The first 200 years[J]. Israel Journal of Zoology, 1996, 42(S1): 3-11.
- [17] 王昌留. 青岛文昌鱼染色体的核型及带型研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [18] Poss S G, Boschung H T. Lancelets (Cephalochordata: Branchiostomatidae): How many species are valid? [J]. Israel Journal of Zoology, 1996, 42(S1): 13-66.
- [19] 李亚娟. 我国的文昌鱼与其渔业[J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(1): 48-51.
- [20] Nishikawa T. A new deep-water lancelet (Cephalochordata) from off Cape Nomamisaki, SW Japan, with a proposal of the revised system recovering the genus *Asymmetron*[J]. Zoological Science, 2004, 21(11): 1131-1136.
- [21] 王义权, 方少华. 文昌鱼分类学研究及分子系统学展望[J]. 动物学研究, 2005, 26(6):666-672.
- [22] 张秋金. 厦门海域文昌鱼属 *Branchiostoma* 的分类及 2 种文昌鱼的实验室连续繁育[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [23] 王所安. 脊椎动物学[M]. 北京:人民教育出版社, 1960.
- [24] 张孟闻, 黄正一. 脊椎动物学(上) [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1987.
- [25] 杨建威. 青岛文昌鱼自然保护区生物资源与文昌鱼资源调查研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [26] 林秀瑾. 台湾及金门、马祖沿海之文昌鱼系统分类及生态研究[D]. 台北: 台湾大学, 2001.
- [27] 金德祥. 文昌鱼[M]. 福建:福建人民出版社, 1957.
- [28] 马德友. 室内培育的青岛文昌鱼性腺年周期发育和雌核发育牙鲆生长性腺发育研究[D]. 青岛:中国科学院海洋研究所, 2010.
- [29] Chen Y, Shin K S, Cheung S G. Growth, secondary production and gonad development of two co-existing amphioxus species (*Branchiostoma belcheri* and *B. malayanum*) in subtropical Hong Kong[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2008, 357: 64-74.
- [30] Webb J E. The ecology of Lagos lagoon III. The life history of *Branchiostoma nigeriense* Webb[J]. Philos Trans Royal Soc Lond B, 1958, 241: 335-353.
- [31] Gosselck F, Spittler P. Age structure, growth, and weight of *Branchiostoma senegalense* (Acrania, Branchiostomidae). off North-West Africa[J]. Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 1979, 64(4): 541-550.
- [32] Holland N D, Holland L Z. Laboratory spawning and development of the Bahama lancelet, *Asymmetron lucayanum*(Cephalochordata): Fertilization through feeding larvae[J]. The Biological Bulletin, 2010, 219(2): 132-141.
- [33] Holland N D. Spawning periodicity of the lancelet, *Asymmetron lucayanum* (Cephalochordata), in Bimini, Bahamas[J]. Italian Journal of Zoology, 2011, 78(4): 478-486.
- [34] Chin T G. Studies on the biology of the Amoy amphioxus *Branchiostoma belcheri* (Gray)[J]. Philipp J Sci, 1941, 75: 369-424.
- [35] Mizuta T, Kubokawa K. Non-synchronous spawning behavior in laboratory reared amphioxus *Branchiostoma belcheri* Gray[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 309(2): 239-251.
- [36] 杜琦, 程兆第. 文昌鱼人工育苗初探[J]. 福建水产, 1990, 3: 16-22.
- [37] 吴贤汉, 张士瑾, 王峰, 等. 青岛文昌鱼的实验室培育—饵料和沙对幼虫成活的影响[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(S5): 134-136.
- [38] 周仁杰, 方琦. 厦门文昌鱼人工繁育批量生产技术研究[J]. 台湾海峡, 2007, 28(1): 121-128.
- [39] 王嫣, 赵平孙, 王珺. 以人工海水和天然海水饲养的文昌鱼生长发育的比较[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2002, 20(1): 62-66.
- [40] Fuentes M, Schubert M, Dalfo D, et al. Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity[J].

- Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2004, 32B(4): 384-391.
- [41] Orton J H. On a hermaphrodite specimen of amphioxus with notes on experiments in rearing amphioxus[J]. J Mar Biol Assoc UK, 1914, 10: 506-512.
- [42] Riddell W. On a hermaphrodite specimen of amphioxus [J]. Ann Mag Nat Hist, 1922, 9(53): 613-617.
- [43] 方永强, 齐襄. 厦门文昌鱼雌雄同体的观察[J]. 台湾海峡, 1991, 10(3): 291-292.
- [44] Wickstead J H. Chordata: Acrania (Cephalochordata)[C]. Giese A C, Pearse J S. Reproduction of Marine Invertebrates. New York: Academic Press, 1975: 283-319.
- [45] 金德祥. 厦门文昌鱼早期胚胎发育的观察[J]. 动物学杂志, 1964, 4: 169-172.
- [46] 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]. Zoological Science, 2003, 20(7): 889-895.
- [47] 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[J]. 海洋学报, 2005, 27(4): 102-107.
- [48] Stokes M D, Holland N D. Reproduction of the Florida lancelet (*Branchiostoma floridae*): spawning patterns and fluctuations in gonad indexes and nutritional reserves[J]. Invertebrate Biology, 1996, 115(4): 349-359.
- [49] Theodosiou M, Colin A, Schulz J, et al. Amphioxus spawning behavior in an artificial seawater facility[J]. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2011, 316B(4): 263-275.
- [50] Holland L Z, Yu J K. Cephalochordate (amphioxus) embryos: procurement, culture, and basic methods[J]. Methods in Cell Biology, 2004, 74: 195-215.
- [51] 张秋金, 陈路, 吕小梅, 等. 厦门 2 种文昌鱼的实验室饲养与繁殖[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 348-351.
- [52] 宋裕昌, 许梅青. 青岛文昌鱼的繁殖生物学——I. 卵巢和卵母细胞的发育的观察[J]. 海洋科学, 1989, 13(4): 50-54.
- [53] 林加涵, 方永强, 刘建, 等. 不同水温对文昌鱼性腺发育的影响[J]. 台湾海峡, 1996, 15(2): 170-173.
- [54] 方永强, 齐襄, 梁苹, 等. 厦门文昌鱼性腺发育的周年变化[J]. 海洋学报, 1990, 12(5): 631-637.
- [55] Fuentes M, Benito E, Bertrand S, et al. Insights into spawning behavior and development of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*)[J]. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2007, 308(4): 484-493.
- [56] Ueda H, Kamakura H. Synchronous recruitment and growth pattern of planktonic larvae of the amphioxus *Branchiostoma belcheri* in the Seto Inland Sea, Japan[J]. Marine Biology, 2006, 148(6): 1263-1271.
- [57] 翁幼竹, 刘志刚, 方永强, 等. 水温对文昌鱼生殖活动的影响及其内分泌机制[J]. 海洋学报, 2012, 34(4): 163-171.
- [58] 方永强, 梁萍, 洪桂英. 光照周期对文昌鱼生殖细胞发生和性腺生长的影响[J]. 动物学报, 1989, 35(4): 438-439.
- [59] Watanabe T, Yoshida M, Shirai H. Effect of light on the time of spawning in the amphioxus, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*[J]. Contrib the Ushimado Marine Lab Okayama Univ, 2000, 37: 1-7.
- [60] 方永强, 齐襄, 洪桂英. 光照周期对文昌鱼性腺成熟和产卵的影响[J]. 海洋学报, 1992, 14(3): 128-132.
- [61] 方永强, 齐襄, 洪桂英. 不同海水盐度和 pH 对文昌鱼精子寿命的影响[J]. 台湾海峡, 1990, 9(1): 73-78.
- [62] 张建, 林丹军, 骆嘉. 文昌鱼人工催产简报[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 1985, 3: 104.
- [63] 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[J]. 台湾海峡, 1989, 8(3): 278-280.
- [64] 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 Zoologica, 1995, 76(2): 105-120.
- [65] 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]. The Biological Bulletin, 1989, 176(2): 111-122.
- [66] 吴贤汉, 张宝禄, 曲艳梅. 温度和盐度对青岛文昌鱼胚胎发育的影响[J]. 海洋科学, 1998, 22(4): 66-68.

(本文编辑: 谭雪静)