

# 室内培育条件下青岛文昌鱼性腺的年周期发育

马得友<sup>1,2</sup>, 尤 锋<sup>1</sup>, 文爱韵<sup>1,2</sup>, 谭训刚<sup>1</sup>, 倪 静<sup>1</sup>, 李 靖<sup>3</sup>, 徐永立<sup>1</sup>, 张培军<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 青岛市海洋与渔业局渔业技术推广站, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 青岛文昌鱼(*Branchiostoma japonicus*)采自于青岛沙子口海区, 在室内进行周年培育。每月采集样品, 经测量、固定以及组织切片观察, 研究了其周年卵巢和精巢的发育规律。结果表明, 室内培育的文昌鱼一周年内全长没有明显变化, 仅体质量在繁殖期即其性腺发育至V期时有明显增大( $P < 0.05$ ), 精卵排空后则恢复原来体质量。文昌鱼1 a内在夏季6~7月繁殖1次, 能自行排放卵和精子, 排空后个体的卵巢或精巢, 在适宜的条件下, 经历I、II、III、IV和V期的发育过程, 进行下一轮的性腺发育。文昌鱼精巢在IV期前先于卵巢发育, 两者在IV期前发育都不同步, 精巢处于IV期时间较长, 一般从3月持续到5月, 而卵巢处于IV期一般是在4月~5月。

**关键词:** 青岛文昌鱼(*Branchiostoma japonicus*); 室内培育; 性腺发育; 年周期; 组织学

中图分类号: Q418

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)11-0006-08

文昌鱼(*Branchiostoma*)一般分布在热带、亚热带以至暖温带的8~16 m浅水海域中, 主要在北纬48°~南纬40°的环形地带; 在中国秦皇岛、青岛、厦门和北海等海域均有发现。青岛文昌鱼(*Branchiostoma japonicus*)隶属脊索动物门(Chordata)、头索动物亚门(Cephalochordata)、文昌鱼科(Branchiostomidae)、文昌鱼属<sup>[1]</sup>。文昌鱼被认为是最接近脊椎动物直接祖先的现生动物, 是无脊椎动物进化到脊椎动物的过渡型动物<sup>[2]</sup>, 在脊椎动物起源与演化研究中占有极其重要的位置, 是研究动物系统发育的珍贵材料和模式动物<sup>[3-5]</sup>。此外, 文昌鱼富含蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸<sup>[6]</sup>、碘、铁和磷, 具有较高的营养价值<sup>[1]</sup>和商业价值, 深受人们喜爱<sup>[5]</sup>。但是近年来由于环境污染、过度捕捞等原因, 致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都呈现下降趋势<sup>[7-8]</sup>。中国文昌鱼的数量也急剧减少, 1988年已经被列为国家二级重点保护动物, 并在青岛、厦门等地设立自然保护区。由于文昌鱼的特殊进化地位, 自从1774年Pallas<sup>[5]</sup>在英国南部海岸首次发现文昌鱼后, 各国学者对文昌鱼的胚胎发育<sup>[9,10]</sup>、生理生化<sup>[11]</sup>、神经系统<sup>[12,13]</sup>等方面开展了系统研究。特别是近年来, 随着分子生物学技术兴起, 文昌鱼又被作为了研究脊椎动物及其组织器官系统发生、进化发育生物学、比较功能基因组学和比较免疫学等研究的理想模式生物<sup>[4,14]</sup>。

随着对文昌鱼研究的深入及其保护需求的提高, 国内外学者陆续开展了其繁殖生物学及人工养殖研究。美国学者Stokes<sup>[15]</sup>系统报道了野生佛罗里达文昌鱼的亲本营养、性腺指数的变化、产卵模式及条件。法国学者Fuentes等<sup>[16,17]</sup>跟踪观察了野生欧洲文昌鱼的繁殖习性, 明确了欧洲文昌鱼的繁殖时期, 并对其室内产卵条件进行了初步探索, 优化了诱导产卵的方法。日本学者Yamaguchi等<sup>[18]</sup>和Kubokawa等<sup>[19]</sup>也分别观察了日本野生文昌鱼的繁殖习性及其性腺发育规律, 后者还成功诱导其在室内条件下产卵, Yasui等<sup>[20]</sup>则进一步构建了日本文昌鱼室内循环水培育系统, 并繁育出子代文昌鱼。在中国, 文昌鱼的研究主要集中在青岛和厦门文昌鱼。其中对厦门文昌鱼的繁殖生物学研究方面, 不仅明确了厦门野生文昌鱼性腺发育年周期及内分泌调控规律<sup>[8,21]</sup>, 而且还探讨了环境因素如水温、光周期、盐度和pH等对文昌鱼性腺发育和生殖细胞的影响<sup>[22-24]</sup>, 目前已经获得厦门文昌鱼全人工繁育F2代<sup>[25]</sup>。而对于青岛文昌鱼繁殖生物学的研究报道相对较少, 童第周教授<sup>[26]</sup>作为中国文昌鱼胚胎学研究奠基人, 在20世纪50年代率先在中国突破了文昌鱼室内繁殖技术。

收稿日期: 2010-04-28; 修回日期: 2010-07-16

基金项目: “863” 高技术研究发展计划项目(2008AA092602)

作者简介: 马得友(1984-), 男, 山东莒县人, 主要从事文昌鱼和雌核发育牙鲆性腺发育学研究, E-mail: mdy531@163.com; 尤锋, 通信作者, 电话: 0532-82898560, E-mail: youfeng@ms.qdio.ac.cn

吴贤汉等<sup>[27]</sup>和宋裕昌等<sup>[28]</sup>分别对野生青岛文昌鱼种群年龄结构、生活史及卵巢发育年周期进行了研究。张士瑾等<sup>[29,30]</sup>观察了实验室培育的青岛文昌鱼成体的产卵、排精及其受精卵早期发育情况,吴贤汉等<sup>[31]</sup>学者又成功获得室内培育的文昌鱼子二代,但是对室内培育条件下青岛文昌鱼精巢和卵巢年周期发育的研究几乎未见报道。

作者通过组织切片和显微观察方法,研究了室内条件下青岛文昌鱼卵巢和精巢发育年周期过程,以期了解文昌鱼性腺发育规律,完善其性腺发育年周期的理论知识,为人工调控文昌鱼的生殖活动和实现全人工繁育提供基础资料,为文昌鱼资源恢复保护和开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 文昌鱼的培养

文昌鱼于2008年9月取自青岛市沙子口自然海区,活体运输至培育室,在容积为400 L的培育缸中培养,缸内铺有经筛选的海砂,厚度为15~20 cm。采用自然光照,缸内连续充气,每天上午换水(盐度为35)1次,换水后投喂螺旋藻(*Spirulina*)和小球藻(*Chlorella*),每天上午和下午分别记录培育海水的温度。

#### 1.1.2 样品的采取和固定

2008年9月~2009年5月,每月下旬随机挑选10尾文昌鱼,在2009年6月中旬和下旬、7月上中下旬及8月上旬和下旬分别取10尾文昌鱼。测量文昌鱼的全长和体质量,然后将其置于Bouin's液中固定,24 h后转入70%乙醇中长期保存。

### 1.2 性腺组织切片

分别取文昌鱼躯干部,经梯度酒精脱水,石蜡包埋,使用LEICA RM 2145切片机做连续组织切片,切片厚度为5~7 μm,切片分别展在载玻片上,苏木精-伊红染色,树脂封片。在光学显微镜下观察切片,卵巢和精巢样品至少各观察3个样品,每个样品至少观察8个切片,并用Nikon相机采集图片。

## 2 结 果

### 2.1 室内条件下文昌鱼的周年生长情况

在室内条件下,2008年9月~2009年8月培育文昌鱼的水温范围是14~26℃(图1),最低温为14℃,出现在2009年1月、2月;最高温为26℃,出现在

2009年8月。

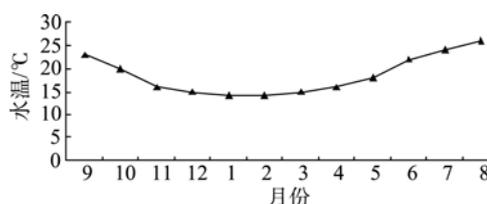


图1 室内文昌鱼培育池的海水温度

Fig. 1 Seawater temperatures of indoor amphioxus culture tank

室内培养的文昌鱼生长年周期观察结果见图2。由图2可知,文昌鱼雌、雄个体间的生长没有明显差别。其全长一周年内也没有明显变化( $P > 0.05$ ),而体质量则在繁殖期(6、7月)均有明显的增大( $P < 0.05$ ),8月份即繁殖期后恢复原来体质量。

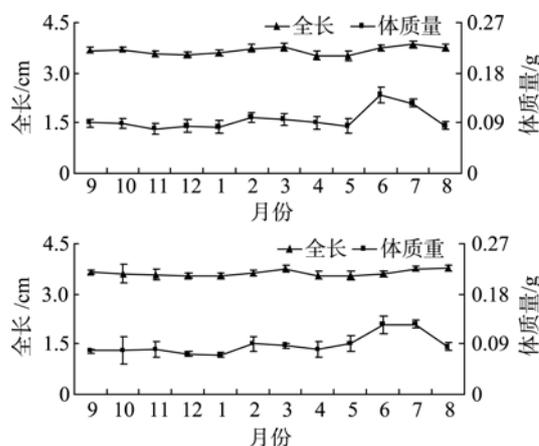


图2 室内培育雌(上)、雄(下)文昌鱼的周年生长

Fig. 2 The annual growths of female (top) and male (bottom) amphioxus under indoor culture conditions

### 2.2 性腺组织学切片观察

参照方永强等<sup>[21]</sup>对厦门文昌鱼性腺发育年周期的报道,并参考Cowden<sup>[32]</sup>对矛形文昌鱼(*Branchiostoma caribaeum*)卵母细胞的发育分期,观察2008年9月~2009年5月每月固定的文昌鱼性腺组织切片,以及2009年6月中旬和下旬、7月上中下旬及8月上旬和下旬固定的文昌鱼性腺组织切片。卵巢和精巢的发育分述如下:

#### 2.2.1 卵巢的发育

青岛文昌鱼的卵巢是由两侧按肌节对称排列的卵囊组成,卵囊多呈椭圆形,左侧平均有 $24.0 \pm 0.67$ 个卵囊,右侧往往比左侧多2个,平均有 $25.9 \pm 0.57$ 个。根据卵囊一周年的发育情况,可以

把室内条件下青岛文昌鱼雌性个体卵巢的发育分为 6 期(图 3)。

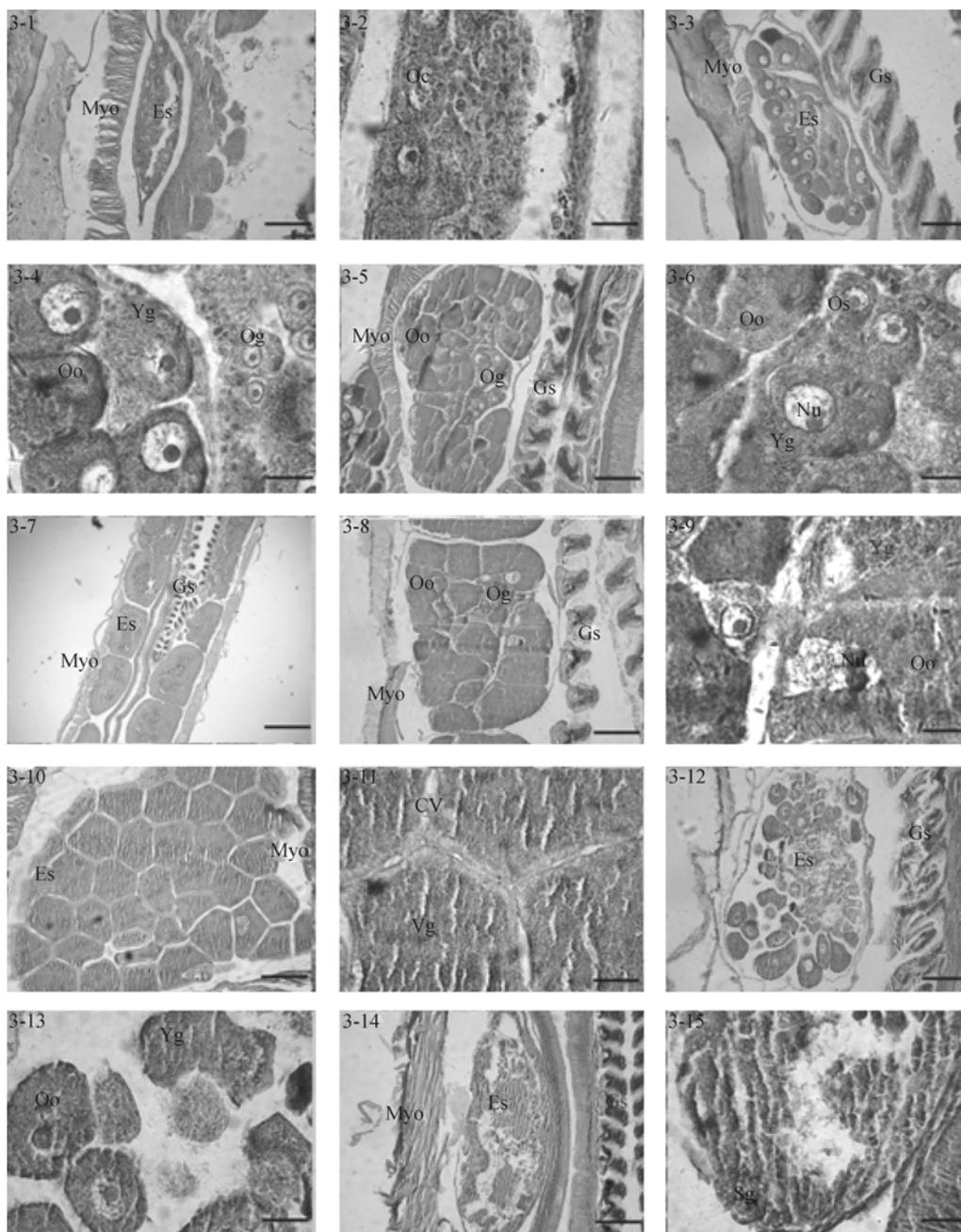


图 3 文昌鱼卵巢发育年周期的组织学观察

Fig. 3 The histological observation of annual development of amphioxus ovary

3-1, 3-2. I 期; 3-3, 3-4. II 期; 3-5, 3-6. III 期; 3-7, 3-8, 3-9. IV 期; 3-10, 3-11. V 期; 3-12, 3-13, 3-14, 3-15. 排卵后期; Myo. 肌节; Es. 卵囊; Gs. 鳃棒; Og. 卵原细胞; Oo. 卵母细胞; Yg. 卵黄粒; Nu. 核仁; 3-1, 3-3, 3-5, 3-8, 3-10, 3-12, 3-14. 标尺=150 μm; 3-2, 3-4, 3-6, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15. 标尺=30 μm; 3-7. 标尺=300 μm

期: 卵囊中有很大的空隙, 卵圆形或椭圆形的卵原细胞被生殖被膜包裹, 周围有许多色素细胞

围绕, 卵原细胞进行旺盛增殖活动(图 3-1、图 3-2)。期: 卵囊的空隙减小, 出现小生长期初级卵

母细胞, 卵母细胞的体积明显增大, 有些卵母细胞的核开始移向卵细胞的动物极一侧; 卵囊内周围的卵母细胞比中部的卵母细胞先进行卵黄沉积(图 3-3、图 3-4)。

期: 卵囊开始饱满, 其内出现大生长期早期和中期初级卵母细胞, 早期卵母细胞形状多数为卵圆形, 胞质中积累了较多的卵黄粒; 中期的卵母细胞中卵黄粒进一步堆积, 核膜开始不清晰, 卵囊已经较饱满(图 3-5、图 3-6)。

期: 卵囊更加饱满, 各卵囊发育开始同步; 前期卵母细胞已较少, 大量出现大生长期晚期的卵母细胞, 其内充满了卵黄粒(图 3-7~图 3-9)。

期: 卵囊内已充满成熟的卵母细胞, 由于卵细胞的之间相互挤压, 卵囊呈不规则状; 在胞质边缘可见有一圈透亮的皮质泡, 这是成熟卵囊的典型特征(图 3-10、图 3-11)。

排卵后期: 产卵后, 卵囊体积迅速减小, 卵囊被膜破裂, 排卵后剩余卵细胞的卵黄开始融合分解, 为下一轮的卵囊发育做准备(图 3-12~图 3-15)。

### 2.2.2 文昌鱼精巢的发育

青岛文昌鱼的精巢是由两侧按肌节对称排列的精囊组成, 精囊呈椭圆形, 左侧平均有 23.9 个 $\pm$ 0.74 个精囊, 右侧常常也比左侧多 2 个, 平均有 25.8 个 $\pm$ 0.63 个。根据精囊一周年的发育情况, 可以把室内条件下青岛文昌鱼雄性个体精巢的发育分为 6 期(图 4):

期: 精囊狭长, 空隙很大, 仅有一层卵圆形的精原细胞, 并贴近由结缔组织围绕而成的生殖被膜(图 4-1、图 4-2)。

期: 精囊的体积明显增大, 呈椭圆形, 空隙减小。此期以精原细胞的增殖为主要特征, 精原细胞的数量明显增多(图 4-3、图 4-4)。

期: 精巢中出现初级精母细胞, 它是精巢中最大的细胞, 其核也很大, 位于细胞中央, 其中具有大的着色很深的核仁(图 4-5、图 4-6)。

期: 精囊中有大量的各级生精细胞、精细胞和少量的精子, 精囊比较饱满, 由于同侧精囊相互挤压使其呈不规则形状(图 4-7、图 4-8)。

期: 精囊中充满了精细胞和精子, 两侧的精囊相互挤压而使其呈多边形。具有此期精巢的雄性文昌鱼可以正常排精(图 4-9~图 4-11)。

排精后期: 排精后, 精囊萎缩, 其内有未变态成精子的精细胞和未排出的精子, 这些精细胞和精子

最终会被融解, 精巢将开始新一轮的发育(图 4-12~图 4-15)。

## 2.3 文昌鱼性腺的年发育周期

根据室内培养的青岛文昌鱼雄性和雌性性腺一周年的发育的观察, 发现当年已经排完卵和精子的文昌鱼个体, 在适宜的培育条件下, 其性腺能够经历 ~ 期的发育过程, 在次年 6~7 月再次产卵排精, 进行性腺下一周期的发育。

如图 5 所示, 9 月、10 月雌性文昌鱼主要处于期卵巢发育时期(水温为 20~23 ); 期卵巢发育时间往往较长, 从 11 月出现~次年 1 月(水温为 14~16 ), 在 12 月和次年 1 月约 80% 雌性个体的卵巢都发育至 期; 而次年 2 月、3 月则有约 80% 雌性个体的卵巢处于 期(14~15 ); 4 月、5 月雌性个体则全部发育到 期(水温为 16~18 ); 6 月、7 月为文昌鱼的生殖期, 雌性个体的卵巢全部处于 期(水温为 22~24 ); 8 月份排完卵后, 雌性个体的卵巢恢复至排卵后期(水温为 26 )。

9 月、10 月雄性文昌鱼主要处于 期精巢(水温为 20~23 ), 处于此期个体的比例可以占到 75%。

期精巢发育期的雄性个体主要出现于 11 月、12 月(水温为 15~16 ), 次年 1 月、2 月雄性个体主要处于 期精巢(水温为 14 ); 期精巢发育时间较长, 从次年 3 月出现至 5 月(水温为 15~18 ), 其中 4 月、5 月雄性个体的精巢全部处于 期(水温为 16~18 ); 6 月、7 月为文昌鱼的生殖期(水温为 22~24 ), 雄性个体的精巢全部处于 期; 8 月份排完精后(水温为 26 ), 雄性个体的精巢恢复至排精后期。

精巢一般在 期前先于卵巢发育, 卵巢和精巢在 期前发育都不同步; 而且雄性个体精巢处在 期时间较长, 一般从 3 月持续到 5 月, 而雌性个体卵巢处于 期的时间一般是在 4~5 月。

## 3 讨论

作为最接近脊椎动物直接祖先的现生动物, 文昌鱼在脊椎动物起源与进化研究中占有极其重要的位置。在中国, 文昌鱼的分布范围很广泛, 从秦皇岛至北海都有报道。目前关于文昌鱼系统分类的研究业已展开, 一般认为厦门地区有两种文昌鱼, 一种是白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*), 另一种是与青岛文昌鱼相近的日本文昌鱼(*B. japonicus*)<sup>[33]</sup>。王义权等<sup>[2]</sup>建议把青岛等地的文昌鱼种名 *Branchiostoma*

*belcheri tsingtauense* 订正为 *B. japonicus*, 而南方的文昌鱼保留其原种名 *B. belcheri*。关于文昌鱼的分

类命名还需进一步研究和探讨。

根据作者对青岛文昌鱼性腺发育年周期的研究

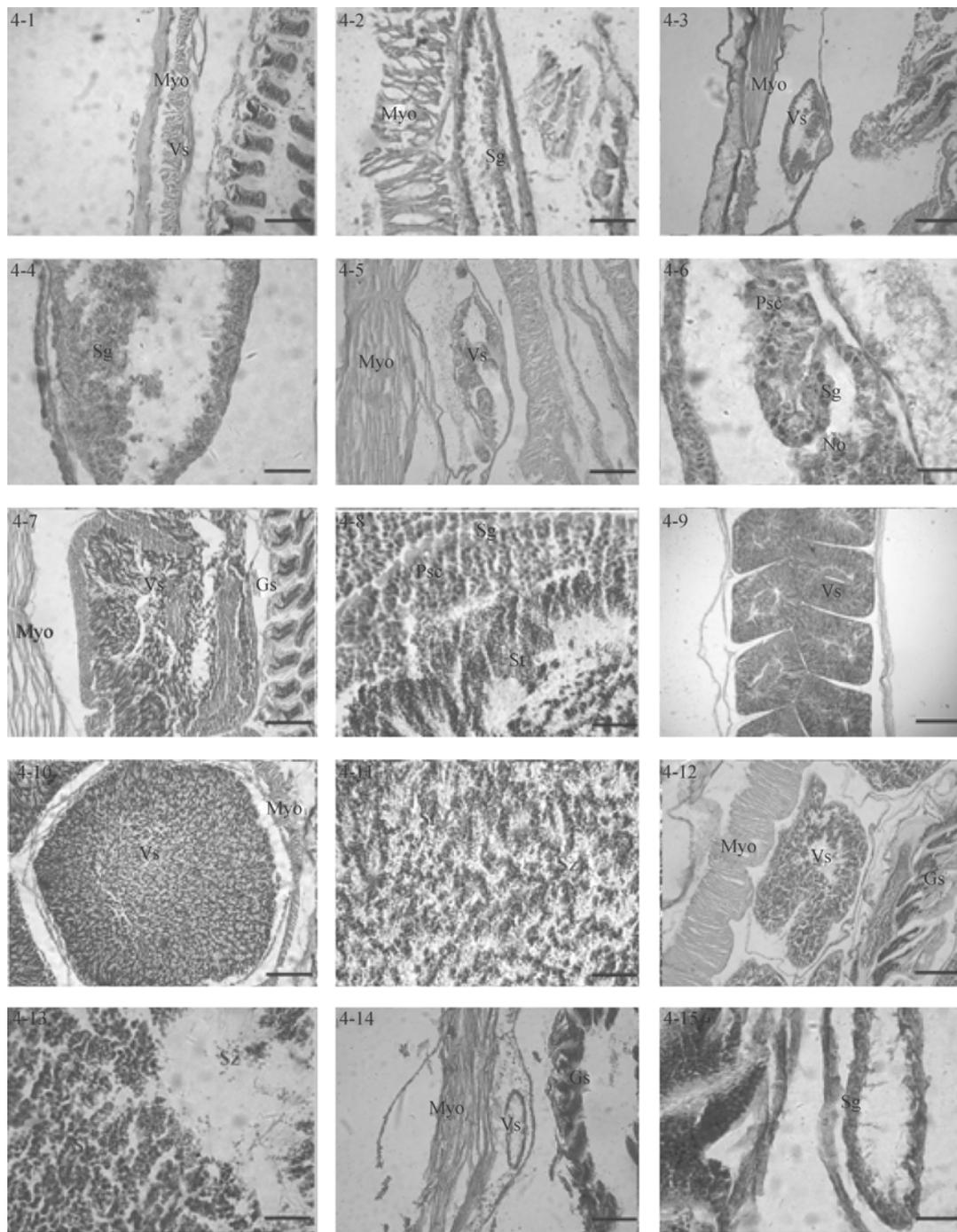


图 4 文昌鱼精巢发育年周期的组织学观察

Fig. 4 The histological observation of annual development of amphioxus testis

4-1, 4-2. I 期; 4-3, 4-4. II 期; 4-5, 4-6. 期; 4-7, 4-8. 期; 4-9, 4-10, 4-11. 期; 4-12, 4-13, 4-14, 4-15. 排精后期; Myo. 肌节; Vs. 精囊; Gs. 鳃棒; Sg. 精原细胞; Psc. 初级精母细胞; St. 精细胞; Sz. 精子; Nu. 核仁; 4-1, 4-3, 4-5, 4-7, 4-10, 4-12, 4-14. 标尺=150 μm; 4-2, 4-4, 4-6, 4-8, 4-11, 4-13, 4-15. 标尺=30 μm; 4-9. 标尺=300 μm

4-1, 4-2. Phase I; 4-3, 4-4. Phase II; 4-5, 4-6. Phase; 4-7, 4-8. Phase; 4-9, 4-10, 4-11. Phase; 4-12, 4-13, 4-14, 4-15. emission later stage. Myo. myomere; Vs. vesicula seminalis; Gs. gill slit; Sg. spermatogonium; Psc. primary spermatocyte; St. spermatid; Sz. spermatozoa; Nu. nucleolus. 4-1, 4-3, 4-5, 4-7, 4-10, 4-12, 4-14. bar=150 μm; 4-2, 4-4, 4-6, 4-8, 4-11, 4-13, 4-15. bar=30 μm; 4-9. bar=300 μm

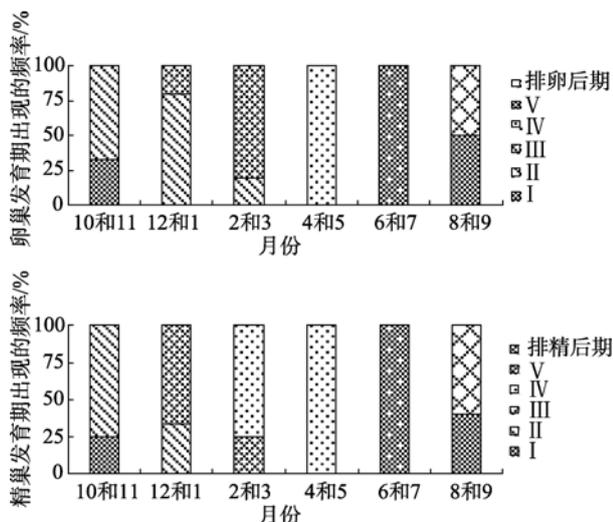


图5 室内培育文昌鱼卵巢(上)和精巢(下)的年周期发育  
Fig. 5 The annual developmental cycles of amphioxus ovary (top) and testis (bottom) under indoor culture conditions

结果, 并对比方永强等<sup>[21]</sup>报道的厦门文昌鱼性腺的周年发育情况, 二者在性腺发育方面存在很多差异: (1)青岛文昌鱼排精产卵后性腺并不消失, 而是排空的卵囊和精囊中再次经历 ~ 期的发育过程; 但厦门文昌鱼排完精卵之后性腺消失, 尔后在 期重新形成新的生殖圈; (2)6月、7月是青岛文昌鱼的繁殖季节, 而厦门文昌鱼的繁殖期持续时间较长, 从5月上旬~7月。当然它们的性腺发育也有相似性, 如不同个体的卵巢在 期之前发育是不同步的, 同一个体中部卵囊的发育早于头部和尾端的卵囊; 同一个卵囊内卵母细胞的发育在 期之前也是不同步的, 贴近被膜的卵母细胞先发育, 中间的卵母细胞后发育。这一点也与日本文昌鱼的卵巢发育类似, 后者不同个体的卵巢发育亦是不同步的且有多种发育阶段<sup>[19]</sup>。青岛文昌鱼同其他几种文昌鱼的性腺发育规律也有相同和不同之处, 室内条件下欧洲文昌鱼的成熟期最多有两个月, 温度从 19 上升至 25 就能刺激室内培育的欧洲文昌鱼(*B. lanceolatum*)性腺成熟<sup>[16]</sup>, 青岛文昌鱼性腺也有两个月(6月、7月)的成熟繁殖期, 其性腺成熟在室内条件下的水温是 18~24 。根据观察, 室内条件下, 青岛文昌鱼 1 a 只有 1 次产卵排精, 而佛罗里达文昌鱼(*B. floridae*) 1 a 能产两次卵<sup>[15]</sup>, 有很大比例的日本文昌鱼 1 a 也能产两次卵<sup>[18]</sup>。因此, 不同种或不同地理群体的文昌鱼性腺发育有相同的方面也有明显的区别。

张士瑾等<sup>[29]</sup>通过观察室内培育 1 个多月的青岛文昌鱼活体, 发现 8 月份文昌鱼的全部退化, 这与作者的解剖学观察结果相同; 但是经组织学切片观察, 作者发现其性腺并未消失, 而是性腺萎缩, 以致在解剖镜下观察不到卵圆形的生殖囊。有关青岛文昌鱼性腺发育年周期的研究, 仅见宋裕昌等<sup>[28]</sup>对野生青岛文昌鱼卵巢的报道, 其发育在繁殖期即 期前都不同步, 在第一年的 12 月就有卵黄生成晚期( )的卵母细胞, 在次年的 6~7 月才能达到成熟产卵。而作者研究结果略有不同, 室内培育的文昌鱼不论是雄性还是雌性个体的性腺则是在 期前发育不同步。有关文昌鱼性腺中卵囊或精囊个数, 室内培育的与宋裕昌等<sup>[29]</sup>报道的野生文昌鱼类似, 在身体两侧是不相等的, 右侧一般比左侧多两个: 室内培育的文昌鱼右侧生殖囊为 26 个, 左侧生殖囊为 24 个; 而野生文昌鱼右侧卵囊平均有 27 个, 左侧卵囊平均有 25 个。作者还观察了室内条件下青岛文昌鱼精巢发育的周年变化规律, 发现不同雄性个体的精巢在 期前发育也往往不同步。在室内培育情况下, 文昌鱼精巢和卵巢年周期的发育经历了水温先下降后升高过程, 这一温度的变化将有助于性腺的发育和成熟, 但其与温度的相关性还有待进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 梁惠, 张士瑾. 文昌鱼营养成分分析及营养学评价[J]. 营养学报, 2006, 28(2): 184-186.
- [2] 王义权, 方少华. 文昌鱼分类学研究及展望[J]. 动物学研究, 2005, 26(6): 666-672.
- [3] Schubert M, Escriva H, Xavier-Neto J, et al. Amphioxus and tunicates as evolutionary model systems[J]. **Trends in Ecology and Evolution**, 2006, 21(5): 269-277.
- [4] Shimeld S M, Holland N D. Amphioxus molecular biology: insights into vertebrate evolution and developmental mechanisms[J]. **Canadian Journal of Zoology**, 2005, 83(1): 90-100.
- [5] 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.
- [6] Svetashev V I, Li H F, Yu F C, et al. Fatty acid composition and total lipid content in the lancelet *Branchiostoma belcheri tsingtaoense* (Tchang et Koo) [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1994, 108(2/3): 325-328.
- [7] 方永强, 翁幼竹, 戴艳玉, 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.

- [8] 方永强. 文昌鱼生殖内分泌生理学研究进展 [J]. 生物学通报, 1995, **30**(4): 1-4.
- [9] Etnensohn C A, Wessel G M, Wray G A. Development of sea urchins, ascidians, and other invertebrate deuterostomes: experimental approaches[M]. California: Elsevier Academic Press, 2004. 195-215.
- [10] Holland L Z, Panfilio K A, Chastain R, *et al.* Nuclear beta-catenin promotes non-neural ectoderm and posterior cell fates in amphioxus embryos[J]. **Developmental Dynamics**, 2005, **233**(4): 1 430-1 433.
- [11] Satoh G. A trajectory of increasing activity and the elaboration of chemosensory modality: A new perspective on vertebrate origins[J]. **Zoological Science**, 2005, **22** (6): 613-626.
- [12] Wicht H, Lacalli T C. The nervous system of amphioxus: structure, development, and evolutionary significance[J]. **Canadian Journal of Zoology**, 2005, **83**(1): 122-150.
- [13] 张燕君, 陈忠科, 任前升, 等. 文昌鱼神经胚 cDNA 文库的构建和 hedgehog 基因的筛选[J]. 动物学报, 47: 106-109.
- [14] 张士瑾, 郭斌, 梁宇君. 我国文昌鱼研究 50 年[J]. 生命科学, 2008, **20**(1): 64-68.
- [15] Stokes M D, Holand 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.
- [16] 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**, 2004, **302B**(4): 384-391.
- [17] 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**, 2007, **308B**(4): 484-493.
- [18] Yamaguchi T, Henmi Y. Biology of the Amphioxus, *Branchiostoma belcheri* in the Ariake sea, Japan II. Reproduction[J]. **Zoological Society**, 2003, **20**(7): 907-918.
- [19] 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.
- [20] Yasui K, Urata M, Yamaguchi N, *et al.* Laboratory culture of the oriental lancelet *Branchiostoma belcheri* [J]. **Zoological Science**, 2007, **24**(5): 514-520.
- [21] 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.
- [22] 方永强, 梁苹, 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.
- [23] 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): 73-77.
- [24] 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): 170-174.
- [25] 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]. **Journal of Experimental Zoology**, 2007, **308B**(4): 464-472.
- [26] Tung T C, Wu S C, Tung Y F. The development of isolated blastomers of Amphioxus[J]. **Scientia Sinica**, 1958, **7**(12): 1 280-1 320.
- [27] 吴贤汉, 张世瑾, 王永元, 等. 青岛文昌鱼的生活史、年龄、生长和死亡研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, **26**(2): 175-178.
- [28] 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, **4**: 50-54.
- [29] 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[J]. 海洋科学集刊, 2000, **42**: 74-76.
- [30] Zhang S C, Zhu J T, Li G R, *et al.* Reproduction of the laboratory-maintained lancelet *Branchiostoma belcheri tsingtaunese*[J]. **Ophelia**, 2001, **54**(2): 115-118.
- [31] Wu X H, Zhang S C, Wang Y Y, *et al.* Laboratory observation on spawning, fecundity and larval development of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*)[J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 1994, **12**(4): 289-294.
- [32] Cowden R R. Cytochemical studies of oocyte growth in the lancelet *Branchiostoma caribaeum*[J]. **Zeitschrift für Zellforschung**, 1963, **60**: 399-408.
- [33] Xu Q S, Ma F, Wang Y Q. Morphological and 12S rRNA gene comparison of two *Branchiostoma* species in Xiamen waters[J]. **Journal of Experimental Zoology**, 2005, **304B**(3): 259-267.

## Annual gonad development of the laboratory-reared amphioxus (*Branchiostoma japonicus*)

MA De-you<sup>1,2</sup>, YOU Feng<sup>1</sup>, WEN Ai-yun<sup>1,2</sup>, TAN Xun-gang<sup>1</sup>, NI Jing<sup>1</sup>, LI Jing<sup>3</sup>, XU Yong-li<sup>1</sup>, ZHANG Pei-jun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Technical Extension Station, Ocean and Fishery Bureau of Fisheries of Qingdao, Qingdao 266071, China )

**Received:** Apr, 28, 2010

**Key words:** *Branchiostoma japonicus*; laboratory-reared; gonad development; annual period; histology

**Abstract:** Amphioxus, *Branchiostoma japonicus* is one of the most precious subjects in the study of animal phylogeny. In recent years, the number of amphioxus has drastically decreased owing to environment changes and over catching. Artificial breeding is needed to provide sufficient supply of amphioxus. Amphioxus was caught from Shazikou natural sea area in Qingdao, and cultivated in our lab for more than one year. The samples were collected and measured, and then fixed monthly. Histological structure of amphioxus gonads was observed under light microscope. From Sep. 2008 to Aug. 2009, there were nearly no change in total length of amphioxus under indoor condition. As to body weight, there were significant increases only in the reproduction period (i.e. phase V phase of ovaries and testis)( $P < 0.05$ ), and then dropped to the former weight after reproduction. Amphioxus breeds only one time each year from June to July in summer. The laboratory-reared amphioxus could release eggs and sperm spontaneously. Afterwards, their ovaries and testis went through phase , , , and under suitable conditions, and the gonad proceeded to the next round of annual development. It was also found that development of ovaries as well as testis did not accord until phase , and testis usually entered phase and stayed there for a longer time (from March to May) than ovaries (from April to May).

(本文编辑: 谭雪静)