

裙带菜(*Undaria pinnatifida*)雌诱激素在有性生殖过程的作用及影响其分泌的环境条件*

李大鹏¹ 李文茹^{1,2} 邓海临³ 杜献明⁴

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049;
3. 福建农林大学食品科学学院 福州 350002; 4. 临沂出入境检验检疫局 临沂 276034)

摘要 以大型经济褐藻裙带菜配子体为实验材料, 采用活性检测法对雌诱激素在有性生殖过程中的作用进行了研究。结果表明, 刚刚排出的雌配子分泌了一种或几种易挥发的激素类物质, 这些激素类物质能够促进精子释放并吸引精子向其游动, 完成受精作用。另外, 通过显微计数释放精子数的方法对影响裙带菜雌诱激素分泌的培养时间和培养的光照强度、环境温度、光周期等进行了实验, 对精卵结合过程中雌诱激素分泌的最佳条件进行了研究, 发现雌配子体在发育培养 6—8d 时检测到雌诱激素活性, 最佳的温度条件为 19℃, 在光强 40—160 μmol/(m² · s) 范围均检测到雌诱激素活性, 最佳的光周期为 12h : 12h。

关键词 裙带菜, 雌诱激素, 有性生殖

中图分类号 Q256, Q257

被子植物中, 当卵细胞成熟时, 颈卵器的顶部裂开, 颈卵器细胞分解为胶质体并且部分流出体外吸引精细胞完成受精作用(李兆亮等, 1995)。许多具有同形孢子的蕨类植物的精细胞对苹果酸具有向化作用(Sheffield *et al.*, 1987), 另外石生海藻的精卵结合也具有种的特异性, 这是由卵细胞分泌的一种外激素所引起的(赵自国, 2008)¹⁾。国际上对海藻中雌、雄配子之间的向化性研究比较深入, 证明雄配子对雌配子的向化性, 是因为雌配子分泌了一种或几种烯烴类物质, 使雄配子游向雌配子, 从而顺利完成受精作用(Müller *et al.*, 1971, 1979, 1981, 1982; Lüning *et al.*, 1978), 这些物质通常被称为雌诱激素(李文茹等, 2006)。Kodama 等(1993)研究发现, 在萱藻属和节荚藻属植物的有性生殖过程中, 萱藻属雌配子分泌一种称为 etocarpene 的物质来吸引雄配子, 节荚藻属的雌配子分泌 hormosirene 来吸引雄配子, 但是这两种物质不能交叉吸引, 萱藻属雌配子分泌的 etocarpene 不能吸引节荚藻属雄配子, 反之亦然。

裙带菜(*Undaria pinnatifida*)是我国养殖的三大经济海藻之一, 有较高的经济价值(国家中医药管理局中华本草编委会, 1999)。随着裙带菜需求量的增加和养殖规模的不断扩大, 迫切需要通过提高育苗技术, 因而突破裙带菜有性生殖过程的基础理论研究势在必行。作者在研究裙带菜雌雄配子体的发育过程时, 发现了裙带菜中雌诱激素的存在。本文在此基础上, 采用生理学研究方法, 对裙带菜的雌诱激素在有性生殖过程中的作用以及影响其分泌的环境条件进行了深入的研究, 以期为进一步研究藻类的向化性提供更多的依据, 从而更好地利用和控制藻类有性生殖, 完善繁育藻类机制, 培育养殖优良藻类。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用裙带菜(*Undaria pinnatifida*)雌、雄配子体取自中国科学院海洋研究所开放室种质库, 于 1994 年采自威海市俚岛养殖场。配子体保种于加富海水中

* 国家自然科学基金资助项目, 40976087 号。李大鹏, 博士, E-mail: dpli@qdio.ac.cn

1) 赵自国, 2008. 三种大型海藻的早期发育研究. 长春: 东北师范大学博士学位论文, 23—24

收稿日期: 2010-05-22, 收修改稿日期: 2010-07-12

(Wu *et al.*, 2004)。为扩大培养, 将配子体接种到 PES 培养液中(Provasoli, 1968), 在 23 , 40—60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 12h : 12h 光周期下扩增, 营养生长状态良好的裙带菜雌、雄配子体分别用组织捣碎机捣碎, 使之呈 4—8 细胞状态, 用消毒海水反复冲洗后, 加入氮、磷浓度分别为 290 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 17 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的发育液中。取雌、雄配子体各 20ml 加入到 500ml 烧杯中, 再向烧杯中各加入 80ml 发育培养液, 使配子体细胞在烧杯中平铺一单层。置于 17 , 40—60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 12h : 12h 光周期的环境条件下进行发育培养, 每 3 天更换新鲜的培养液。

1.2 雌诱激素在有性生殖中的作用实验

第 1—10 天, 每天各做 1 个雌配子体样品, 置于 17 , 40—60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 12h : 12h 光周期的环境条件下进行发育培养。每 3 天更换新鲜的培养液。发育培养到第 10 天, 黑暗后 2h 进行雌诱激素活性检测实验。

1.3 环境条件对雌诱激素分泌的影响实验

1.3.1 温度的影响实验

在控制光强 40—60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期 12h : 12h 的条件下, 设置不同的温度实验组为 5 、 10 、 15 、 19 、 23 。第 1 天, 做雌配子体发育培养样品 10 个, 置于每个温度实验组 2 个样品, 进行发育培养。第 2 天, 做 10 个雄配子体发育样品, 置于 17 , 40—60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 12h : 12h 光周期的环境条件下进行发育培养。发育培养到第 7 天, 黑暗后 2h 进行雌诱激素活性检测实验。

1.3.2 光强的影响实验

在控制温度 17 , 光周期 12h : 12h 的条件下设置不同的光强实验组为 5—10, 20—25, 40—50, 80—100, 140—160 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。第 1 天, 做雌配子体发育培养样品 10 个, 置于每个光强实验组 2 个样品, 进行发育培养。第 2 天, 做 10 个雄配子体发育样品, 置于 17 , 40—60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 12h : 12h 光周期的环境条件下进行发育培养。发育培养到第 7 天, 黑暗后 2h 进行雌诱激素活性检测实验。

1.3.3 光周期的影响实验

在控制温度 17 , 光强 40—60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的条件下, 设置不同的光周期实验组为 24h : 0h, 16h : 8h, 12h : 12h, 8h : 16h, 0h : 24h。第 1 天, 做雌配子体发育培养样品 10 个, 置于每个光周期实验组 2 个样品, 进行发育培养。第 2 天, 做 10 个雄配子体发育样品, 置于 17 , 40—60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 12h : 12h 光周期的环境条件下进

行发育培养。发育培养到第 7 天, 黑暗后 2h 进行雌诱激素活性检测实验。

1.4 雌诱激素活性检测方法

雌诱激素活性, 用一定体积的雌配子体能促进一定体积成熟的雄配子体释放的精子个数来表示。发育培养黑暗后 2h, 取 1ml 的雌配子体加入到 1ml 发育 6 天的成熟雄配子体中, 将两者充分混匀, 用滴管随机取样加到血球计数板上, 在显微镜下计数排出的精子数。

2 结果

2.1 裙带菜雌诱激素在有性生殖过程的作用

将 10 个雌配子体样品各取 1ml, 对应加入到 1ml 雄配子体中, 混合后用显微镜观察雄配子体的变化, 结果发现, 已形成卵囊但未成熟排卵的雌配子体, 加入到雄配子体中未出现排精现象; 发育培养到第 6—7 天的雌配子体, 黑暗后 1h 左右后大量的卵开始排出, 加入到雄配子体中后, 发现 20s 左右已有少量的精子陆续排出, 90s 左右培养液中的精子浓度已经很高(图 1), 排出的精子很快游向附近的卵, 并不断地触碰卵, 卵受精后其他的精子逐渐游向附近其他的卵(图 2)。由此可以看出, 雌配子体排卵时能够分泌一种信号物质, 促进雄配子体精子的排放。当向雄配子体发育液中加入成熟排卵的雌配子体时, 才会引起精子的大量排放。

2.2 发育时间对裙带菜雌配子分泌雌诱激素的影响

雌配子体发育培养 1—4 天, 卵囊还未成熟, 活性检测结果表明不能促进精子的大量排放。培养 6—8 天, 夜间黑暗观察均发生大量排卵, 检测到雌诱激素活性。9—10 天的雌配子体, 大量的卵已排出 3—4 天, 夜间观察只见到极少量的卵排出, 活性检测结果表明, 此时已不能促进精子的大量排放。雌诱激素活性检测实验的统计结果见图 3a。

2.3 环境条件对裙带菜雌配子分泌雌诱激素的影响

实验结果表明, 雌配子体发育培养的温度、光照



图 1 雌诱激素促进成熟的雄配子体精子释放

Fig.1 Sperm attractants stimulate mature male gametophytes to release sperms
a. 未加入雌配子体; b. 加入排卵的雌配子体后 60s; c. 加入排卵的雌配子体后 90s

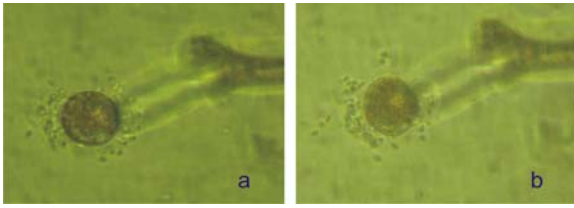


图2 卵子吸引精子与之靠近

Fig.2 Egg attracts sperms to swim toward it

a. 卵的周围吸引了很多精子; b. 受精后的卵周围精子逐渐消散

强度和光周期都是影响雌配子体发育的重要因素, 从而影响雌诱激素的分泌。

雌配子体培养在 5 和 10 的样品虽有发育的迹象, 但还没有发生排卵; 15 虽有少量的卵排出, 但未检测到雌诱激素活性; 19 已发生了大量的排卵, 雌诱激素分泌量最高, 而 23 下雌配子体一直没有发育的迹象。

光强 5—10 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 范围内的样品一直没有发育迹象, 呈营养生长; 在 20—25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 范围内雌配子体已形成少量成熟的卵囊, 并有很少量的卵排出, 但未检测到雌诱激素的活性; 在 40—50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 范围内雌配子体发生了大量的排卵, 检测到雌诱激素活性; 在 80—100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 范围内雌配子体也发生了大量排卵, 但排卵的细胞在总细胞中所占的比例要小于在 40—50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强范围内培养时的;

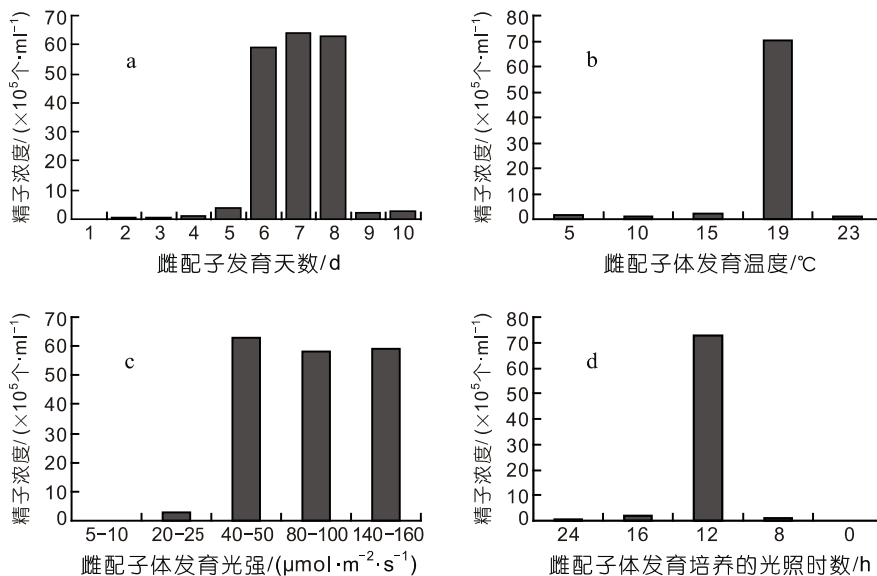


图3 影响裙带菜雌诱激素分泌的环境条件

Fig.3 The environmental conditions affecting secretion of sperm attractants of *U. pinnatifida*

a. 培养时间对雌诱激素分泌的影响; b. 培养温度对雌诱激素分泌的影响; c. 培养光强对雌诱激素分泌的影响; d. 培养光照时数对雌诱激素分泌的影响

在 140—160 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 范围内雌配子体仍能发育, 但是成熟卵囊占总细胞的比例更小, 也发生了排卵。

雌配子体在光照时数为 0 和 24 时不发育, 未检测到雌诱激素活性; 光照时数为 16 和 8, 雌配子体都出现了发育迹象, 但还未形成成熟的卵囊, 未发生排卵, 光照时数为 12, 雌配子体发生了大量的排卵, 检测到雌诱激素活性。雌诱激素活性检测实验的统计结果见图 3b、3c、3d。

3 讨论

作者在研究裙带菜雌、雄配子发育过程中发现裙带菜中雌诱激素的存在(李大鹏等, 2006)。雌、雄配子混合培养时, 雄配子精囊的形成早于卵囊, 但只有当卵子排出后, 雄配子才发生大量的排精现象, 由此可见雌诱激素是在雌配子体排卵后分泌的, 卵和卵囊残余物都能吸引精子, 说明卵和卵囊残余物中都有雌诱激素的存在, 当卵排出后, 雌诱激素随卵分泌到水体中。而大量排卵 3—4 天后的雌配子体不再促进精子排放, 对精子不再有向化吸引作用, 究其原因, 可能因为雌诱激素是易挥发物质, 已经从水体中挥发; 另外, 作者在另文中研究裙带菜雌雄配子体发育过程中发现, 卵排出后 3 天之内未受精, 会再生细胞壁(Zhang *et al*, 2002)。作者推测此时即便有少量的精子在卵周围, 由于细胞加厚也使受精作用的发生变得很困难以致不能受精。

另外, 作者将 1ml 雌配子体加到 1ml 成熟的雄配子体中并充分混匀时, 能够引起精子的大量排放, 而将 1ml 雌配子体发育液加到 10ml 雄配子体发育液中并充分混匀时, 不能促进精子的大量排放。这说明裙带菜雌配子分泌的雌诱激素要达到一定的浓度才能发挥促进精子释放的生理作用。在褐藻中, 具有种特异性的雌诱激素产生向化作用的有效阈浓度在 10^{-11} — 10^{-9} mol/L 范围内, 萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 产生有效的向化作用的阈浓度最低, 为 6.1×10^{-13} mol/L (Maier *et al*, 1986), 由此可见, 精子的信号识别系统的敏感性相当高。而且研究发现, 墨角藻目和海带目平均每个卵子分泌的雌

诱激素的量约为 10^{-12} — 10^{-14} mol (Maier *et al.*, 1986)。裙带菜的雌诱激素发挥生理作用的阈浓度和每卵分泌的雌诱激素的量还有待进一步研究。

在环境条件对雌诱激素影响的实验中, 雌诱激素的活性检测结果几乎都是非有即无, 没有出现预期的梯度变化。但这并不能说明雌诱激素分泌在不同条件下没有差别, 相反, 这说明雌诱激素发挥生理作用是有其阈浓度值的, 当达到其作用的阈浓度时都能引起精子的大量排放。因此, 雌诱激素发挥生理作用的阈浓度研究只能通过对雌诱激素进行进一步的定量研究。雌配子体在不同的发育温度、光强和光周期条件下, 每个卵子分泌的雌诱激素的量是否会有差别, 也要通过进一步的雌诱激素定量实验来研究。

参 考 文 献

- 李大鹏, 李文茹, 2006. 裙带菜配子体发育过程的研究. 海洋与湖沼, 37(Sup.): 237—242
- 李文茹, 李大鹏, 2006. 褐藻雌诱激素研究进展. 海洋科学, 30(3): 79—84
- 李兆亮, 原永兵, 曹宗巽, 1995. 藻类植物和蕨类植物有性生殖的细胞学和生物化学研究现状. 植物学通报, 12(2): 1—8
- 国家中医药管理局中华本草编委会, 1999. 中华本草. 上海: 上海科学技术出版社, 678—679
- Kodama K, Matsui K, Hatanaka A *et al.*, 1993. A female gamete-characteristic (3Z,6Z,9Z)- dodecatrienoic acid from *Analipus japonicus*. Phytochemistry, 33: 1039—1042
- Lüning K, Neushul M, 1978. Light and temperature demands for growth and reproduction of *Laminaria* gametophytes in southern and central California. Mar Biol, 45: 297—309
- Maier I, Müller D G, 1986. Sexual pheromones in algae. Biol Bull, 170: 145—175
- Müller D G, Gassmann G, Boland W *et al.*, 1981. Dictyota dichotoma (Phaeophyceae): identification of the sperm attractant. Science, 212: 1040—1041
- Müller D G, Gassmann G, Lüning K, 1979. Isolation of a spermatozoid-releasing and -attracting substance from female gametophytes of *Laminaria digitata*. Nature Lond, 279: 430—431
- Müller D G, Gassmann G, Marner F-J *et al.*, 1982. The sperm attractant of the marine brown alga *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). Science, 218: 1119—1120
- Müller D G, Jaenicke L, Donike M *et al.*, 1971. Sex attractant in a brown alga: chemical structure. Science, 171: 815—817
- Provasoli L, 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe A, Hattori A ed. Cultures and collection of algae proceedings of the U.S.-Japan conference. Hakonc, Japanese Society of Plant Physiology, 63—75
- Sheffield E, Bell P R, 1987. Current studies of the pteridophyte life cycle. Botanical Review, 53: 442—490
- Wu Chaoyuan, Li Dapeng, Liu Haihang *et al.*, 2004. Mass culture of *Undaria* gametophyte clones and their use in sporeling culture. Hydrobiologia, 512(1): 153—156
- Zhang Xu, Li Dapeng, Zhang Yiping *et al.*, 2002. Comparison of photobioreactors for cultivation of *Undaria pinnatifida* gametophytes. Biotechnology Letters, 24: 1499—1503

THE ROLES OF SPERM ATTRACTANTS IN *UNDARIA PINNATIFIDA* DURING ITS SEXUAL REPRODUCTION AND THE ENVIRONMENTAL FACTORS CAUSING ITS SECRETION

LI Da-Peng¹, LI Wen-Ru^{1,2}, DENG Hai-Lin³, DU Xian-Ming⁴

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 3. College of Food Science, Fujian Agricultural & Forestry University, Fuzhou, 350002; 4. China Inspection and Quarantine of Linyi, Linyi, 276034)

Abstract The roles of male-gametophytes in *Undaria pinnatifida* during its sexual reproduction were studied. The results showed that eggs were able to secrete different kinds of volatile organic substances. And these substances were found able to stimulate the spermatophore to release sperms, as well as to lead sperms swimming toward the eggs to accomplish fertilization. In this study, several environmental factors causing secretion of sperm attractants were also discovered. These factors included: cultivation time, temperature, light irradiance and photoperiod. The results showed that the activation of sperm attractants are at the highest when the female gametophytes developed for 6 to 8 days. The optimal environmental conditions for sperm attractants secretion were found at temperature 19 °C, photoperiod L : D = 12h : 12h, light irradiance 40—160 μmol/(m²·s).

Key words *Undaria pinnatifida*, Sperm attractants, Sexual reproduction