

高温对珍贵绢丝昆虫——天蚕卵巢生长发育的影响

叶恭银¹, 胡 萃¹, 龚 和²

(1. 浙江大学植保系, 杭州 310029; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要: 结果表明, 高温对天蚕 (*Antheraea yamamai*) 卵巢生长发育有明显的影。3、4 龄幼虫卵巢生长发育在 20~29℃ 范围内随温度提高而加快, 32℃ 下则略有下降; 5 龄幼虫卵巢生长发育在 29℃ 和 32℃ 下明显受阻。在茧蛹期, 若在刚结茧或化蛹第 1 天即经受 32℃ 高温处理, 卵巢大小及其可溶性蛋白含量多明显小于或低于 26℃, 即其卵巢生长发育明显受阻; 而在化蛹第 6 天开始受 32℃ 高温处理, 结果则似反之。正因为如此, 在天蚕制种前, 建议 3~4 龄和 5 龄幼虫饲养温度各以 26~29℃ 和 20~23℃ 为宜; 结茧至化蛹初期茧蛹保护温度则以 26℃ 为适。此外还测定了 32℃ 高温对卵巢中 DNA 和 RNA 含量的影响。

关键词: 天蚕; 卵巢; 生长发育; 高温

Effect of high temperature on ovarian growth and development in the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae), a precious silkworm

YE Gong-Yin¹, HU Cui¹, GONG He² (1. Department of Plant Protection, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080, China)

Abstract: The result of this study indicated that the effect of high temperature on ovarian growth and development was marked in the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*. Ovarian growth and development in the 3rd and 4th instar larvae increased with an increase of temperature ranging from 20℃ to 29℃, and slightly decreased at 32℃. Whilst it was significantly blocked in the 5th instar larvae at 29℃ and 32℃. As mature larvae or pupae were exposed to 32℃ since the beginning of cocooning or 1st day after pupation, ovarian growth and development was markedly arrested. Both ovarian size and content of soluble protein in ovaries were smaller and lower than those of mature larvae and pupae reared at 26℃, and conversely as exposed to 32℃ since 6th day after pupation. In light of these results, it is suggested that the proper temperature for rearing 3rd~4th and 5th instar larvae which were prepared for egg-raising were 26~29℃ and 20~23℃, respectively, and for protecting mature larvae or earlier pupae in cocoons was 26℃. In addition, effect of high temperature on contents of DNA and RNA in ovaries was studied.

Key words: *Antheraea yamamai*; ovary; growth and development; high temperature

文章编号: 1000-0933(2000)03-0490-05 中图分类号: Q958, Q968 文献标识码: A

温度是影响昆虫生长发育和繁殖的重要环境因子, 至今就其对昆虫生长发育的影响及两者间相互关系的数学模型方面业已做了许多研究^[1~3], 而对繁殖的影响方面研究大多仅限于对产卵量、产卵速率影响的考查^[3~6], 相对较少涉及对交尾、产卵前期雌性内生殖器官生长发育影响的探讨。其实温度对产卵量和产卵速率的影响仅是对内生殖器官生长发育作用结果的最终表现。至今已证实温度对蓖麻蚕

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 39300018)和浙江省自然科学基金资助项目

收稿日期: 1999-01-05 修回日期: 1999-01-23

作者简介: 叶恭银(1966~), 男, 副教授

(*Philosamia cynthia ricini*)^[7]、黄猩猩果蝇(*Drosophila melanogaster*)ecd-1 品系^[8]、印度谷螟(*Plodia interpunctella*)和粉斑螟(*Cadra cautella*)^[9]以及桑蚕(*Bombyx mori*)^[10]的卵巢发育或卵子发生具有明显的影响,其中高温常表现有明显的抑制作用,甚至引起不育。天蚕(*Antheraea yamamai*)是一种珍贵绢丝昆虫,因其丝质明显优于桑蚕和柞蚕(*A. pernyi*)而深受人们青睐,颇具开发利用潜力。然而目前天蚕制种较为困难,似已成为规模化生产的关键限制因子之一,其中主要原因可能就在于天蚕内生殖器官发育、交尾、产卵等对环境温度要求较高。为此,近年作者就这方面作了较系统的研究。本文报道温度对天蚕卵巢生长发育的影响。

1 材料和方法

1.1 蚕卵的孵化 将保存于冰箱(0~4℃)内的越冬天蚕蚕卵于4月上旬取出,先以3%甲醛溶液消毒卵面1h,尔后用自来水冲洗1h,再置25℃恒温下晾干,待其孵化。

1.2 幼虫期温度处理 将初孵幼虫分别置20、23、26、29、32℃5种恒温下饲育。1、2龄幼虫喂饲白栎(*Quercus fabri*)嫩叶,以500ml装玻璃果酱瓶群育(10头/瓶);3龄初开始喂以成熟鲜叶,并以果酱瓶单头饲育。自3龄初开始定时从各恒温下取幼虫,逐一解剖,每次测定5头幼虫卵巢的长、短径;分析卵巢大小增长速率与温度间关系。

1.3 茧蛹期温度处理 正式试验前,各龄幼虫或茧蛹在室温下饲育或保护,室内日均温22.4±4.7℃。试验1 将室温下饲育得且刚结茧的老熟幼虫分别置26、32℃下持续保护,之后定时解剖考查各温度下雌幼虫卵巢鲜重和大小,每次考查5头幼虫。同时将解剖所得卵巢单个置Eppendorf管中,于-25℃冰箱内保存,供可溶性蛋白总含量测定之用。试验2 将室温下保护的化蛹第1天的雌蛹分别置26、32℃下持续保护,此后定时解剖考查各温度下卵巢鲜重、卵巢管基端卵室大小,每次考查5头蛹。同时按试验1的方法保存解剖所得样品,供可溶性蛋白总含量和核酸含量测定之用。试验3 将室温下保护的化蛹第6天的雌蛹分别置26、32℃下持续保护,其他方法同试验2。

1.4 可溶性蛋白含量的测定 先将各处理各时间解剖所得单个卵巢与其鲜重5倍的0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.4)混合匀浆,再低速离心5min,取出上清液供测定。测定方法参照Bardford(1974)^[11],即采用考马斯亮兰G-250显色法在595nm处测定吸收光值。Bardford试剂配制为100mg考马斯亮兰G-250溶于50ml 95%乙醇,再加入100ml 85%(W/V)磷酸,重蒸馏水定容至1000ml。以牛血清蛋白作标准曲线。

1.5 核酸的提取与测定 参照戴玉锦等^[12],采用Schmidt-Thannhause-Schneider法分离提取单个卵巢中DNA和RNA,然后采用紫外吸收法分别测定DNA和RNA含量。

2 结果

2.1 对幼虫期卵巢生长发育的影响

结果如表1和图1。幼虫期卵巢位于第5腹节背血管两侧,左右成对,系略呈圆三角形腺体。温度对其生长发育的影响是明显的。3、4龄幼虫卵巢长、短径一般随饲育温度上升而增长,至32℃下略有下降;5龄则不同,20~23℃范围内通常呈增长趋势,26~29℃范围内则反之,32℃下5龄幼虫不能生存而全部死亡。单位时间内卵巢长径平均增长速率[(龄末长径-龄初长径)/历期],在3、4龄,20~26℃范围内呈增长趋势,26~32℃间则反之;5龄期则随温度上升而下降。

2.2 对结茧期卵巢生长发育的影响

结果如表2。结茧期卵巢仍呈略呈圆三角形,32℃高温持续处理后其生长发育明显受阻。其卵巢平均鲜重及大小均明显轻于和小于26℃下的相应值;卵巢中可溶性蛋白总含量极显著低于26℃。

2.3 对蛹期和成虫期卵巢生长发育的影响

2.3.1 对卵巢鲜重与卵室大小的影响 蛹期和成虫期卵巢左右成对,各由4根卵巢管组成。32℃高温对卵巢生长发育的影响与龄期有关(表3)。化蛹第1天即开始受高温持续处理,其卵巢鲜重、基端卵室大小均小于

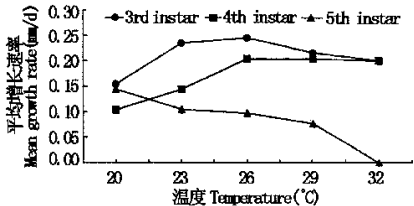


图1 高温对幼虫期卵巢长径平均增长速率的影响
Fig.1 Effect of temperature on mean growth rate of ovarian long diameter at larval stage

26℃;而在化蛹第6天开始处理,则结果似相反(表3)。

表 1 温度对幼虫期卵巢生长发育的影响

Table 1 Effect of temperature on ovarian growth and development at larval stage(mm)						
虫龄	考查日龄	长径 Long diam. $\bar{x}\pm S. D.$				
Instar	Checked day age	20℃	23℃	26℃	29℃	32℃
3 龄 3rd instar	第 1 天 a	0.57±0.00	0.59±0.01	0.69±0.02	0.70±0.01	0.67±0.05
	龄末 b	0.70±0.01	0.63±0.0	0.71±0.01	0.71±0.01	0.71±0.0
4 龄 4th instar	第 1 天 a	0.71±0.0	0.79±0.06	0.78±0.04	0.77±0.16	0.65±0.03
	龄末 b	0.71±0.0	0.82±0.03	0.84±0.02	0.86±0.03	0.86±0.0
5 龄 5th instar	第 1 天 a	0.71±0.0	1.07±0.05	0.95±0.04	0.92±0.02	D
	第 4 天 c	1.21±0.04	0.98±0.15	0.96±0.07	1.00±0.08	D
	第 8 天 d	1.14±0.0	1.35±0.06	1.20±0.04	1.09±0.05	D
	第 12 天 e	1.23±0.02	1.35±0.05	1.11±0.02	0.86±0.06	D
虫龄	考查日龄	短径 Short diam. $\bar{x}\pm S. D.$				
Instar	Checked day age	20℃	23℃	26℃	29℃	32℃
3 龄 3rd instar	第 1 天 a	0.47±0.02	0.55±0.01	0.57±0.01	0.54±0.03	0.55±0.01
	龄末 b	0.57±0.0	0.57±0.0	0.58±0.01	0.57±0.0	0.58±0.0
4 龄 4th instar	第 1 天 a	0.57±0.0	0.63±0.03	0.61±0.03	0.58±0.02	0.55±0.01
	龄末 b	0.57±0.0	0.69±0.02	0.66±0.03	0.63±0.03	0.71±0.0
5 龄 5th instar	第 1 天 a	0.63±0.0	0.88±0.05	0.67±0.03	0.70±0.02	D
	第 4 天 c	0.93±0.04	0.83±0.10	0.77±0.04	0.83±0.04	D
	第 8 天 d	0.86±0.0	1.18±0.04	0.94±0.02	0.92±0.05	D
	第 12 天 e	1.05±0.07	1.04±0.03	0.91±0.02	0.71±0.07	D

D 表示幼虫全部死亡 D represents that all larvae are dead;a;1st day;b;last day;c;4th day;d;8th day;e;12th day

表 2 刚结茧即开始 32℃高温处理对结茧期卵巢生长发育的影响

Table 2 Effect of high temperature(32℃)treated since the beginning of cocooning on ovarian growth and development at cocooning stage				
考查日龄	温度(℃)	卵巢鲜重(mg)	卵巢大小(mm)	可溶性蛋白含量(mg/g)
Checked day age	Temperature	Ovarian wet weight	The size of ovarian sac(Long×short diam. $\bar{x}\pm S. D.$	Content of soluble protein $\bar{x}\pm S. D.$
1	26	4.1	1.31±0.19×1.00±0.02	10.83±0.39aA
	32	3.1	1.06±0.06×0.97±0.03	6.05±0.12bB
4	26	4.4	1.40±0.03×1.16±0.05	11.49±1.23aA
	32	3.3	1.12±0.05×1.02±0.02	2.45±1.11bB
8	26	5.6	1.51±0.07×1.20±0.04	22.67±0.00aA
	32	3.6	1.20±0.04×1.03±0.08	4.29±0.89bB

表中仅对同一日龄 26℃和 32℃下卵巢中可溶性蛋白含量作 *t*-测验,具相同大小写字母的间差异分别未达极显著(*P*_{0.01})和显著(*P*_{0.05})水平。图 2 与此相同。 In the table,only contents of soluble protein in the ovary between 26℃ and 32℃ at the same daily age were compared by *t*-test,and the data with the same capital or small character were not significant at *P*_{0.01} and *P*_{0.05}. Similarly in here after Fig. 2.

2.3.2 对卵巢中可溶性蛋白含量的影响 结果如图 2。32℃高温对卵巢中可溶性蛋白含量的影响同样与处理时蛹日龄有关。数据 蛹第 1 天开始即受高温持续处理,可溶性蛋白含量在化蛹第 8 天后开始显低于 26℃。而在化蛹第 6 天开始处理,蛹期结果则恰相反,而成虫期则以 26℃显著为高。

表 3 高温对蛹期卵巢鲜重及其卵室大小的影响
Table 3 Effect of high temperature(32℃)on the wet weight of ovary and the size of terminal egg-chamber closest to the oviduct at pupal stage

开始处理时间 Treated beginning time	考查日龄 Checked day age	平均鲜重(mg) Average wet weight		基端卵室长×短径(mm) Long×short diam. of terminal egg-chamber $\bar{x}\pm S. D.$	
		26℃	32℃	26℃	32℃
化蛹第 1 天 1st day after pupation	4	2.90	2.40	—	—
	8	93.33	86.67	—	—
	12	754.10	359.55	2.69±0.05×2.41±0.08	1.63±0.35×1.43±0.35
	16	1053.03	588.87	3.35±0.26×2.93±0.13	2.79±0.17×2.51±0.24
化蛹第 6 天 6th day after pupation	10	116.45	210.40	1.18±0.26×0.85±0.17	1.20±0.17×1.09±0.11
	14	426.27	738.45	1.67±0.44×1.50±0.45	3.03±0.02×2.73±0.08
	18	572.90	910.60	2.08±0.29×1.89±0.27	3.05±0.13×245±0.26

2.3.3 对卵巢中 DNA 和 RNA 含量的影响

32℃高温对卵巢中 DNA 和 RNA 含量的影响同样也与处理时蛹日龄有关(表 4)。化蛹第 1 天即开始受高温处理,卵巢中 DNA 含量均极显著高于 26℃,而 RNA 则反之;当化蛹第 6 天开始高温处理时,DNA 和 RNA 含量多显著或极显著低于 26℃。

3 讨论

本文结果表明,天蚕卵巢生长发育对温度要求严格,其对温度的敏感性因蚕体发育阶段而异。在幼虫期 3、4 龄幼虫卵巢生长发育在 20~29℃范围内随温度提高而加快,至 32℃则略有下降;5 龄幼虫卵巢生长发育对温度尤为敏感,29℃、32℃高温均阻止其生长发育。在茧蛹期,若在刚结茧或化蛹第 1 天即受 32℃高温处理,卵巢大小、卵巢中可溶性蛋白含量多明显减小或下降,即其生长发育受阻;在化蛹第 6 天开始受 32℃高温处理,蛹期结果则与之相反,即似有促进作用;但若仅从成虫期卵巢可溶性蛋白含量来看 32℃高温对成虫卵巢发育也是不利的。总的看来天蚕卵巢生长发育对高温敏感的时期主要是 5 龄幼虫期至化蛹后第 1 天之间。就高温阻止卵巢生长发育的结论而言,这与高温对蓖麻蚕^[7]、黄猩猩果蝇 *ecd-1* 品系^[8]、印度谷螟和粉斑螟^[9]以及桑蚕^[10]卵巢发育或卵子发生影响研究中所得出结论基本一致。正因为如此,在天蚕制种前的幼虫饲育和茧蛹保护时,务须严格注意温度调控防止高温冲击,其中 3~4 龄和 5 龄幼虫期各以 26~29℃和 20~23℃为宜,结茧期和蛹初期以 26℃为适。

高温阻止昆虫卵巢发育可能与其阻止昆虫卵黄发生有关,这点在黄猩猩果蝇 *ecd-1* 品系中也已得到证实,该果蝇在卵巢发育早期受 29℃高温冲击后,卵巢对卵黄原蛋白(Vg)的摄取显著受阻^[8]。这在天蚕研究中也得到了证实,在刚结茧或化蛹第 1 天即开始经受 32℃高温处理,Vg 合成、运转或摄取均受不同程度的抑制,其中 Vg 摄取受阻最为明显。高温时这种作用的真正内因可能是扰乱了体内内分泌调控,如黄猩猩果蝇 *ecd-1* 品系自 20℃移置 29℃后,体内蜕皮激素表现缺乏^[18]。天蚕可能也是如此,其结果尚待验证。

高温对卵巢中 DNA 和 RNA 含量的影响,涉及到 DNA 本身复制,DNA 转录成 RNA,RNA 翻译成蛋白质等相当复杂的系列过程。本文结果表明,在化蛹第 1 天即开始受 32℃高温冲击时,32℃下卵巢中 DNA 含量多高于 26℃,而 RNA 含量则反之,这可能反映了高温阻止了卵巢 DNA 转录成 RNA,从而 RNA 翻译成蛋白质相对^{万方数据}发育减缓;在化蛹第 6 天开始处理时,32℃时卵巢中 DNA、RNA 含量大多均低于 26℃,即可能反映了高温促使了 DNA 转录成 RNA 和 RNA 翻译成蛋白质过程,从而一定程度上加快了卵巢发育。

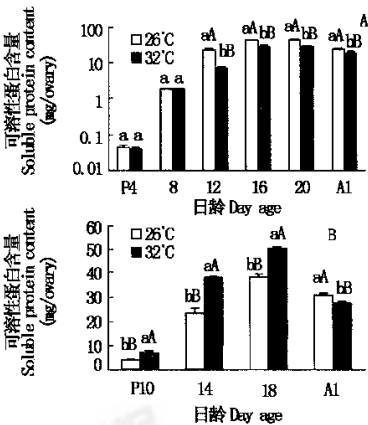


图 2 高温对蛹期和成虫期卵巢中可溶性蛋白含量的影响
Fig. 2 Effect of high temperature on the content of soluble protein in the ovary at pupal and adult stage
A. 化蛹第 1 天开始处理 Treated since 1st day after pupation; B. 化蛹第 6 天开始处理 Treated since 6th day after pupation

但要真正说明这些问题尚需就高温对基因复制、转录、表达各层次的影响做深入的研究。

表 4 高温对蛹期和成虫期卵巢中 DNA 和 RNA 含量的影响

Table 4 Effect of high temperature on contents of DNA and RNA in the ovary at pupal and adult stage					
开始处理时间 Treated beginning time	考查日龄 Checked day age	DNA(mg/g) $\bar{x}\pm S. D.$		RNA(mg/g) $\bar{x}\pm S. D.$	
		26 C	32 C	26 C	32 C
化蛹第 1 天 1st day after pupation	P4	0.1325 \pm 0.0025 bB	0.1775 \pm 0.0238 aA	0.2115 \pm 0.0052 aA	0.1974 \pm 0.0047 bB
	8	0.2556 \pm 0.0344 bB	0.2881 \pm 0.0044 aA	0.7495 \pm 0.0068 aA	0.4583 \pm 0.0177 bB
	12	0.1650 \pm 0.0013 bB	0.2575 \pm 0.0238 aA	0.7828 \pm 0.0432 aA	0.4323 \pm 0.0094 bB
	16	0.1188 \pm 0.0050 bB	0.1981 \pm 0.0044 aA	0.7891 \pm 0.0068 aA	0.5380 \pm 0.0078bB
	20	0.2113 \pm 0.0013 bB	0.3350 \pm 0.0900 aA	0.8432 \pm 0.0112 aA	0.6776 \pm 0.0161 bB
化蛹第 6 天 6th day after pupation	A1	0.1819 \pm 0.0131 bB	0.2850 \pm 0.0025 aA	0.6958 \pm 0.0333 aA	0.4807 \pm 0.0224 bB
	10	0.2719 \pm 0.0031 aA	0.2313 \pm 0.0000 bA	0.6719 \pm 0.0104 aA	0.5979 \pm 0.0104 bB
	14	0.3188 \pm 0.0275 aA	0.2850 \pm 0.0175 bA	0.6453 \pm 0.0141 aA	0.4281 \pm 0.0021 bB
	18	0.4188 \pm 0.0438 aA	0.3519 \pm 0.0356 bA	0.7650 \pm 0.0057 aA	0.2750 \pm 0.0042 bB
	A1	0.3000 \pm 0.0388 a	0.3194 \pm 0.0156 a	0.4178 \pm 0.0031 aA	0.3740 \pm 0.0 bB

表中仅对同一日龄 26 和 32 C 下卵巢中 DNA 或 RNA 含量作 *t*-测验,具相同大小写字母的间差异分别未达极显著 ($P_{0.01}$)和显著 ($P_{0.05}$)水平 In the table,only contents of DNA and RNA in the ovary between 26 C and 32 C at the same daily age were compared by *t*-test,and the data with the same capital or small character were not significant at $P_{0.01}$ and $P_{0.05}$

参考文献

[1] Ratte H T. Temperature and insect development. In: *Environmental Physiology and Biochemistry of Insects*. K. H. Hoffmann ed. Berlin Heideberg, New York: Springer-Verlag, 1984, 33~65.

[2] Wagner T L, Wu H, Sharpe P J H, *et al.* Modeling insect development rates: a literatures review and application of a biophysical model. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1984, **77**: 208~225.

[3] LIU Shusheng, ZHANG Guangmei and ZHU Jun. Influence of temperature variations on rate of development in insects: analysis of case studies from entomological literature. *Ann. Entomol. Soc. Am.* , 1995, **88**: 107~119.

[4] Greenfield M D and Karandinou M G. Fecundity and longevity of *Symanthodon pictiipes* under constant and fluctuating temperatures. *Environ Entomol*, 1976, **5**: 883~887.

[5] Henneberry T J and Butter Jr G D. Effects of high temperatures on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) reproduction, diapause and spermatocyst development. *J. Econ. Entomol.* 1986, **19**: 410~413.

[6] Mack T P and Backman C B. Effect of temperature and adult age on the oviposition rate of *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) the lesser cornstalk borer. *Environ Entomol.* , 1984, **13**: 966~969.

[7] 王幽兰. 分析高温对蓖麻蚕蛹内生殖器官发育的影响. 蓖麻蚕文集, 第二集, 中国科学院实验生物研究所. 北京: 科学出版社, 1959, 24~43.

[8] Audit-Lamour C and Busson D. Oögenesis defects in the ecd-1 mutant of *Drosophila melanogaster*, deficient in ecdysteroid at high temperature. *J. Insect Physiol.* , 1981, **27**: 829~837

[9] Lum P T M. Oöcyte degneration in *Plodia interpunctella* Hübner and *Cadra coutella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae): influence of temperature and humidity. *Environ. Entomol.* , 1983, **12**: 1539~1541.

[10] 陈 革, 潘洁玲, 甘礼珍. 高温对家蚕蛹期生殖细胞与产卵质的影响. 蚕业科学, 1986, **12**: 110~113.

[11] Bardford M M. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the prnciple of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 1976, **72**: 248~254.

[12] 戴玉锦, 李 瑞, 张裕清. 蜕皮激素与丝蛋白合成: 植源性蜕皮激素对家蚕后部丝腺核酸代谢的影响. 昆虫学报, 1985, **28**: 8~14.

[13] Garen L, Jais J and Lepasant J A. Roles of ecdysone in *Drosophila* development. *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.* , 1977, **74**: 5099~5103.