

高温对桑蚕雄蛾附腺发育 及不育性的影响

欧阳永文 吴维光
(蚕桑系)

摘要 1. 高温(上簇后34℃处理)导致附腺畸形;长度缩短;干重减轻。2. 高温引起腺体组织构造发生变化。核系统受破坏;核质不均匀;粗面内质网断裂、线粒体被破坏。3. 腺细胞中的DNA、RNA含量减轻。4. 分泌物中蛋白质及其氨基酸组成改变、含量减少。5. 高温处理时间愈长,精子活力愈弱,不受精卵率愈高。

关键词 高温;桑蚕;雄蛾附腺;不育性

Umeye^[9]最早对桑蚕(*Bombyx mori* L.)不育性进行研究。综合前人研究结果^[2,8,6,7];高温引起雄性不育的原因有(1)交配器官肌肉异常;(2)生精囊崩坏、精子囊畸形;(3)精子数目减少、活力减弱、形态异常。并指出前蛹期接触高温较后期敏感等。

但上述研究没有涉及高温对附腺及其分泌物含量的影响。仅须贝等^[5,6]肯定雄性不育与附腺分泌物有关。王幽兰^[1]从解剖学角度报导了高温对蓖麻蚕(*Attacus ricini*)蛾附腺生长发育的影响,指出蛹期高温导致附腺缩短、阻碍了分泌物的合成,但未有进行细胞学的观察及分泌物含量和组成的生化分析。本实验对高温条件下附腺生长发育、分泌作用、分泌物含量的变化与不育性关系等进行研究,探讨雄性不育的原因,以期为热带、亚热带地区桑蚕选育种提供生理学依据。

1 材料与方法

1.1 材料:

二化性蚕种7532、多化性蚕种403、137均由广东省蚕业研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 试验区的设计 试验区按一般饲育方法饲育到5龄饷食后30 h,移至F₂-sp人工气候箱中饲养、相对湿度75%~80%,光照9 h,光强1200 Lx、气流0.3 m/s。高温试验区5龄期温度为30℃,上簇后第1~6天为34℃,第7~8天34℃和25℃交替,周期12 h。第8天后25℃保护。对照区保持25℃恒温。

1.2.2 附腺外形观察和干重测定 化蛾当天,剖出附腺、量其长度,置105℃烘箱中烘干至恒重,用万分之一电子天平称量。

1.2.3 附腺组织及超微构造的观察 化蛾当天剖出附腺按常规方法制成石蜡切片,及用戊二醛-锇酸双固定液制成500Å超薄切片,分别用光学显微镜和菲力浦EM-400型电镜观察、拍照。

1992-12-22 收稿

1.2.4 附腺分泌物中蛋白质及氨基酸分析

蛋白质抽提：置化蛾当日的附腺于0.2N的NaCl冷冻液中搅烂、静置后在TGII-18A式高速冷冻离心机上离心(3500r/min)15s，取出上清液，加0.15N的NaCl液，重复离心，最后定容为5ml，置0℃下保护。

蛋白质含量测定：用三氯乙酸沉淀，沉淀物作分析样品，在UV-120-02型分光光度计上读取光密度值，作标准曲线读蛋白质含量。

蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳：每孔上样50μl，电泳后用20%碘基水杨酸固定，0.25%Coomassie亮蓝R₂₅₀染色，7%乙酸脱色。及时拍摄蛋白图谱，并在CS-930岛津双波长薄层扫描仪上扫描^[4]。

氨基酸分析：采用6N HCl水解法，将溶液置于110℃中水解20~24h，定量取出进行冷冻干燥，准确加入0.02N的HCl，使粗蛋白含量为0.15mg/ml，取样50ml在日立835-50氨基酸自动分析仪上测定各种氨基酸的含量。

1.2.5 腺细胞DNA、RNA含量测定 依改进的Schmidt-Thamse-Schneider法分离核酸，用玻璃匀浆器研磨附腺成浆，以有机溶剂处理，在日立2PR-52D型高速冷冻离心机上离心(0℃，10min，8000r/min，7228xg，倾斜转角，慢加速)，向沉淀加入0.3N KOH 5ml，在37℃水浴保温90min，加入6N HCl 0.8ml，冷却后离心(3500r/min 861xg，下同)得上清液为RNA液。再向沉淀加入10ml的5%HClO₄溶液，在80℃水浴保温30min，离心得上清液为DNA液，在UV-120-02型紫外分光光度计上测O.D.260值。

1.2.6 精子活力及不受精率的调查 将高温处理区和对照区的雄蛾分别和对照区的雌蛾交配后制种，按标准保护，调查其不受精率，并解剖观察交配后的雌蛾交配囊和受精囊内精子活力。

2 结果

2.1 高温对附腺生长发育的影响

高温区附腺呈微黄色，出现盘曲、萎缩和部份膨大等畸形；长度缩短，和对照相比，缩短率品种7532(34.79%)>137(24.42%)>403(20.95%)（表1、图版1~3）其干重减轻，减轻率呈相同趋势。（表2）。

表1 高温处理对附腺长度的影响*

品 种	7532		137		403	
	C	H	C	H	C	H
长 度 (cm)	2.93	1.91	2.51	1.90	2.96	2.34
高温区缩短率(%)	34.79		24.42		20.95	

* C为对照区 H为高温区，以下相同；表中数据为14~31个腺体平均值

表2 高温处理对附腺干重的影响*

品 种	7532		137		403	
	C	H	C	H	C	H
干 重 (mg/个)	19.63	11.63	17.27	11.43	17.00	11.85
高温区减轻率(%)	40.76		33.81		30.32	

* 表中数据为13~20个腺体的平均值

2.2 高温对附腺组织及其超微结构的影响

对照区腺细胞核近圆形、核质均匀、细胞质有发达的环状粗面内质网和分泌颗粒。高

温区腺细胞层变薄, 细胞质极不均匀, 核系统受破坏, 细胞质中粗面内质网断裂呈半月状、义状等异常状态, 线粒体被破坏而剩下残体, 溶酶体出现。(图版 4, 5, 6, 7)。

2.3 高温对附腺分泌物蛋白质、氨基酸的影响

2.3.1 蛋白质含量的变化 高温区各品种附腺的蛋白质含量均相应减轻, 减轻率为 23.72%~65.82%, 其中品种 7532>137>403。见(表 3)。

表 3 高温对附腺蛋白质含量的影响*

品种	7532		137		403	
	C	H	C	H	C	H
蛋白质含量 (mg/个)	0.3297	0.1127	0.2000	0.1053	0.0993	0.0757
高温区减轻率 (%)	65.82		47.33		23.72	

* 表中数据为 41~137 个附腺分泌物测定的平均值

2.3.2 蛋白质电泳分析结果 从图 1~2 所示, 高温区和对照区相比, 7532 种多出了 1 条蛋白带, 而少了 3 条蛋白带、137, 403 种同样多了某些蛋白带、而又多出 3 到 4 条蛋白带, 变化颇为相似。(图 1, 图 2)。

2.3.3 高温对蛋白质中氨基酸含量的影响 高温区附腺分泌物中的各种氨基酸含量都减轻, 减轻率从 11.56%~60.80%, 减轻率因品种不同而异, 以 7532>137>403。氨基酸的摩尔组成发生改变(表 4~5)。

2.4 高温对 DNA, RNA 含量的影响

高温区附腺 DNA 含量减轻, 减轻率 137 种为 20.55% > 7532 (18.23%) > 403 (9.54%)。RNA 含量减轻率则 7532 为 39.56% > 137 (38.49%) > 403 (35.01%), (表 6)。

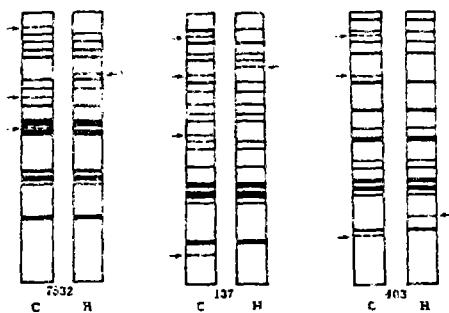


图 1 附腺分泌物蛋白质电泳图谱

表 6 高温对附腺 DNA、RNA 含量 (μg/个腺体) 的影响

品种	7532			137			403		
	C	H	H 减轻率 (%)	C	H	H 减轻率 (%)	C	H	H 减轻率 (%)
DNA	4.097	3.350	18.23	2.92	2.32	20.55	2.658	3.309	9.54
RNA	26.63	16.10	39.56	14.68	9.03	38.49	21.45	13.94	35.01

2.5 精子活力和不受精率的调查

2.5.1 精子活力: 高温处理 1~2 天, 交配后的雌蛾交配囊中所有精子均呈活泼运动, 未见受影响, 但处理 4 天以上, 不运动的精子量增多、处理 7 天, 没有运动的精子。高温处理超过两天, 在雌蛾受精囊中运动的精子数量减少, 处理 4~5 天, 只见有个别不活动的精子, 处理 6 天以上, 无精子出现。(表 7)

表 4 对照区与高温区氨基酸含量及其比较

氨基酸种类	处理	氨基酸含量(μg/100g)	对照区		7532		137		403	
			C	H	重量减轻率(%)	C	H	重量减轻率(%)	C	H
天门冬氨酸 Asp		39.02	20.07	48.56	34.58	26.27	24.03	20.44	15.61	23.63
苏氨酸 Thr		17.81	7.63	53.62	15.18	10.52	30.69	8.12	6.14	24.38
丝氨酸 Ser		17.42	8.28	52.47	15.46	11.22	27.43	8.62	6.44	25.29
谷氨酸 Glu		47.75	20.70	56.65	39.36	27.07	31.22	23.61	17.27	26.85
甘氨酸 Gly		30.66	12.53	59.13	20.51	14.39	29.84	12.71	11.24	11.56
丙氨酸 Ala		27.30	10.68	60.88	21.96	16.13	26.55	11.52	8.76	23.96
缬氨酸 Val		16.15	6.68	58.64	13.29	9.57	27.84	7.30	5.69	22.05
蛋氨酸 Met		8.65	3.98	53.99	6.17	4.23	31.44	3.46	2.88	16.76
异亮氨酸 Ile		20.04	9.19	54.14	15.32	10.89	28.92	10.03	7.32	27.02
亮氨酸 Leu		29.08	13.12	54.88	22.63	15.78	30.27	13.98	10.59	24.25
酪氨酸 Tyr		12.83	5.68	55.73	12.57	8.08	35.72	6.41	5.17	19.34
苯丙氨酸 Phe		16.69	7.59	54.52	12.11	8.26	46.61	7.84	5.90	24.74
赖氨酸 Lys		33.91	14.84	56.24	26.57	18.32	31.05	16.01	11.95	25.36
组氨酸 His		6.99	3.31	55.51	6.60	4.52	31.52	3.48	2.64	24.14
精氨酸 Arg		21.53	10.77	49.98	18.34	12.19	33.53	12.07	9.13	24.36
脯氨酸 Pro		20.61	9.65	53.18	18.50	14.61	21.03	10.87	7.73	28.89

表5 对照区与高温区氨基酸摩尔含量及其比较

氨基酸种类	摩尔含量(nM)	对照区			137			403		
		C	H	摩尔减少量(nM/100)	C	H	摩尔减少量(nM/100)	C	H	摩尔减少量(nM/100)
天门冬氨酸 Asp	0.293 4	0.150 9	14.25	0.260 0	0.197 5	6.25	0.153 9	0.117 4	3.63	
苏氨酸 Thr	0.149 9	0.064 1	8.56	0.127 5	0.088 4	3.91	0.063 8	0.051 6	1.67	
丝氨酸 Ser	0.165 9	0.078 8	8.71	0.147 2	0.106 8	4.04	0.082 1	0.061 4	2.07	
谷氨酰胺 Glu	0.324 8	0.140 8	18.40	0.267 7	0.184 1	8.36	0.160 6	0.117 5	4.31	
甘氨酸 Gly	0.408 8	0.167 1	24.17	0.273 5	0.191 9	8.16	0.169 4	0.149 9	1.95	
丙氨酸 Ala	0.306 7	0.112 0	19.47	0.246 8	0.181 2	6.56	0.129 5	0.098 4	3.11	
缬氨酸 Val	0.137 8	0.057 0	8.08	0.113 4	0.081 8	3.16	0.062 3	0.048 5	1.38	
蛋氨酸 Met	0.058 0	0.026 7	3.13	0.041 4	0.028 3	1.31	0.023 2	0.019 3	0.39	
异亮氨酸 Ile	0.152 7	0.070 0	8.27	0.116 9	0.083 0	3.39	0.076 4	0.055 8	2.06	
亮氨酸 Leu	0.221 7	0.100 0	12.17	0.172 4	0.120 3	5.21	0.106 5	0.080 7	2.58	
酪氨酸 Tyr	0.070 8	0.031 4	3.94	0.069 3	0.044 6	2.47	0.035 4	0.028 5	0.69	
苯丙氨酸 Phe	0.101 0	0.045 9	5.51	0.073 3	0.050 0	2.33	0.047 4	0.035 7	1.17	
赖氨酸 Lys	0.231 9	0.101 5	13.04	0.181 7	0.125 3	5.64	0.109 5	0.081 7	2.78	
组氨酸 His	0.045 0	0.021 3	2.37	0.042 5	0.029 1	1.34	0.022 4	0.017 0	2.73	
精氨酸 Arg	0.123 6	0.061 8	6.18	0.105 2	0.070 0	3.52	0.069 3	0.052 4	0.54	
脯氨酸 Pro	0.179 2	0.083 9	9.53	0.160 8	0.127 1	3.37	0.094 5	0.067 2	1.69	

表7 高温处理对精子活力的影响*

处理	对照	高温处理(天数)							
		1	2	3	4	5	6	7	
交配囊	运动的精子量	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-
	不运动的精子量	-	-	-	+	++	+++	+++	++++
受精囊	运动的精子量	++++	++++	+++	++	+	+	-	-
	不运动的精子量	-	-	+	++	+	+	-	-

* “+”表示精子的数量 “-”表示无精子

2.5.2 不受精率调查 如表8~9所示,二化性种7532上簇后高温处理3天,不受精率为14.66%、处理4天,即急剧上升至48.29%,5天后不受精率达90%以上(表8)。多化性种137上簇后高温处理4天,不受精率为16.36%,处理5天,上升为40.74%,6天后,不受精率超过80%(表9)。因此,在生产上7532蛹前期接触34℃高温,不能超过2天,137不能超过3天。

3 讨论与结论

3.1 高温抑制了附腺正常的生长发育,导致腺体畸形;长度缩短;干重减轻。其被抑制程度以二化性种7532>多化性种137和403。

3.2 电镜观察显示高温使腺细胞质中的粗面内质网、线粒体等受到破坏。由于粗面内质网是合成蛋白质的场所,线粒体是供能的细胞器,它们的被破坏,附腺分泌物中的蛋白质合成也必然受到影响,正是表3所示高温导致蛋白质含量减少的细胞学原因。

3.3 氨基酸含量、摩尔组成的变化直接反映蛋白质含量的变化。实验结果组成蛋白质的各种氨基酸含量减少,因而蛋白质总的含量减少。氨基酸摩尔组成发生改变,各种氨基酸的改变不一,可能导致蛋白质种类出现异同,蛋白质电泳图谱的差异,反映出这种变化。

3.4 高温影响附腺核酸的代谢,进一步阐明附腺分泌物蛋白质含量及其种类改变的原因。DNA、RNA与蛋白质合成的关系密切,DNA把遗传信息转录到mRNA,mRNA在tRNA、rRNA等协同配合下,指导蛋白质的翻译,高温使

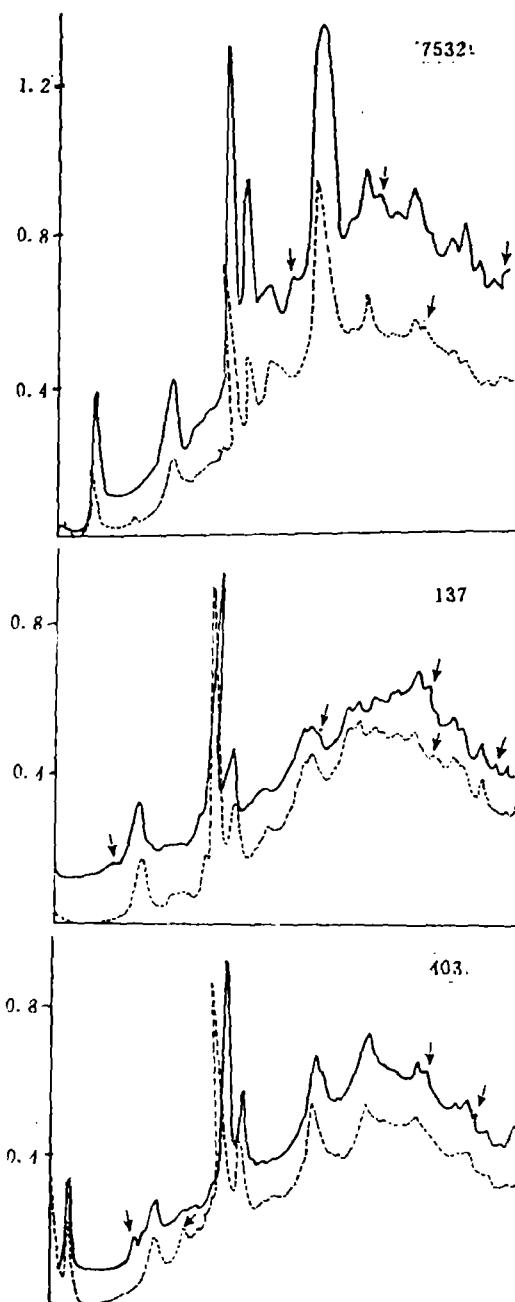


图2 附腺分泌物蛋白质电泳图谱扫描图

——对照区 高温区

DNA、RNA 含量变化, 就可能引起蛋白质含量及其种类发生改变。

3.5 关于附腺分泌物与精子活力的关系, 据 Kasuga 等研究^[3], 精子在成熟和活动时, 需要消耗蛋白质、糖原等物质。高温使附腺分泌物中蛋白质含量减少, 使精子活化、成熟以及活动所需的营养物质减少, 因而精子的活力受到影响, 从而使受精率降低, 间接引起雄性不育。

表 8 高温处理对 7532 不受精率的影响

处理	对照	高 温 处 理 (天)					
		1	2	3	4	5	6
调查卵总数 (粒)	2 939	2 767	2 496	3 828	1 837	770	877
不受精卵 (粒)	50	38	19	561	887	750	852
不受精率 (%)	1.70	1.37	0.76	14.66	48.29	97.40	97.15

表 9 高温处理对 137 不受精率的影响

处理	对照	高 温 处 理 (天)					
		1	2	3	4	5	6
调查卵总数 (粒)	3 882	5 825	6 396	5 425	3 477	2 364	978
不受精卵 (粒)	116	157	250	326	568	963	813
不受精率 (%)	3.24	2.69	3.91	6.01	16.36	40.74	83.13

3.7 综合上述, 高温引起雄性不育, 可图解如下

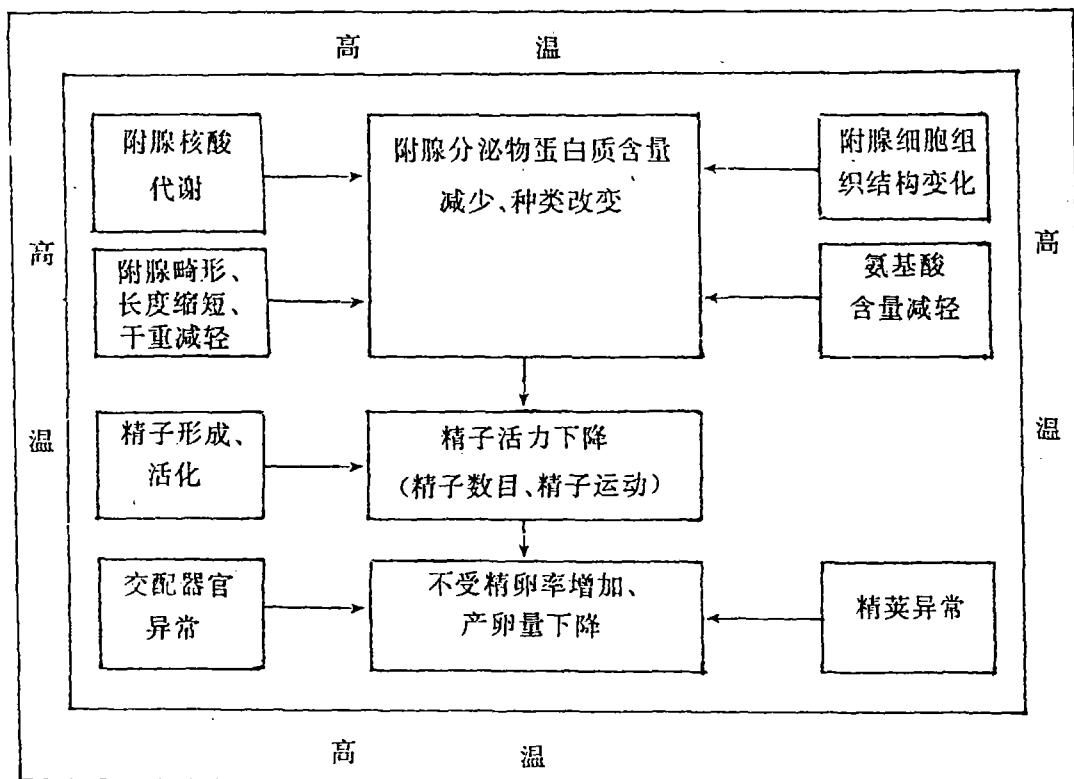


图 3 高温引起雄性不育图

致谢 本文为欧阳永文硕士论文的一部分, 蒙中山大学利翠英教授、华南农业大学张维球教授审阅, 黄振邦、章潜才工程师协助拍摄照片, 一并致谢。

参 考 文 献

- 1 王幽兰. 茧麻蚕文集. 北京: 科学出版社, 1959. 24~43
- 2 陈革等. 高温对家蚕蛹期生殖细胞与产卵质量的影响. 蚕业科学, 1986, 12 (2): 110~113
- 3 时连根译. 家蚕蛾精珠中的能量代谢与来源于精氨酸的丙氨酸积累关系. 蚕学通讯, 1987, 2: 37~41
- 4 张昌颖. 生物化学实验指导. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 39~45
- 5 须贝悦治等. 繁时期之高温环境と雄蚕の不妊化. 日本蚕系学杂志, 1981, 50 (1): 65~69
- 6 须贝悦治等. 家蚕にわけて蛹期の高温保护と雄性不妊の发现. 日本蚕系学杂志, 1967, 36 (6): 491~496
- 7 腾野贞哉. 家蚕にわけて蛹期高温处理との关系. 1. 雄性不妊化をもたらす感温期间. 日本应用动物学昆虫学会志, 1977, 21 (2): 85~89
- 8 McKnight G S. Colorimetric method for the determination of submicrogram quantities of protein. Analytical Biochemistry, 1977, 78: 86~92
- 9 Umeya Y. On the degeneration of the male copulatory organs of the silkworm (*Bombyx mori* L.). J Coll Agric Tokyo Imp Univ, 1926, 9: 57~84

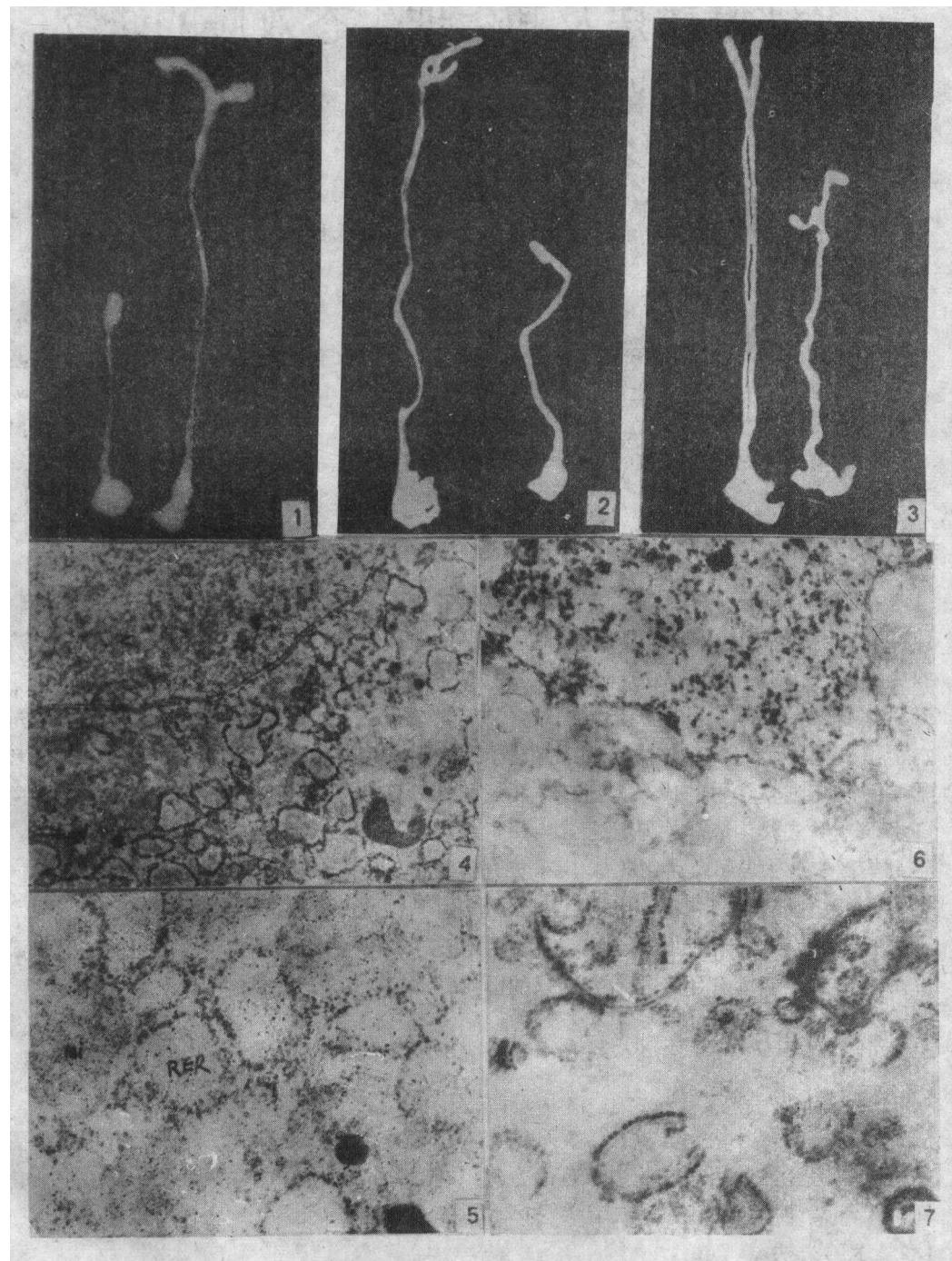
THE INFLUENCE OF HIGH TEMPERATURE ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF MALE ACCESSORY GLANDS AND THE STERILITY IN SILKWORM (*Bombyx mori* L.)

Ouyang Yongwen Wu Weiguang

(Department of Sericulture)

Abstract 1. At high temperature, (34°C after mounting) the male accessory glands showed abnormal shapes, shorter length and lighter dry weight. 2. High temperature caused changes in the histological structure, such as damaged nuclear system, nonhomogenous nucleoplasm, broken rough endoplasmic reticulum, damaged mitochondria. 3. The DNA and RNA contents decreased. 4. The compositions of protein and amino acid in the secretion were changed and their contents decreased. 5. The activity of motile sperms varied with the duration of the high temperature treatment, the longer the time, the weaker the activity and higher the percentage of unfertilized eggs.

Key Words High temperature; Silkworm (*Bombyx mori* L.); Male accessory glands; Sterility



图版 1.2.3 高温对附腺外形的影响 (同一版图中, 较长者为对照区) ($\times 2.4$)

1 为品种 7532, 2 为品种 137, 3 为品种 403

4 7532 对照基部横切 ($\times 6450$) 示细胞核核质均匀, 双层核膜清晰、胞质中发达的环状粗面内质网, 电子密度高的脂肪质颗粒

5 7532 高温区基部横切 ($\times 6450$) 示细胞核变形, 核质极不均匀, 细胞质中粗面内质网畸形

6 7532 对照基部横切 ($\times 23000$), 示发达的粗面内质网, 线粒体

7 7532 高温区基部横切 ($\times 23000$) 受破坏的粗面内质网, 线粒体, 溶酶体出现。