

桑蚕蛹期卵巢移植及其生物学效应的研究

钟仰进 吴维光

(蚕桑系)

摘要 本文报导桑蚕在蛹期进行卵巢移植试验的成功,并调查了卵巢移入雄蛹后的生物学效应。明确了血液中卵黄原蛋白向卵巢移行的时期是在蛹期。试验表明:蛹龄 2 h 的雌、雄蛹在低温抑制后进行移植为适宜;卵巢植入雄蛹后受体发育良好,羽化率达 82.5%~100%;雄蛹内卵巢能形成成熟卵,但卵大小、重量和卵内蛋白质、核酸含量以及卵超微结构发生了一些变化;用人工单性生殖方法处理雄蛹内的发育卵,得到 14.2%~16.0%的成胚率,进一步研究可望获得后代。

关键词 桑蚕;卵巢移植;生物学效应

桑蚕幼虫期的卵巢移植试验已有不少报导,梅谷与^[9~11]在异品种间进行移植,获得部分成熟卵,并证明化性等性状受受体血液的影响,福田^[13]等也通过试验注意到卵巢发育与血红蛋白有密切关系。近年有很多文献^[12,16]报导有关桑蚕幼虫期卵巢植入雄蚕及其生物学效应的研究,并根据结果解释了一些生理生化等方面的问题,并对雄体发育卵作人工单性生殖处理获得少量后代。

但幼虫期移植受体死亡率高达 70%~80%,给研究带来困难^[9,10]。梅谷与^[9,10]认为蛹期移植难以成功,一直未见有关蛹期移植的报导。本研究目的是摸索蛹期卵巢移植技术,观察卵巢植入雄蛹后的生物学效应,为今后研究提供依据,并根据试验结果,在前人研究的基础上探索血红蛋白与卵形成的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

所用蚕品种有二化原种 7532、多化原种 137、二化杂种两广一号(新九×7532)、多化杂种广农 3 号(137×秋 303)。

1.2 方法

1.2.1 卵巢移植 将雌雄蛹麻醉或低温抑制后用薄膜将供体受体固定于蜡盆,用 70%酒精作体表消毒,用消毒过的小刀、镊子等在雄蛹第 5 腹节背管一侧或两侧切开口,除去睾丸,迅速从雌蛹第 5 腹节背管一侧或两侧取出卵巢植入雄蛹内,用硫酸链霉素少许作伤口消毒,手术后置于 16℃下保护 24 h,再置于 23~26℃,相对湿度 83%~88%下观察。

在试验中,除去 2 个睾丸植入 2 个卵巢的受体记作“双移”、除去 1 个睾丸植入 1

1990-05-28 收稿

个卵巢的受体记作“单移”，不除睾丸而植入1个卵巢的受体记作“单加入”。

1.2.2 分组试验 第1组用乙醚麻醉30 min后移植，蛹龄为0 h、2 h、10 h 3个时期；第2组用1~4℃抑制6~10 h后移植，如上处理3个时期。采用“单移”方式，每个时期各移植20个（“7532”），根据上面结果选择适宜的方法和时期进行“单移”、“双移”、“单加入”的移植，观察受体发育，调查羽化率和发育卵的重量及大小。

1.2.3 电镜观察 制样参照武井等^[8]的方法，用5%戊二醛5℃下固定10日，然后用针刺破卵壳，用磷酸缓冲液冲洗，再用1%锇酸5℃下固定1日，透视电镜观察的再经冲洗、脱水、包埋、切片，用EM-400电镜观察；扫描观察的则经脱水后干燥喷金，用JSM-25S电镜观察卵表构造。

1.2.4 核酸含量测定 参照朱俭^[1]和仓田^[9,10]STS法抽提RNA、DNA。取卵500粒用5% HClO₄研磨抽提，得上清液A和B，用SP8-400紫外分光光度计测消光值，用下面能减少蛋白质影响的公式^[4]求算RNA、DNA浓度，并换算成500粒卵的核酸含量。

$$\text{核酸浓度 (mg/ml)} = 0.0629A_{260} - 0.0360A_{280}$$

1.2.5 蛋白质含量测定 参照Kamel等^[15]方法，将上清液用SP8-400紫外分光光度计测消光值，用下面能减少核酸影响的公式^[2]求算蛋白质浓度并换算成500粒卵的蛋白质含量。

$$\text{蛋白质浓度 (mg/ml)} = 1.45 OD_{280} - 0.74 OD_{260}$$

1.2.6 人工单性生殖处理 参照须贝^[12]和Yamashita等^[16]的对幼虫期移植雄体发育卵处理的方法，解剖羽化蛾取出发育卵，于25~30℃，相对湿度83%~88%下保护40 h，用46℃温水浸18 min，然后于15~20℃下保护4 d，再用比量1.075、46℃的盐酸浸5 min，在23~26℃相对湿度83%~88%下观察卵色变化，调查成胚率。

1.2.7 蛋白质电泳分离 参照张龙翔等^[2]方法，用聚丙烯酰胺凝胶板型电泳，胶浓度7.5%、电极缓冲液pH8.3、每槽电流3 mA，5%三氯醋酸-0.1%考马斯亮蓝染色2 h，7%醋酸脱色。

(1) 蛹血电泳：蛹龄5 d，取对照雄蛹、对照雌蛹、抑制雄蛹、抑制雌蛹、“双移”蛹、“单加入”蛹蛹血6个样本，每槽上样20 μl。

(2) 卵蛋白电泳：取对照卵、抑制卵、“双移”及“单加入”雄蛹内发育卵各100粒，4% NaCl洗涤后用1 ml充分研磨，4℃下过夜，第2天离心（3000 r.p.m，10 min），每槽取中层清液30 μl与蛹血同板电泳，染色后比较，并用Shimadzu CS-910双波长层析扫描仪在450 nm处扫描卵蛋白电泳带。

2 结果与分析

2.1 移植手术及手术后观察 在分组试验中，第1组3个不同蛹龄的蛹用乙醚麻醉，效果不佳，手术中蛹体蠕动大、流血多，手术难以进行，而第2组中低温抑制效果较好，蛹体活动性小，刚化蛹的进行抑制移植，由于蛹皮薄，不易固定，手术较困难，受体成活率46.7%；化蛹2 h的蛹皮厚薄适中，手术顺利，成活率达95%；化蛹10 h的由于卵巢管已游离体腔，手术无法进行，综合上面结果，蛹期卵巢移植试验以蛹龄2 h用低温抑制后进行最为适宜。

2.2 受体蛹及羽化蛾性状观察 用如上最适的方法作“双移”、“单移”、“单加入”,大部分伤口能在第2天愈合,愈合快慢与蛹体活动性有关。受体羽化蛾活动性良好,“单移”和“单加入”蛾活动正常,能追逐雌蛾并与之交配使其受精;“双移”蛾也有些能引起兴奋,但不追逐雌蛾,个别与雌蛾交配也不使其受精。

2.3 羽化率调查 蛹期作卵巢移植受体羽化率高达82.5%~100%,如表1。但不同品种羽化率有差异,羽化率也受移植方式的影响,“双移”蛹羽化率较低,其原因是伤口较大,流血较多,死亡率较高。

表1 不同家蚕品种卵巢移植受体蛹(♂)羽化率(%)

移植方式	供试蛹数 (个)	两广一号 (新九× 7532)	广农3号 (13.7× 秋303)	“7532”	“137”
“单移”蛹	40	90	100	95	90
“双移”蛹	40	100	100	92.5	82.5
“单加入”蛹	40	100	100	95	92.5
低温蛹	40	100	100	100	100
对照蛹	40	100	100	100	100

2.4 雄蛹内卵巢发育及卵子形成 解剖受体羽化蛾,可见不少卵管片段,管内可见成熟卵,同时也有一些未成熟的和畸形卵,未见到完整的卵巢。一个蛾内成熟卵数目0~145粒不等,从表2可看出,雄蛹内卵巢造卵数比雌蛹明显降低(75%~90.5%),以“双移”蛹尤为明显。

表2 “7532”移植蛹单个卵巢造卵数的变化

移植方式	供试蛹数 (个)	蛹平均造 卵数 (粒)	单个卵巢 平均造卵 数(粒)	占对照的 造卵率 (%)	下降率 (%)
“单移”蛹	40	71.2	71.2	25.0	75.0
“双移”蛹	40	54.3	27.2	9.5	95.5
“单加入”蛹	40	63.3	63.3	22.2	77.8
对照蛹(♀)	40	569.8	284.9		

2.5 雄蛹内发育卵的重量和大小都比雌体对照卵明显变小,如表3和表4。

表3 “7532”雄蛹发育卵的卵重变化

移植方式	50粒重(g)	占对照卵重百分比(%)	下降率(%)
“单加入”卵	0.0190±0.0002	80.5	19.5
“双移”卵	0.0185±0.0006	78.4	21.6
低温卵	0.0241±0.0001	102.1	(-2.1)
对照卵	0.0236±0.0002		

表4 “7523”雄蛹发育卵的卵大小变化

移植方式	长度(mm)	占对照卵长百分比(%)	下降率(%)	宽(mm)	占对照卵宽百分比(%)	下降率(%)
“单加入”卵	1.189±0.085	91.5	8.5	0.953±0.088	94.8	5.2
“双移”卵	1.155±0.105	88.9	11.1	0.942±0.099	93.7	6.3
低温卵	1.281±0.034	98.5	1.5	1.021±0.034	101.6	(-1.6)
对照卵	1.300±0.070			1.005±0.063		

2.6 超微结构的变化

2.6.1 移植卵表面构造发生了一些变化,比对照卵卵纹没那么明显,气孔明显增大,“双移”、“单加入”、对照卵气孔孔径分别是1.25 μm、0.6 μm、0.25 μm(图版1,2,3),对照卵卵孔的卵纹成二层花瓣状,而移植卵则成三层(图版10,11)。以上变化,过去未见报导。

2.6.2 用透视电镜观察可见,移植卵比对照卵,卵内结构疏松、空泡多,卵黄颗粒较少,缺少高电子密度的致密体(图版4,5,6),但卵黄颗粒形状和超微结构没有特殊变化(图版7,8,9)。

2.7 雄蛹内发育卵经人工单性生殖处理后有14.2%~16.0%的着色卵,虽未得到孵化后代,但结果说明移植卵能进行早期胚胎发育。本试验对照卵经处理也未得到孵化后代,但成胚率比移植卵为高(见表5)。

表5 “7532”移植卵人工单性生殖的成胚率

移植方式	处理卵数(个)	着色卵数(个)	成胚率(%)	下降率(%)
“单加入”	300	48.0	16	47.6
“双移”	300	42.5	14.2	53.4
对照	300	91.5	30.5	

2.8 内含物含量的变化 从表6可见,雄蛹内发育卵的RNA、DNA和蛋白质含量都明显比对照低,分别下降21.11%、54.69%和43.03%。Yamashita等^[16]作幼虫期移植测得雄体内发育卵RNA含量比对照高,但对此变化未作解释。DNA含量变化未见报导。

表6 “7532”移植卵内含物含量的变化(mg/500粒卵)

内 含 物	“单移”卵(mg)	对照卵(mg)	移植卵下降率(%)
RNA	0.3850	0.4880	21.11
DNA	0.0169	0.0373	54.69
蛋白质	11.726	20.584	43.03

2.9 蛋白电泳 在电泳带中, 卵黄原蛋白(V_g)和卵黄磷蛋白(V_{tn})的位置根据Yamashita等^[16]的R_f值来确定。

2.9.1 蛹血电泳 如图版12, 对照雌蛹②V_g带明显, 而对照雄蛹①则不明显, 表现出雌雄V_g含量的差异; 低温抑制的蛹血③④与对照无差异; 植入卵巢的受体蛹血⑤⑥与对照雄蛹比看不出差异。

2.9.2 卵蛋白电泳 如图版12, 13, 对照卵⑦和低温抑制卵⑧一样, 蛋白带至少有12条(P₁~P₁₂), 而且V_{tn}(P₁₁)带明显, 是主带。但在雄蛹内发育的卵⑨⑩V_{tn}带很不明显, 其他蛋白带移植卵和对照卵无明显差异。

比较血蛋白带和卵蛋白带, 在蛹血中找不到卵中存在的P₁和P₂的相应迁移率的蛋白带; 而在蛾血蛋白中(图版13)则可看到P₁而找不到P₂。

用层析扫描仪扫描蛋白带可见, 对照卵和低温抑制卵(图1)V_{tn}峰明显, 而雄蛹内发育卵则缺少V_{tn}峰(图2)。

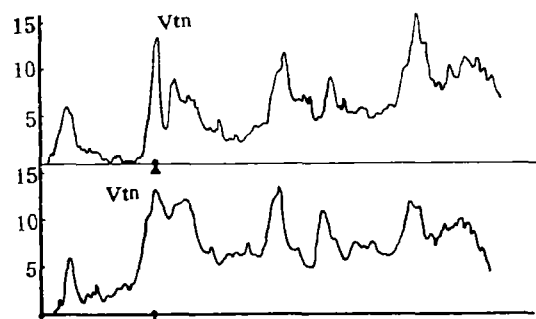
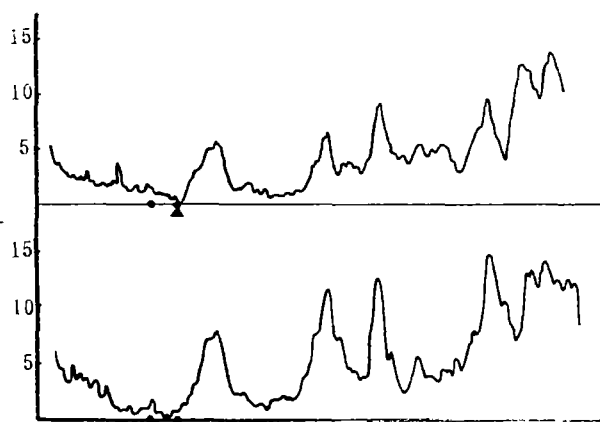


图1 “7532”对照卵(上)和低温卵(下)蛋白峰

图2 “7532”“双移”卵(上)和
“单加入”卵(下)蛋白峰

3 讨论

3.1 前人^[9,10]在幼虫期进行卵巢移植, 受体死亡率高, 并认为蛹期作卵巢移植难以成功。本试验在前人基础上摸索移植技术, 取得蛹期移植试验的成功, 并确定在蛹龄2h, 采用低温抑制(1~4℃、6~10h)后进行移植为宜, 可获得82.5~100%的羽化率。试验也发现品种、移植方式的不同对移植成功率有影响, 今后的有关试验可根据目的选用适当的品种和移植方式, 以获得较高的羽化率。蛹期卵巢移植试验所取得的成效, 为通过移植进一步研究遗传、生理、生化等问题提供了方便。

3.2 桑蚕人工单性生殖方法自A. THXOMMPOB获得6%着色卵以来, 经近百年专家学者探索取得了成功^[3,14]。幼虫期移植雄体内发育卵也可通过人工方法获得少量后

代^[12,16],但由于不同品种和化性的卵对各种条件的感受性存在差异,对工人单性生殖技术的要求也有所不同,因而需作多次试验才能摸索出供试品种进行人工单性生殖的适宜处理技术,本试验取得14.2%~16.0%的成胚率,虽未得到孵化后代,但从能进行早期胚胎发育的事实来看,预期通过逐步探索有希望获得后代,这对遗传育种和生理生化的研究具有意义。

3.3 移植后产生的生物学效应和雄体发育卵的构造及内含物的变化等结果为今后进一步的研究提供参考。

3.4 V_g 和 V_{in} 迁移率相同,说明卵 V_{in} 是卵巢吸收雌体血液 V_g 而来,雄体 V_g 含量极微^[8,16],小原等^[6]通过幼虫5龄中期卵巢植入雄体的研究,认为卵巢吸收 V_g 是5龄后期开始的。本试验在化蛹2h将卵巢植入雄蛹,分析发育卵发现缺少 V_{in} ,这说明在植入雄蛹之前卵巢没有从雌体血中吸收 V_g ,由此可认为卵巢吸收 V_g 是蛹期才开始的。

移植卵和对照卵蛋白中都可见 P_1 和 P_2 ,蛹血蛋白中不见 P_1 和 P_2 ,说明 P_1 和 P_2 是蛹后期以后合成的,蛾血蛋白中不见 P_2 ,这说明 P_2 是卵巢自身合成转入卵内的。

致谢 本文为钟仰进硕士论文一部分,蒙利翠英教授和张维球教授审查,并得到章潜才、黄振邦和钟文彪等老师帮助,广东蚕研所提供试验蚕,谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 朱俭等.生物学实验.上海:科技出版社,1981.133~136
- 2 张龙翔等.生化实验方法和技术.北京:人民教育出版社,1981.94~111
- 3 张果等.用低温刺激家蚕卵的单性生殖.见:中国科学院实验生物研究所.1959年全国胚胎学学术会议论文摘要汇集.全国胚胎学学术会议,北京,1959,北京:科学出版社,1961.57~59
- 4 薛应龙,夏镇渎.植物生理学实验手册.上海:科技出版社,1985.44~46
- 5 小原隆三.数种昆虫の体液蛋白における雌雄间差异.日本应用动物昆虫学会志,1967,11(2):71~75
- 6 小原隆三,河合孝.カイコにおける生殖巢の摘出、移植による体液蛋白質の変化.乌大农研究报,1971,23:1~7
- 7 山下兴亚,入江研.昆虫の卵形成と胚発生をよえるタンパク質.生物科学,1983,35(4):178~184
- 8 武井隆三,长岛荣一.家蚕の休眠卵並びに非休眠卵における发生初期の电子显微镜的研究.日本蚕系学杂志,1975,44:118~124
- 9 梅谷与七郎.家蚕における卵巢移植及血液移注实验とに化性的变化について.遗传学杂志,1925,3(4):155~184
- 10 梅谷与七郎.家蚕における受精结果见卵丸移植と卵巢移植について.农学会报,1926,289:503~506
- 11 梅谷与七郎.异品种間の卵巢移植及び同品种の环境を异にせる二形质間の支配による家蚕の强势について蚕业试验场的报告,1928,2(2):36~96
- 12 须贝悦治,大塚康三.家蚕によける卵巢の雌雄间移植と单为发生.日本蚕系学杂志,1987,52:57~60

- 13 福田宗一, 松本正. 生殖摘了蚕の血液屈折率について. 日本蚕系学杂志, 1960, 29: 272
- 14 Astaurov B L. Artificial Parthenogenesis and experimental polyploidy in Silkworm. J Sericult Sci Japan, 36: 277~285
- 15 Kamel M Y, et al. Biochemical studies of tick embryogenesis DAN, RAN, hemoprotein, guanosine, guanine in developing eggs of *Hyalomma dromedarii*. Insect Biochem, 1982, 12 (1): 15~23
- 16 Okitsugu Yamashita, Ken Irie. Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male hosts of the silkworm. Nature, 1980, 283: 385~386

STUDIES ON THE TRANSPLANTATION OF THE SILKWORM OVARY AT THE PUPAL STAGE AND ITS BIOLOGICAL EFFECT

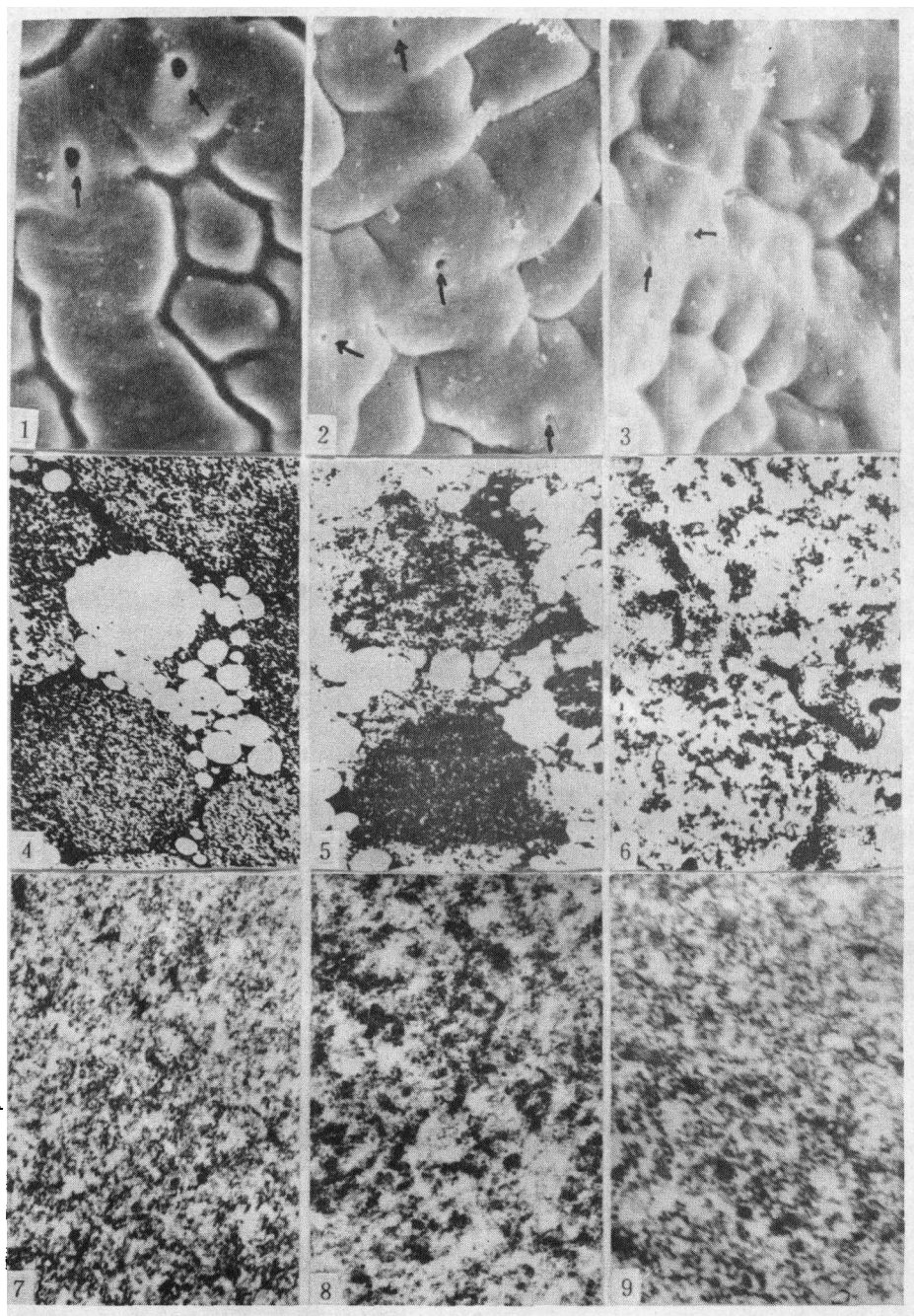
Zhong Yangjin Wu Weiguang

(Department of Sericulture)

Abstract This paper describes a successful transplantation of the silkworm at the pupal stage. The biological effect after the implantation of the ovary into the male pupa was investigated, and the period during which transference of vitellogenin to the ovary via the blood occurred was identified as the pupal stage.

The result of the experiment was as follows: for the 2-hr aged male and female pupa, it was most suitable to do the transplantation after low temperature treatment of the pupae; after the ovary was implanted into the male pupa, the recipient developed very well, the rate of emergence reaching 82.5%~100%. Mature eggs formed inside the ovary of the male pupa, though there were some changes in size, weight, protein content, nucleic acid content and ultrastructure of the eggs. After parthenogenesis treatment, 14.2%~16.8% of the eggs inside the male pupa developed into early embryos and it should be possible to have progenies if further study is conducted.

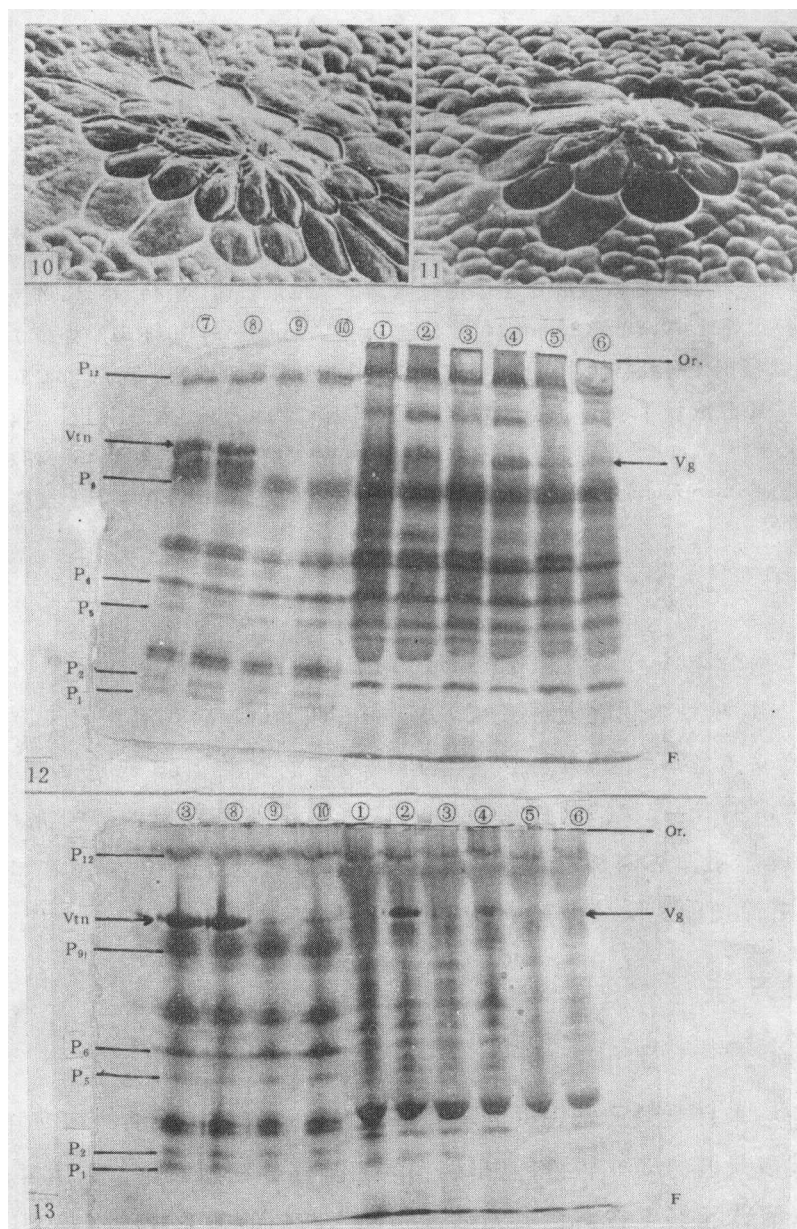
Key words Mulberry silkworm; Pupal stage; Transplantation of ovary; Developed eggs inside male pupa; Biological effect



图版 1, 2, 3 分别为“双移”、“单加入”和对照卵卵表构造 ($\times 200$), 箭头所指为气孔。

4, 5, 6 分别为“双移”、“单加入”和对照卵卵内超微结构 ($\times 325$)。

7, 8, 9 分别为“双移”、“单加入”和对照卵卵黄颗粒超微结构 ($\times 18\,000$)。



10, 11 分别为“单加入”和对照卵卵孔纹 (×500)。

12 蛹血与蚕卵电泳图。①至⑥为对照雄蛹、对照雌蛹、低温雄蛹、低温雌蛹、“双移”蛹、“单加入”蛹蛹血；⑦至⑩为对照卵、低温卵、“双移”卵、“单加入”卵；O, 原点, F 前线, P₁—P₁₂为蚕卵蛋白带。

13 蛾血与蚕卵电泳图。图标与图 12 相应。以上制作均用“7532”蚕品种。