

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.02.010

贺道, 郝丽, 余华献, 等. 家蚕雌蛹及其卵巢脂肪酸丰度分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(2): 90-100.

家蚕雌蛹及其卵巢脂肪酸丰度分析

贺道¹, 郝丽¹, 余华献³, 李修志¹, 申子刚¹, 陈萍^{1,2}

1. 西南大学 蚕桑纺织与与生物质科学学院, 重庆 400715; 2. 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715;

3. 重庆市蚕业管理总站, 重庆 400020

摘要: 研究使用气相色谱分析了家蚕雌蛹蛹体和卵巢中的脂肪酸丰度。结果显示, 蛹化后的第 1 d 至第 6 d, 蛹体脂肪酸丰度的变化幅度小, 第 6 d 至第 9 d, 蛹体脂肪酸丰度的变化幅度大。蛹化期间, 主要脂肪酸丰度总体呈下降趋势, 微量脂肪酸丰度呈上升趋势。卵巢脂肪酸丰度的变化幅度随发育递减。不同主要脂肪酸的变化幅度和方向各异, 其中不饱和脂肪酸丰度增加, 饱和脂肪酸丰度下降。微量脂肪酸丰度随发育明显下降, 这表明微量脂肪酸与雌性生殖关联较小。蛹体和卵巢脂肪酸丰度的差异随发育逐渐缩小, 至蛹化第 6 d, 卵巢中绝大部分的脂肪酸丰度与刚蛹化时有很大差异, 但整体上与蛹体丰度相似, 说明卵巢脂肪酸的积累依赖蛹体脂肪酸。蛹化后期, 卵巢中丰度最高的 α -亚麻酸出现下降, 丰度次高的油酸明显增加, 这可能与卵壳生成和卵子成熟有关; 亚油酸在蛹化第 6 d 丰度差异最大, 其在卵巢中的丰度显著增加并明显高过蛹体, 表明卵巢具有为其发育以及卵子发生积累脂肪酸的特性。研究结果可为深入研究脂肪酸在家蚕和其他昆虫雌性生殖中的作用机制提供重要线索。

关键词: 家蚕; 雌蛹; 卵巢; 脂肪酸; 丰度

中图分类号: S881.2⁺4 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2024)02-0090-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



An Analysis of the Abundance of Fatty Acids in Silkworm Female Pupa and Ovary

HE Xiao¹, HAO Li¹, YU Huaxian³,
LI Xiuzhi¹, SHEN Zigang¹, CHEN Ping^{1,2}

1. College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. State Key Laboratory of Resource Insects, Chongqing 400715, China;

3. Chongqing Sericulture Management Station, Chongqing 400020, China

Abstract: The study utilized gas chromatography analyzing the abundance of fatty acids in the bodies and o-

收稿日期: 2022-12-12

基金项目: 重庆市现代山地特色高效农业(蚕桑)产业技术体系专项(202109); 重庆市茧丝绸发展专项资金项目(20210607223136209).

作者简介: 贺道, 硕士研究生, 主要从事家蚕遗传学研究.

varies of female silkworm pupae. The results revealed that the variation range of fatty acid abundance in the pupal body was small at first six days of pupation but increased from the sixth to ninth day. Overall, the main fatty acids exhibited a decreasing trend, while the trace fatty acids showed an increasing trend. The variation range of fatty acid abundance in the ovaries decreased with development. Different main fatty acids exhibited diverse patterns and directions of change, with an increase in unsaturated fatty acid abundance and a decrease in saturated fatty acid abundance. The abundance of trace fatty acids significantly decreased with development, indicating a less association between trace fatty acids and female reproduction. The differences in fatty acid abundance between the pupal body and ovaries gradually diminished with development. By the sixth day of pupation, most of fatty acids in the ovaries differed significantly from those observed during the initial pupation stage, but were similar to those in the pupal body, suggesting the dependence of fatty acid accumulation in ovary on the pupal body fatty acids, which is likely related to ovarian development and vitellogenesis. In the later stages of pupation, the highest abundance of α -Lindenic acid fatty acid exhibited a decrease, while the second highest abundance of Oleic acid fatty acid significantly increased, which may be associated with eggshell formation and oocyte maturation. Linoleic acid displayed the greatest difference on the sixth day of pupation, with a significantly higher abundance in the ovaries than in the pupal body, indicating the specificity of accumulation of fatty acids in ovary during development and oogenesis. These results provide important clues for further investigating the mechanisms underlying the role of fatty acids in female reproduction of silkworms and other insects.

Key words: silkworm; female pupa; ovary; fatty acid; abundance

脂肪酸是脂质的主要成分, 不仅参与生物体的生长发育^[1]和营养代谢, 还在生殖器官与生殖细胞的发生、发育和成熟过程中发挥调节作用. 对于哺乳动物而言, 不饱和脂肪酸(Unsaturated Fatty Acid, UFA)中的前列腺素对雄性或雌性的生殖功能及生殖能力具有积极促进作用^[2]. 崔亚利等^[3]研究表明, 在小鼠饲料中添加共轭亚油酸可以显著增加其发情期次级卵泡数量, 提高胚胎数和产仔数^[3]. 此外, 雄性小鼠的生殖障碍与摄入的 n-6/n-3 多不饱和脂肪酸比值密切相关^[4]. 对线虫动物的研究发现, 减少 n-6 多不饱和脂肪酸可以使秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)卵母细胞的大小缩小为野生型的 20%, 并导致后续胚胎发育和卵的孵化出现明显的不良状况^[5, 6]. 在节肢动物中, 褐贻贝(*Perna perna*)的生殖状态与肉豆蔻酸、棕榈油酸、油酸、异油酸以及花生四烯酸等脂肪酸关系密切^[7]. 此外, 高不饱和脂肪酸花生四烯酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸能够显著促进甲壳类动物(如虾、蟹)的卵巢发育, 并提高后代的存活率, 而不饱和脂肪酸之间的相对含量比值则会影响虾和蟹的生殖性能^[8-10]. 亚油酸对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的卵巢成熟和繁殖力具有促进作用^[11]. 当大型溞(*Daphnia magna*)体内 16 碳单不饱和脂肪酸的相对含量最多时, 其产卵量和孵化率显著增加^[12]. 昆虫方面的研究表明, 给蠋蝽(*Arma chinensis*)添食饱和脂肪酸会增加其后代中雌性个体的数量, 而添食单不饱和脂肪酸则有利于其卵黄原蛋白的形成和生殖力的提高^[13]. 此外, 添食单不饱和脂肪酸能显著缩短龟纹瓢虫(*Propylaea japonica*)产卵潜伏期, 增加产卵总数^[14]. 改变饲料中的脂质浓度和 ω -6/ ω -3 多不饱和脂肪酸比值会导致蜜蜂(*Apis mellifera*)产卵量的改变^[15]. 另外, 给昆士兰果蝇(*Bactrocera tryoni*)幼虫添食含有棕榈油酸的小麦胚芽油可以提升其产卵量^[16]. Ling 等^[17]的研究结果表明, 通过基因操作阻止埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)卵巢积累脂质, 会导致卵巢发育停滞, 初级滤泡消失. Gutierrez 等^[18]研究发现, 在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中, 通过敲除脂肪酸 ω -羟化酶基因, 其卵母细胞数量减少了 50%. 上述研究结果均强调了脂质与昆虫雌性生殖之间的密切关系.

作为鳞翅目昆虫之一,家蚕在丝绸生产和科学研究中有着广泛应用.家蚕的生殖调控对蚕种繁育和害虫防治具有重要意义.已有研究表明,家蚕 5 龄幼虫脂肪体的增长速度明显大于其质量的增长速度,其中雌蚕的脂肪体增长明显高于雄蚕,但蛹化后,雌蛹体内脂肪体的减少速度显著高于雄蛹,这一现象表明脂肪体是蛹期卵巢生长发育的重要营养来源^[19].进一步研究发现,在给蚕蛹注射脂质转运颗粒抗体以抑制脂质转运后,成虫卵巢中的卵质量降低,数量减少^[20],这说明脂质在家蚕雌蛹的生殖发育中具有重要作用.目前,关于蚕蛹脂肪酸的研究主要集中在蛹油的开发和利用方面^[21-27],而生殖方面有关脂肪酸的分析研究相对较少.本研究分析了不同发育时期的雌蛹蛹体和卵巢中的脂肪酸,结果可为深入研究脂肪酸在家蚕和其他昆虫雌性生殖中的作用机制提供重要线索.

1 材料和方法

1.1 供试材料

在大造蚕 5 龄幼虫早期,根据石渡氏腺选留雌性个体,常规常湿条件下桑叶饲养,然后选取蛹化时间相差 2 h 以内、蛹体大小相似且健康的雌性个体作供试个体.

1.2 卵巢解剖

饲养温度 24 °C~25 °C,湿度 75%~80%,选取在此条件下蛹化时间相差 2 h 内的雌蛹个体,从蛹化之时起,每隔 24 h 解剖观察 1 次卵巢,每个时期观察 4~6 个个体,至羽化前共观察到 9 个发育时间的卵巢形态.

卵巢组织的解剖在磷酸缓冲液(PBS)(pH=7.4)中进行,清除其它杂质后用 PBS 洗涤 2~3 次备用.

1.3 RNA 提取、cDNA 合成以及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析

将刚刚摘取的卵巢于液氮中研磨,用 Trizol 法提取总 RNA,随后用 ezDNase 与样品 RNA 在 37 °C 孵育 2 min,去除基因组 DNA,再以 oligo dT 寡核苷酸为引物,与 M-MLV 逆转录酶(Promega)一起,参照 Takara 反转录试剂盒说明书合成 cDNA. qRT-PCR 分析用 SYBR Green (T-hermofisher) 荧光染料标记,以 *BmTIF4* 基因为内参,反应体系为: 2xSYBR Green qRT-PCR mix 10 μ L; cDNA 2 μ L; 引物各 0.4 μ L; ddH₂O 7.2 μ L,反应在 ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) 上完成,反应条件为: ① 95 °C 30 s; 95 °C 5 s; 60 °C 30 s; ② 95 °C 15 s; 60 °C 1 min; 95 °C 15 s,每个样本设置 3 个生物学重复,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算. 利用 SPSS 软件中的 ANOVA 法进行方差分析,并选用多重比较进行显著性差异分析,其中 $p < 0.05$ 表示样本间差异具有统计学意义. 基因 *BmEP80* 的正向引物为 AAACGGCGTCCTACAACCCTT,反向引物为 TCTTGAGCGGGTGGTGGACT,基因 *BmA. L12* 的正向引物为 GTGTAATGGGACAGGT,反向引物为 TAGTATGGAGAACCGC.

1.4 用于脂肪酸检测样品采集

将摘除卵巢组织的蛹体捣碎研磨,充分混匀,使其总质量保持在 5 g 以上,用于蛹体脂肪酸分析;将卵巢捣碎研磨,充分混匀,蛹化 1~3 d 的卵巢使其总质量保持在 0.5 g 以上,蛹化 4~6 d 的卵巢使其总质量保持在 1 g 以上,蛹化 7~9 d 的卵巢使其总质量保持在 3 g 以上,用于卵巢脂肪酸分析.

1.5 样品处理

精确称取 0.500 0 g 样品,研磨均匀后置于 10 mL 离心管中,每组样品进行 3 次生物学重复. 向匀浆中加入 5 mL 氯仿-甲醇混合液,高速振荡混匀 1 min,然后 50 °C 超声提取 1.5 h. 超声结束后,4 000 rpm 离心 2 min,将上清液转移到新离心管,重复以上提取步骤一次,并混合两次提取液. 然后向提取液中加入 2 mL 饱和 NaCl,振荡混匀 30 s,4 000 rpm 离心 10 min. 将有机相转移到新离心管,加入 0.5 g 无水硫酸钠干燥. 4 000 rpm 离心 10 min 后,将上清液转移至新离心管,50 °C 氮吹干燥,得到粗脂肪. 随后向粗脂肪中加入 5 mL 正己烷和 3 mL 氢氧化钠溶液,振荡混匀,放入烘箱中 60 °C 甲酯化 30 min. 4 000 rpm 离心 10 min,取上清 1 mL 过 0.22 μ m 有机滤膜,最后加入进样瓶中进行气相色谱检验.

1.6 样品检测

Agilent GC 7890 气相色谱仪, FID 检测器, DB-FFAP 毛细管色谱柱(60 m * 0.25 mm * 0.5 mm). 进样量: 1 μ L; 进样口温度: 250 $^{\circ}$ C; 后检测器温度: 280 $^{\circ}$ C; 柱温箱保持 180 $^{\circ}$ C 恒温. 分流进样, 分流比为 50 : 1, 流速: 1 mL/min. 流量比: 氢气 : 空气 : 氮气为 40 : 400 : 40.

1.7 数据处理

从气相色谱检验中得到了不同脂肪酸的峰面积, 并以此计算出每种脂肪酸在总峰面积中的占比. 对 3 次生物学重复进行均值计算. 最后得到的结果即为脂肪酸的相对含量.

2 结果

2.1 家蚕蛹期卵巢形态学观察

家蚕雌蛹有左右两侧对称卵巢, 每侧卵巢有 4 根卵巢管. 家蚕雌蛹不同发育时期的卵巢形态如图 1 所示, 仅在蛹化第 1, 2 d 和蛹化第 9 d(羽化前 1 d)同时显示了左右两侧的卵巢, 其余时间均显示一侧卵巢.

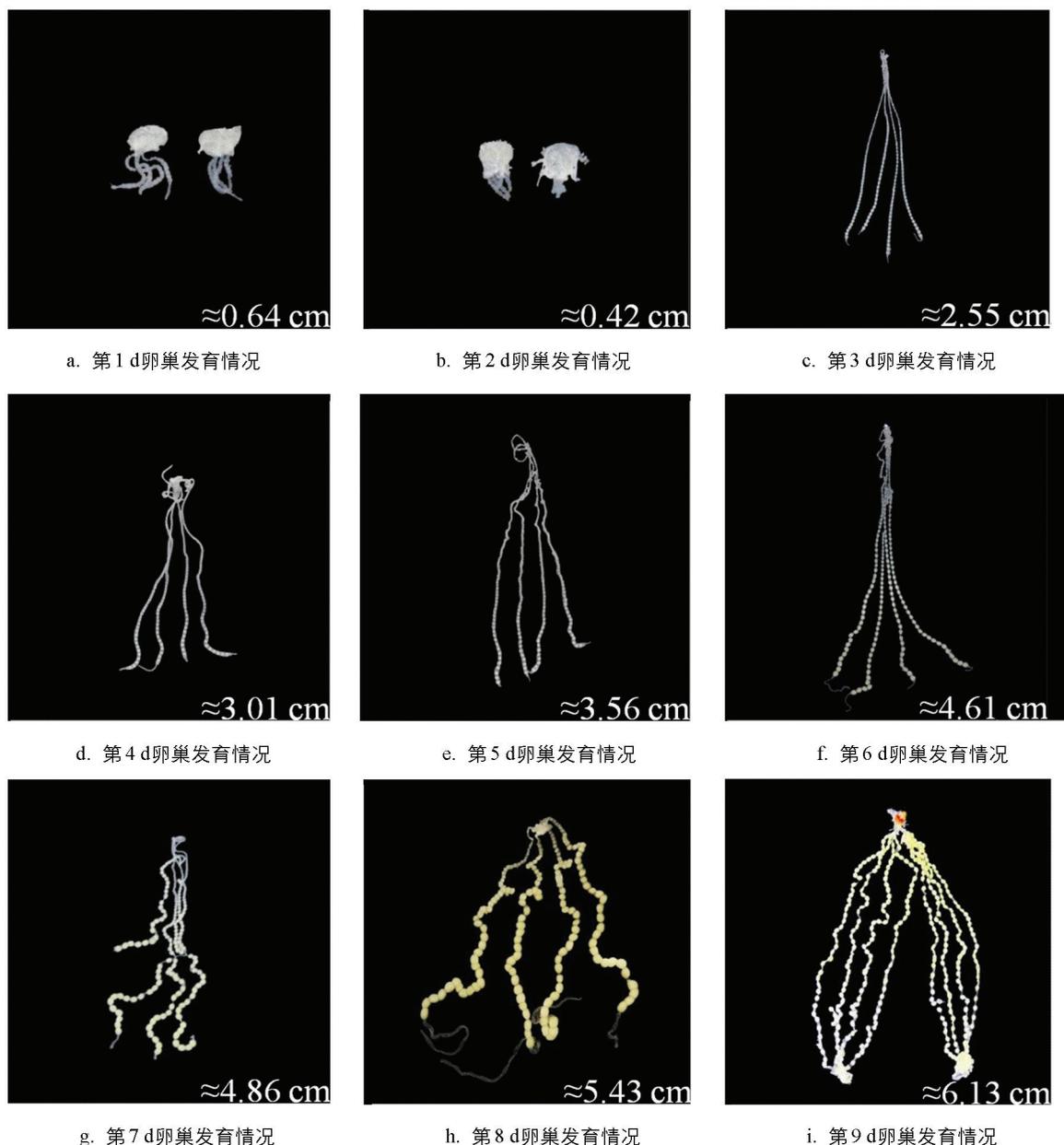


图1 家蚕雌蛹不同发育时期的卵巢形态

在蛹化当天(图 1a), 可以观察到卵巢管突破卵巢被膜, 随着发育的进行, 卵巢管不断在体腔内延伸, 到蛹化第 3 d, 卵巢管长度显著增加(图 1a-1c), 并向体腔延长扩展. 在蛹化初期, 卵管细, 管内卵小, 且呈透明状, 从蛹化第 4 d 开始, 可以观察到卵巢管增粗, 到了蛹化第 6 d, 卵巢管最远端的卵内出现明显的营养物质积累, 伴随着卵体积的增大, 卵色由白色转变为淡黄色(图 1d-1f). 蛹化第 7 d, 卵巢管进一步扩张并充满体腔, 卵巢管中正在积累营养物质的卵以及营养物质积累完成的卵的数量由远及近显著增加(图 1g). 到了蛹化第 8 d, 卵巢管内的大部分卵已经完成了营养物质的积累, 远端的少部分卵形成卵壳, 形状也由圆形变为椭圆形, 卵色变淡, 卵间桥连消失, 彼此分离, 卵子发育成熟(图 1h). 蛹化第 9 d, 卵巢几乎占据了整个体腔, 卵巢管内的大部分卵发育成熟, 等待排出体外(图 1i).

2.2 雌蛹发育过程中卵巢发育和卵子发生阶段的代表性时期

卵巢发育和卵子发生是一个连续的过程. 在蛹期, 卵巢发育的同时, 卵管内的卵子也在迅速发育, 直到羽化时, 卵巢内的所有卵子均发育成熟. 卵子发生可以分为 6 个阶段: 卵黄生成前期、卵黄生成期、卵黄生成末期、卵壳生成前期、卵壳生成期和卵壳生成末期^[27]. 通过对卵巢形态和卵管内卵子的连续观察, 结合蛹期的发育过程, 将蛹化后的 4 个时期作为卵巢发育和卵子发生的代表性时期, 即: 蛹化第 1 d(卵巢管突破卵巢被膜, 管内卵子依稀可见)、蛹化第 3 d(卵巢管快速延伸增长, 管内卵子透明且清晰可见)、蛹化第 6 d(卵巢管最远端卵内有明显的营养物质积累, 体积增大, 颜色由白色转为淡黄色)和蛹化第 9 d(除近端的少数卵外, 卵管内的大部分卵子成熟, 形成卵壳, 形状由圆形变成椭圆形, 卵间桥连消失, 彼此分离并移向输卵管).

在卵管内, 卵子按线性顺序依次发育, 相邻卵子之间的发育时间间隔为 2~2.5 h, 最先发育和成熟的是最远端的卵子^[27]. 然而, 这种顺序发育的特点可能导致上述时期在卵子发生方面的代表性不足. 为此, 使用 qRT-PCR 分析了蛹化第 3 d 和蛹化第 6 d 卵巢中卵黄膜蛋白编码基因 *BmEP80* (卵黄生成期标志基因) 和绒毛膜 B 类蛋白 L12 基因 *BmA.L12* (卵壳生成期标志基因) 的表达情况. 结果如图 2 所示, 卵黄生成期标志基因 *BmEP80* 在蛹化第 3 d 微量表达, 在蛹化第 6 d 有高量表达, 两个时期的基因表达差异具有统计学意义. 而卵壳生成标志基因 *BmA.L12* 在两个时期均未检测到表达. 因此, 可以得出以下结论: ① 蛹化第 3 d, 卵子发育处于卵黄生成的萌发阶段; ② 蛹化第 6 d, 卵子发育正处于卵黄大量生成阶段, 卵壳形成尚未开始. 这两个时期在卵子发生上存在明显差异, 可以作为卵子发生阶段的代表性时期. 故蛹化后卵子发生阶段的 4 个代表性时期为: 蛹化第 1 d, 卵子发育启动; 蛹化第 3 d, 卵黄生成开始; 蛹化第 6 d, 卵黄大量生成; 蛹化第 9 d, 卵子成熟, 卵壳生成完毕.

2.3 蛹发育过程中雌蛹体脂肪酸丰度

利用高效气相色谱(GC)从蛹体的粗脂肪中搜索 C4 至 C24 共 37 种脂肪酸, 结果检测到了 12 种脂肪酸, 分别是肉豆蔻酸、十五碳烯酸、棕榈酸、棕榈油酸、珍珠酸、银杏酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、花生酸、花生三烯酸. 在蛹体中, α -亚麻酸含量最丰富, 丰度最高, 为 37.687%~48.640%, 油酸次

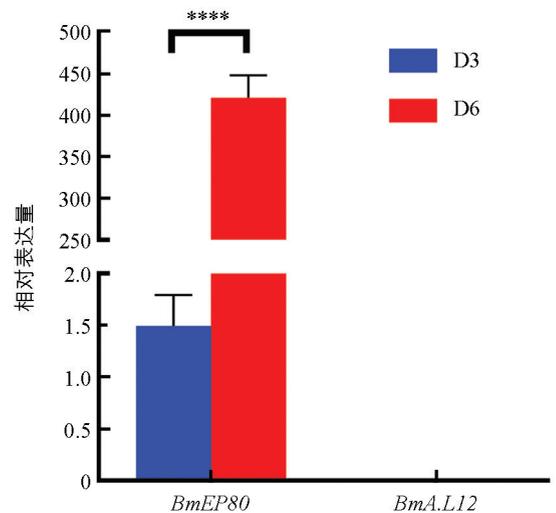


图 2 两个家蚕蛹卵巢发育标志基因的表达变化

之, 丰度为 19.262%~20.280%, 后面依次是棕榈酸、硬脂酸和亚油酸, 丰度分别为 14.085%~15.716%, 8.613%~14.199%, 6.349%~8.501%, 这些脂肪酸总丰度在 96% 以上, 属于蛹体的主要脂肪酸, 其余 7 种脂肪酸总丰度不超过 4%, 属于微量脂肪酸(表 1, 表 2).

蛹化第 1 d 到第 6 d, 蛹体中各主要脂肪酸的丰度变化较小. 然而, 从蛹化第 6 d 到第 9 d, 可以观察到 α -亚麻酸丰度明显下降, 从 48.207% 降至 37.687%, 下降幅度为 10.520%; 相反, 硬脂酸的丰度显著增加, 从 8.613% 上升至 14.199%, 增长幅度为 5.586%. 在此期间, 亚油酸的丰度略微升高, 从 6.948% 上升至 8.501%, 增长幅度为 1.553%. 其它两种主要脂肪酸的丰度变化幅度较小(表 1). 主要脂肪酸的总丰度在蛹化第 1 d 至第 6 d 变化较小, 而在第 9 d 出现明显下降(表 1). 7 种微量脂肪酸的丰度变化方向各不相同, 但总体随发育的进行而增加, 这与主要脂肪酸的变化趋势不同. 值得注意的是, 微量脂肪酸在蛹化第 1 d 至第 6 d 的变化幅度明显小于第 6 d 到第 9 d 的变化幅度, 这与主要脂肪酸的变化特征相似(表 2).

表 1 家蚕雌蛹蛹体(不带卵巢)主要脂肪酸丰度

指标	棕榈酸 (C16:0)/%	硬脂酸 (C18:0)/%	油酸 (C18:1)/%	亚油酸 (C18:2)/%	α -亚麻酸 (C18:3)/%	总丰度/%
D1	15.716±0.034a	8.620±0.011c	19.262±0.012c	6.682±0.005c	48.640±1.158a	98.920±1.159
D3	15.709±0.063a	9.023±0.086b	19.669±0.077b	6.349±0.174d	47.270±0.130ab	98.020±0.254
D6	14.085±0.003b	8.613±0.031c	20.280±0.014a	6.948±0.006b	48.207±0.025a	98.133±0.043
D9	15.653±0.073a	14.199±0.114a	20.262±0.086a	8.501±0.026a	37.687±0.070c	96.302±0.177
变化幅度	1.631±0.034	5.569±0.119	1.018±0.019	2.152±0.175	10.953±1.160	

注: 小写字母不同表示差异有统计学意义($p < 0.05$), 下同.

表 2 家蚕雌蛹蛹体(不带卵巢)微量脂肪酸丰度

指标	肉豆蔻酸 (C14:0)/%	十五碳烯酸 (C15:1)/%	棕榈油酸 (C16:1)/%	珍珠酸 (C17:0)/%	银杏酸 (C17:1)/%	花生酸 (C20:0)/%	花生三烯酸 (C20:3)/%	总丰度/%
D1	0.1679±0.0335a	0.1191±0.0284d	0.4577±0.1094b	0.1953±0.0090b	0.0789±0.0073b	0.3876±0.0018d	0.3350±0.0830b	1.7415±0.1447
D3	0.1192±0.0542ab	0.3576±0.0149b	0.4132±0.0218b	0.2102±0.0106b	0.0876±0.0050b	0.4802±0.0031c	0.3126±0.0150b	1.9806±0.0632
D6	0.1311±0.0037ab	0.2398±0.0093c	0.4189±0.0029b	0.2051±0.0065b	0.0779±0.0011b	0.5145±0.0034b	0.2796±0.0005b	1.8669±0.0128
D9	0.0953±0.0179b	1.2272±0.0349a	0.5985±0.0026a	0.3594±0.0689a	0.1285±0.0348a	0.6756±0.0215a	0.6132±0.0703a	3.6977±0.1136
变化幅度	0.0726±0.0380	1.1081±0.0450	0.1853±0.0219	0.1641±0.0695	0.0506±0.0348	0.2880±0.0215	0.3336±0.0703	

2.4 雌蛹发育过程中卵巢脂肪酸丰度

在卵巢中, 同样检测到了 12 种脂肪酸, 其中 α -亚麻酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸和亚油酸的丰度均超过 5%, 属于主要脂肪酸, 其总丰度为 88%~98%(表 3); 剩余 7 种脂肪酸是微量脂肪酸, 其总丰度在蛹化第 1 d 以外的其它 3 个时期都低于 6%(表 4).

与蛹体不同, 卵巢中大多数主要脂肪酸在整个发育过程中均发生了明显变化, 蛹化第 1 d 至第 6 d 的变化幅度大于第 6 d 至第 9 d 的变化幅度(表 3, 表 4). 总体而言, 脂肪酸变化的趋势如下: 随着发育的进行, 不饱和脂肪酸的丰度增加, 饱和脂肪酸的丰度下降(表 3). 其中, 油酸的丰度随发育不断上升, 而硬脂酸的丰度随发育不断下降; α -亚麻酸和亚油酸的丰度从蛹化第 1 d 至第 6 d 持续上升, 然后略微下降; 棕榈酸的丰度在蛹化第 1 d 至第 6 d 先下降, 后略微升高(表 3). 整个过程变化幅度最大的是 α -亚麻酸, 其丰度从 10.760% 上升至 46.802%, 增长幅度为 36.042%, 其次是硬脂酸, 其丰度从 31.811% 下降至 6.835%, 下降幅度为 24.976%; 棕榈酸的丰度从 27.469% 下降至 14.171%, 下降幅度为 13.298%; 油酸的丰度从

12.937% 上升至 24.420%，增长幅度为 11.483%；亚油酸的丰度由 5.758% 上升至 8.978%，增长幅度为 3.220%，变化幅度最小(表 3)。卵巢中主要脂肪酸的总丰度在蛹化第 1 d 至第 6 d 随发育不断升高，但增长速度逐渐减缓，在第 6 d 至第 9 d 变化甚微。卵巢主要脂肪酸的总丰度呈上升趋势。

表 3 家蚕蛹卵巢主要脂肪酸丰度

	棕榈酸 (C16:0)/%	硬脂酸 (C18:0)/%	油酸 (C18:1)/%	亚油酸 (C18:2)/%	α -亚麻酸 (C18:3)/%	总丰度/%
D1	27.469±0.859a	31.811±1.029a	12.937±0.384d	5.758±0.175d	10.760±0.319d	88.735±1.441
D3	19.039±0.139b	21.981±0.108b	20.299±0.091c	6.701±0.086c	26.175±0.143c	94.195±0.259
D6	14.171±0.032c	7.093±0.024c	20.899±0.019b	8.978±0.012a	46.802±0.059a	97.943±0.075
D9	14.547±0.017c	6.835±0.013c	24.420±0.022a	7.736±0.023b	44.053±0.030b	97.591±0.048
变化幅度	13.298±0.859	24.976±1.029	11.483±0.384	3.220±0.176	36.042±0.325	

表 4 家蚕蛹卵巢微量脂肪酸丰度

	肉豆蔻酸 (C14:0)/%	十五碳烯酸 (C15:1)/%	棕榈油酸 (C16:1)/%	珍珠酸 (C17:0)/%	银杏酸 (C17:1)/%	花生酸 (C20:0)/%	花生三烯酸 (C20:3)/%	总丰度/%
D1	0.4785±0.1829a	4.2524±0.1274a	1.0659±0.2971a	0.6555±0.0499a	0.6266±0.3168a	2.2074±2.1917	1.9790±0.4485a	11.2653±2.2903
D3	0.4801±0.0474a	1.8568±0.0069b	0.8406±0.0180ab	0.6330±0.0328a	0.1874±0.0036b	0.8297±0.0375	0.9782±0.2094b	5.8058±0.2213
D6	0.2057±0.0848b	0.3080±0.0164c	0.6592±0.0187b	0.2193±0.0067b	0.0514±0.0035b	0.3124±0.0525	0.3011±0.0174c	2.0571±0.1045
D9	0.3362±0.0256ab	0.4322±0.0319c	0.6775±0.0075b	0.2402±0.0080b	0.0568±0.0009b	0.3736±0.0033	0.2912±0.0102c	2.4077±0.0437
变化幅度	0.2744±0.0971	3.9444±0.1284	0.4067±0.2977	0.4362±0.0504	0.5752±0.3168	1.8950±2.1923	1.6878±0.4487	

卵巢微量脂肪酸在整个发育过程中丰度变化显著，且蛹化第 1 d 至第 6 d 的变化幅度大于蛹化第 6 d 至第 9 d 的变化幅度(表 4)。与主要脂肪酸的变化趋势不同的是，卵巢中微量脂肪酸的总丰度随发育逐渐下降。

2.5 蛹发育过程中雌体-卵巢脂肪酸丰度差异

通过比较雌蛹蛹体和卵巢中的主要脂肪酸丰度可以发现，在蛹化初期，卵巢主要脂肪酸中的不饱和脂肪酸丰度低于蛹体，特别是 α -亚麻酸和油酸，二者在卵巢中的丰度明显低于蛹在体中的丰度，而卵巢中的饱和脂肪酸(硬脂酸和棕榈酸)的丰度明显高于蛹体(图 3)。随着发育的进行，卵巢中各主要脂肪酸的丰度与蛹体中主要脂肪酸的丰度之间的差距逐渐缩小，直到趋于一致，但在发育后期又出现了差异。具体而言， α -亚麻酸丰度差异在蛹化第 1 d 为 37.880%，第 3 d 为 21.095%，第 6 d 为 1.045%，第 9 d 为 6.366%；硬脂酸丰度差异在蛹化第 1 d 为 23.191%，第 3 d 为 12.958%，第 6 d 为 1.520%，第 9 d 为 7.364%；棕榈酸丰度差异在蛹化第 1 d 为 11.753%，第 3 d 为 3.330%，第 6 d 为 0.086%，第 9 d 为 1.106%；油酸丰度差异在蛹化第 1 d 为 6.325%，第 3 d 为 0.630%，第 6 d 为 0.619%，第 9 d 为 4.158%；亚油酸丰度差异在蛹化第 1 d 为 0.924%，第 3 d 为 0.352%，第 6 d 为 2.030%，第 9 d 为 0.765%(表 5)。蛹化第 6 d，卵巢和蛹体中的 α -亚麻酸、油酸、硬脂酸和棕榈酸丰度，差异最小，但到了蛹化第 9 d，卵巢和蛹体中相应脂肪酸的差异略微增大。与其它主要脂肪酸相比，亚油酸丰度变化稍有不同：蛹化第 3 d，它在蛹体和卵巢中的丰度差异最小，而在蛹化第 6 d，丰度差异最大(图 3b, 3c)。微量脂肪酸在蛹体和卵巢之间的丰度差异变化趋势与主要脂肪酸相似，即在蛹化初期差异最大，随发育逐渐缩小。除个别脂肪酸(如棕榈油酸)在卵巢和蛹体中的丰度差异在蛹化第 9 d 最小外，其余微量脂肪酸

在蛹化第 6 d 差异最小, 第 9 d 差异略有增加(表 2, 表 4).

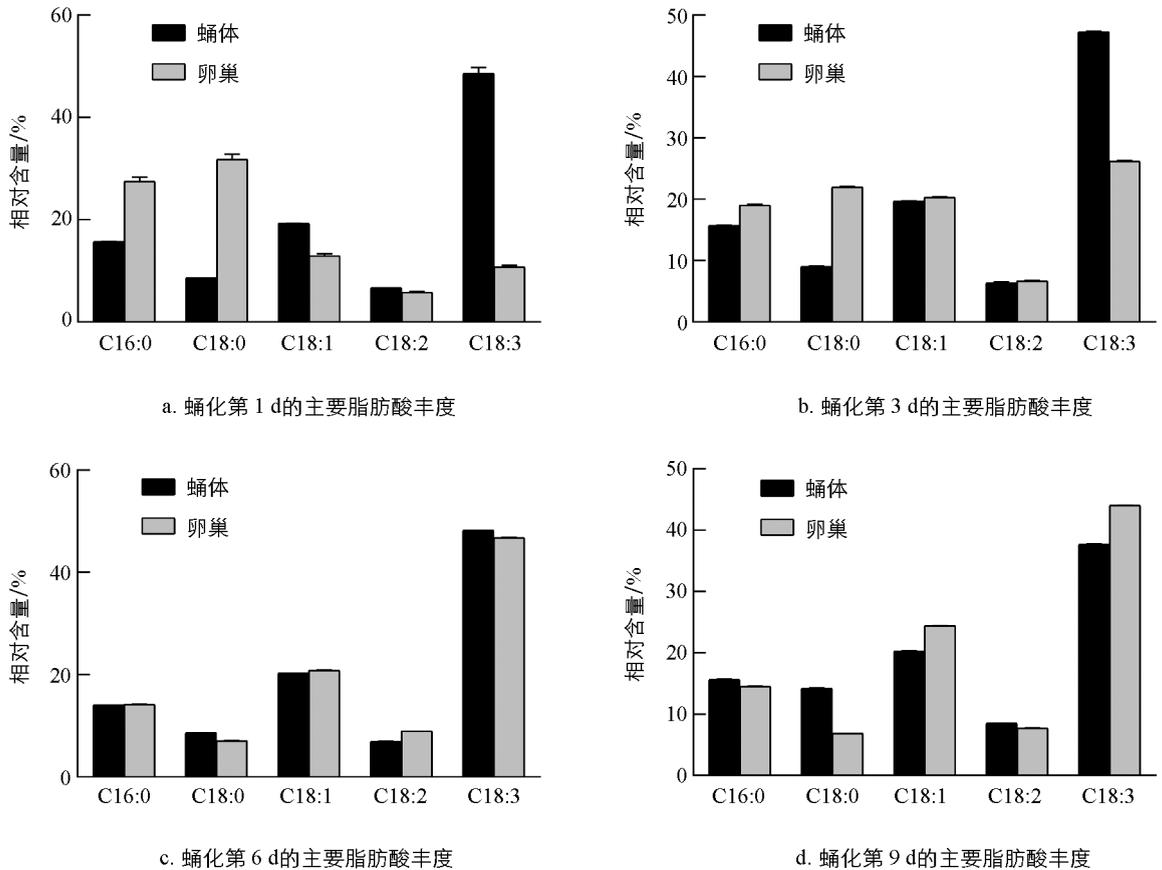


图 3 不同时期蛹体—卵巢主要脂肪酸丰度比较

3 讨论

家蚕蛹期的雌性生殖发育包括卵子发生和卵巢发育. 卵子发生随卵巢发育而启动^[28]. 在发育过程中, 卵巢会出现明显的形态变化. 然而, 由于卵巢管内排列的众多卵子具有不同步的连续发育时间特性, 仅依靠卵巢形态观察来区分雌性生殖发育阶段的代表性时期可靠性较低. 为了解决这一问题, 研究采用 qRT-PCR 分析了卵巢卵黄生成标志基因 *BmEP80* 和卵壳生成标志基因 *BmA.L12*, 在蛹化第 3 d (卵管快速伸长期) 和蛹化第 6 d (初见卵内营养物质积累期) 的表达水平. 研究结果显示, 蛹化第 3 d 卵子发育处于卵黄生成的萌发阶段, 而蛹化第 6 d 卵子发育正值卵黄大量生成和卵壳形成前期. 这两个时期在卵子发生方面表现出明显差异, 因此具有代表性, 可以用来区分雌性生殖发育阶段.

研究检测了不同发育时期雌蛹体内脂肪酸, 结果显示, 在所有时期均检测到了 12 种脂肪酸的存在. 其中, 棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸的丰度较高, 被认为是主要脂肪酸, 这一结果与之前的报道一致^[20-26]. 不同的是, α -亚麻酸是蛹体中丰度最高的脂肪酸, 与大多数雌雄混合分析认为油酸是家蚕蛹体含量最高的脂肪酸不同, 可能是 α -亚麻酸含量在雌蛹比在雄蛹高的缘故^[29-30]. 此外, 还检测到了 7 种微量脂肪酸, 包括肉豆蔻酸、棕榈油酸、花生酸、花生三烯酸、十五碳烯酸、十七烷酸和银杏酸. 然而, 研究未检测到蔡沙等^[25]和张雨丽等^[22]发现的十三碳酸、月桂酸(十二烷酸)和十九酸.

雌蛹脂质含量随发育快速减少^[19, 31]. 结果显示, 在蛹化第 1 d 至第 6 d, 雌蛹蛹体中各主要脂肪酸的丰度变化较小且相对稳定. 这表明, 在这个发育阶段, 主要脂肪酸被消耗利用的速度与总脂质下降的速度相似, 并且各主要脂肪酸利用均衡. 蛹化第 6 d 至第 9 d, 蛹体内主要脂肪酸的总丰度下降, 这可能是丰度最

高的 α -亚麻酸显著下降所致. 这表明, 在这个时期, 雌蛹蛹体对 α -亚麻酸有偏好利用的趋势. 与此同时, 蛹体中硬脂酸和亚油酸丰度发生了明显增加, 这可能源于蛹体中丰度最高的 α -亚麻酸消耗较多, 导致丰度相对较低的脂肪酸出现增加, 这些脂肪酸在机体中消耗利用较少甚至不被利用. 此外, 随着发育的进行, 蛹体中微量脂肪酸的总丰度逐渐增加, 尤其是在蛹化第 6 d 至第 9 d, 当主要脂肪酸的丰度出现下降时, 微量脂肪酸的丰度明显上升. 这可能是由于机体利用和消耗微量脂肪酸的速度低于主要脂肪酸或总脂肪酸的速度. 本研究中雌蛹体内的 5 种主要脂肪酸的丰度, 虽然在大小顺序上与现有的报道一致, 但在具体的丰度上有些脂肪酸存在明显差异, 这可能源于所用实验材料和方法不同^[29].

蛹化后, 卵巢随发育迅速增长. 在蛹化初期, 卵巢内含有细小的卵管和少量卵. 随着卵管的快速延伸和卵内营养物质的积累, 卵巢迅速增大, 并最终占据了蛹体大部分的体腔. 据报道, 羽化前卵巢中的脂质含量是蛹化当天卵巢中脂质含量的 100 多倍, 并且羽化前单位卵巢质量的脂质浓度比蛹化当天单位卵巢质量的脂质浓度高 75% 以上, 卵巢随发育聚集了大量脂质^[31]. 结果显示, 蛹体内的 5 种主要脂肪酸同样也是卵巢中的主要脂肪酸. 在整个蛹期, 卵巢各主要脂肪酸的丰度随发育不断变化, 不同类型的脂肪酸的变化幅度和方向各不相同. 其中, 不饱和脂肪酸的丰度随发育增加, 饱和脂肪酸丰度则显著下降. 在发育过程中卵巢对不同类脂肪酸的积累速度存在差异. 卵巢更倾向于积累不饱和脂肪酸, 因此 α -亚麻酸和油酸丰度显著增加. 与蛹化第 6 d 相比, 蛹化第 9 d 卵巢主要脂肪酸的总丰度变化微小. 然而, 丰度最高的 α -亚麻酸发生下降, 而油酸的丰度明显升高, 这表明, 在这个阶段卵巢积累 α -亚麻酸的速度下降、而积累油酸的速度提高, 很可能与卵壳生成、卵子成熟有关. 有研究表明雌蛹卵巢脂肪酸的丰度在发育过程中变化较小且相对稳定, α -亚麻酸与硬脂酸的丰度相似, 并明显低于油酸、棕榈酸和亚油酸的丰度. 这与本实验结果有很大不同^[31-32]. 然而, 他后来提出的家蚕早期胚胎中主要脂肪酸的丰度大小顺序与本实验结果中蛹化第 9 d 卵巢的主要脂肪酸丰度大小顺序完全一致^[31-32].

蛹化后, 蛹体的脂质逐渐减少, 而卵巢中的脂质明显增加^[19, 31]. 研究结果显示, 蛹体中主要脂肪酸的总丰度呈现下降趋势, 而卵巢中主要脂肪酸明显上升. 相反, 微量脂肪酸的总丰度在蛹体中上升, 在卵巢中明显下降, 这表明随着发育的进行, 主要脂肪酸在蛹体中大量消耗、在卵巢中大量积累, 而微量脂肪酸在蛹体中的消耗较少、卵巢中的积累也较少, 由此推测主要脂肪酸与蛹期雌性生殖发育的相关性大于微量脂肪酸.

昆虫卵泡在体外新合成的脂肪酸量相当于成熟卵子中脂肪酸的 1% 左右, 而卵巢自身很少或几乎不合成脂肪酸^[33-34]. 卵巢中积累的脂质主要来自蛹体转运^[31]. 对比蛹体与卵巢中主要脂肪酸的丰度发现, 二者在蛹化当天存在显著差异, 随着发育的进行, 卵巢和蛹体之间的差异逐渐缩小, 卵巢中原本丰度低于蛹体的脂肪酸开始增加, 而原本丰度高于蛹体的脂肪酸开始下降. 蛹化第 6 d, 棕榈酸、硬脂酸、油酸和 α -亚麻酸的差异最小, 即此时它们在卵巢的丰度与蛹体的丰度相似. 从蛹化第 1 d 至第 6 d, 蛹体中各主要脂肪酸的丰度变化较小, 而这个发育时期中蛹体棕榈酸、硬脂酸、油酸、 α -亚麻酸的丰度, 与蛹化第 6 d 卵巢中相应脂肪酸的丰度接近, 这种同质性表明卵巢发育和卵黄生成对蛹体的高度依赖性. 至蛹化第 9 d, 这 4 种主要脂肪酸的丰度差异略微增加, 可能与卵壳生成和卵子成熟有关, 同时也与成虫器官重塑即将完成有关, 因为在这个阶段, 蛹体中主要脂肪酸的消耗速度超过总脂质的消耗速度, 而卵巢中主要脂肪酸的积累速度与总脂质的积累速度接近. 与前述 4 种主要脂肪酸不同, 亚油酸在蛹化第 3 d 的差异最小, 而在蛹化第 6 d 的差异最大, 它在卵巢中的丰度显著升高并明显高于蛹体中亚油酸的丰度, 出现了亚油酸的丰度高于硬脂酸的情况, 这种现象一直持续到蛹化第 9 d. 这与蛹体中硬脂酸丰度高于亚油酸丰度的恒定顺序不同, 显示了卵巢发育卵子发生的特异性.

4 结论

通过分析卵巢发育卵子发生特征时期蛹体-卵巢脂肪酸丰度,显示了卵巢发育、卵子发生过程中蛹体脂肪酸消耗和卵巢脂肪酸积累的特征,为进一步深入探究脂肪酸在变态昆虫(如家蚕)生殖中的作用及机制提供了线索.

参考文献:

- [1] 颀江,李飞扬,刘晓玲,等. 饲料脂肪水平对宽体沙鳅幼鱼生长和肌肉脂肪酸组成及脂肪酶的影响 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2013, 38(11): 76-83.
- [2] 范衡宇,杨增明. 前列腺素及其受体与哺乳动物的生殖 [J]. 生理科学进展, 2000, 31(1): 75-78.
- [3] 崔亚利,李三吓,李同洲,等. 共轭亚油酸对小鼠血清瘦素、内脂素水平及生殖的影响 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36(9): 1564-1567, 1581.
- [4] 丁宁,张欣,刘姗姗,等. n-6/n-3 多不饱和脂肪酸营养失衡对小鼠精子发生的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(21): 4001-4006.
- [5] WEBSTER C M, DELINE M L, WATTS J L. Stress Response Pathways Protect Germ Cells from Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid-Mediated Toxicity in *Caenorhabditis Elegans* [J]. *Developmental Biology*, 2013, 373(1): 14-25.
- [6] CHEN W W, YI Y H, CHIEN C H, et al. Specific Polyunsaturated Fatty Acids Modulate Lipid Delivery and Oocyte Development in *C. Elegans* Revealed by Molecular-Selective Label-Free Imaging [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32021.
- [7] NARVÁEZ M, FREITES L, GUEVARA M, et al. Food Availability and Reproduction Affects Lipid and Fatty Acid Composition of the Brown Mussel, *Perna Perna*, Raised in Suspension Culture [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 149(2): 293-302.
- [8] CLARKE A. Lipid Synthesis and Reproduction in the Polar Shrimp *Chorismus Antarcticus* [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1982, 9: 81-90.
- [9] WEN X B, CHEN L Q, ZHOU Z L, et al. Reproduction Response of Chinese Mitten-Handed Crab (*Eriocheir Sinensis*) Fed Different Sources of Dietary Lipid [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 131(3): 675-681.
- [10] 丰浪. 高不饱和脂肪酸(HUFA)对三疣梭子蟹卵巢发育、内分泌激素以及组织生化组成的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- [11] CAVALLI R O, TAMTIN M, LAVENS P, et al. Variations in Lipid Classes and Fatty Acid Content in Tissues of Wild *Macrobrachium Rosenbergii* (de Man) Females during Maturation [J]. *Aquaculture*, 2001, 193(3-4): 311-324.
- [12] TAIPALE S J, BRETT M T, PULKKINEN K, et al. The Influence of Bacteria-Dominated Diets on *Daphnia Magna* Somatic Growth, Reproduction, and Lipid Composition [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 82(1): 50-62.
- [13] 李兴鹏,宋丽文,陈越渠,等. 不同脂肪源人工饲料对蠨螋生长发育及生殖力的影响 [J]. 林业科学, 2018, 54(6): 85-93.
- [14] 张丽莉. 不同脂肪源饲料对龟纹瓢虫(*Propylaea japonica*)生长、繁殖和捕食效应的影响 [D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [15] ARIENY, DAGA, YONAS, et al. Effect of Diet Lipids and Omega-6: 3 Ratio on Honey Bee Brood Development, Adult Survival and Body Composition [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2020, 124: 104074.
- [16] MOADELI T, MAINALI B, PONTON F, et al. Effects of Fatty Acids and Vitamin E in Larval Diets on Development and Performance of Queensland Fruit Fly [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2020, 125: 104058.

- [17] LING L, KOKOZA V A, ZHANG C Y, et al. MicroRNA-277 Targets *Insulin-Like Peptides 7 and 8* to Control Lipid Metabolism and Reproduction in *Aedes Aegypti* Mosquitoes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(38): E8017-E8024.
- [18] GUTIERREZ E, WIGGINS D, FIELDING B, et al. Specialized Hepatocyte-Like Cells Regulate Drosophila Lipid Metabolism [J]. Nature, 2007, 445(7125): 275-280.
- [19] 沈卫德, 胡雨亭. 影响家蚕脂肪体增长的若干因素 [J]. 中国蚕业, 1999, 20(4): 13-15.
- [20] JOUNIZE, TAKADAN, GAZARDJ, et al. Transfer of Cholesterol and Diacylglycerol from Lipophorin to Bombyx *Mori* Ovarioles in Vitro: Role of the Lipid Transfer Particle [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33(2): 145-153.
- [21] 陆春霞, 廖森泰, 韦廷秀, 等. 3 个现行家蚕品种的蚕蛹油脂脂肪酸组成测定 [J]. 蚕业科学, 2015, 41(6): 1137-1141.
- [22] 张雨丽, 刘艳伟, 陆侯伽, 等. 全龄人工饲料育与全龄桑叶育的蚕蛹和蚕沙营养成分检测 [J]. 蚕学通讯, 2021, 41(1): 38-42.
- [23] 杨芹, 过立昶, 陈海琴, 等. 蚕蛹脂肪酸和游离氨基酸组成及分布特征分析 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(23): 351-356, 366.
- [24] 孟祥河, 潘秋月, 何晋浙, 等. 桑蚕蛹的脂质营养组成 [J]. 营养学报, 2009, 31(3): 281-284.
- [25] 蔡沙, 何建军, 施建斌, 等. 蚕蛹油的提取及其组分分析 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(8): 239-243.
- [26] KOTAKE-NARAE, YAMAMOTOK, NOZAWAM, et al. Lipid Profiles and Oxidative Stability of Silkworm Pupal Oil [J]. Journal of Oleo Science, 2002, 51(11): 681-690.
- [27] TOMOTAKE H, KATAGIRIM, YAMATO M. Silkworm Pupae (*Bombyx Mori*) are New Sources of High Quality Protein and Lipid [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2010, 56(6): 446-448.
- [28] YAMAUCHI H, YOSHITAKE N. Developmental Stages of Ovarian Follicles of the Silkworm, *Bombyx Mori* L [J]. Journal of Morphology, 1984, 179(1): 21-31.
- [29] NAKASONE S, ITO T. Fatty Acid Composition of the Silkworm, *Bombyx Mori* L [J]. Journal of Insect Physiology, 1967, 13(8): 1237-1246.
- [30] SRIDHARA S, BHAT J V. Lipid Composition of the Silkworm *Bombyx Mori* L [J]. Journal of Insect Physiology, 1965, 11(4): 449-462.
- [31] NAKASONE S. Utilization of Fatty Acids for Oogenesis of the Silkworm, *Bombyx Mori*, during Pupal Stage [J]. The Journal of Sericultural Science of Japan, 1978, 47(3): 231-238.
- [32] SHOICHIN A K A S O N E. Changes in Lipid Components during the Embryonic Development of the Silkworm, *Bombyx Mori* [J]. The Journal of Sericultural Science of Japan, 1979, 48(6): 526-532.
- [33] KAWOoya J K, LAW J H. Role of Lipophorin in Lipid Transport to the Insect Egg [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(18): 8748-8753.
- [34] ZIEGLER R. Lipid Synthesis by Ovaries and Fat Body of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) [J]. European Journal of Entomology, 2013, 94: 385-391.

责任编辑 孙文静

崔玉洁