



Title	サクサン休眠蛹の越冬適温 : 妖性の観点から
Author(s)	勝野, 貞哉; KATSUNO, Sadaya
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(3), 263-276
Issue Date	1989-03-30
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/12102">https://hdl.handle.net/2115/12102</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(3)_p263-276.pdf



# サクサン休眠蛹の越冬適温

— 妊性の観点から —

勝野貞哉

(北海道大学農学部蚕学講座)

(昭和63年12月26日受理)

## The Optimal Temperature of Hibernation for the Diapausing Pupae of *Antheraea pernyi*

— From the Point of View of Fertility —

Sadaya KATSUNO

(Laboratory of Sericology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

倉沢・小山<sup>6)</sup>は寒冷地域に当る長野県においては、サクサンの種繭すなわち休眠蛹の越冬期間中の保護場所は、発蛾調節の必要がなければ一般屋内で十分であることを報告している。事実、長野県蚕業試験場有明天柞蚕試験地においては、種繭は屋内自然温度条件下に保護しており、また寒冷地域に当る札幌においても同様である。しかし冬期間の屋内自然温度が比較的高い暖地では、越冬期間中における種繭の保護適温を定めておくことが必要と考えられる。また以上のような実用的見地ばかりでなく、サクサン休眠蛹の越冬温度と妊性との関係を明らかにすることは、生殖生理学的見地からも重要な課題である。著者は1984年より1988年にわたり、サクサン休眠蛹の越冬適温について妊性の観点から検討を行ったほか、休眠覚醒および越冬期間中における感温時期についても検討を行ったので併せてその結果を報告する。

### I. 休眠雄蛹の越冬適温範囲

休眠蛹の越冬適温を定めるためには、まず適温範囲を定める必要がある。その端緒として雄蛹を対象として検討を行った。

#### 1. 材料および方法

供試材料は、1984年有明天柞蚕試験地において、クヌギ (*Quercus acutissima* CARRUTH) で飼育し、7月上~中旬に吐糸をはじめた1化期のサクサンを用い、化蛹後は試験開始まで札幌にて屋内自然温度に保護し休眠を確認した。試験開始の1984年11月21日より1985年3月

31日までの131日間を越冬期間とした。この期間中の屋内自然温度は-5~10°Cで、12月15日から2月5日までの53日間は-5~5°Cであった。

#### (1) 孵化率

試験区は、休眠雄蛹の越冬期間中における処理温度の相違により、Fig. 1に示すとおりA~Fの各処理区および対照区(屋内自然温度保護区)の7区を設けた。各区の雄蛹は4月1日から2日間は10°Cに保護し、その後は羽化するまで25°Cに保護した。各区の雄蛹から羽化した雄蛾は屋内自然温度に保護した休眠雌蛹から羽化した雌蛾と交配させ、産下卵は個別とし、各区とも6ペアについて次代卵の孵化率を調べた。

#### (2) 精子形成および異常生殖細胞

対照区および4.5±0.5°C処理区(A区)を対象とし、

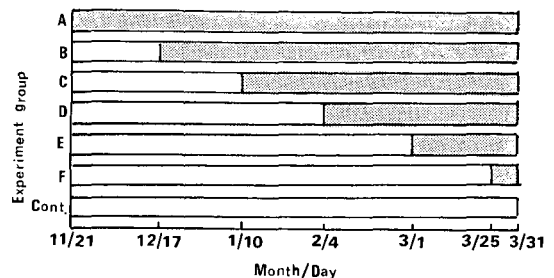


Fig. 1. Preservation temperature in hibernation period of the diapausing male pupae.

Semi-solid bands: 4.5±0.5°C, Open bands: normal room temperature.

両区ともに11月21日の蛹が羽化するまでの期間中、次の時期に精巣を Bouin 液で固定し、常法によりパラフィン切片とし、Delafield's haematoxylin と eosin との複染色を施した。すなわち、両区ともに精巣の固定は、11月21日、12月17日、1月10日、2月4日、3月1日および25日に、さらに4月1日加温後5、10、15、20および25日目(成虫)に行った。なお、 $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  処理区における精巣の組織標本は、殆どの切片で生殖細胞に異常がみられたので、これらの切片を観察の対象とした。

## 2. 結果と考察

### (1) 孵化率

平均産卵数  $\pm 95\%$  信頼区間は、A区  $175.7 \pm 26.8$ 、B区  $167.7 \pm 27.1$ 、C区  $176.7 \pm 41.9$ 、D区  $177.5 \pm 29.5$ 、E区  $187.5 \pm 48.8$ 、F区  $183.8 \pm 43.7$  および対照区  $178.0 \pm 44.8$  で各区分に有意差は認められなかった。この理由は、各区分で交配に用いた雌蛾は屋内自然温度に保護した休眠雌蛾から羽化したものを任意に用いたこと、さらに雌蛾は斃死するまで産卵を継続させたため、形成された卵は受精・不受精に関係なく殆どが産下されており、雄蛾の影響はなかったことによる。

孵化率は Fig. 2 に示すとおり、雄蛹の  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  処理期間が長いほど、すなわち屋内自然温度保護期間が短いほど低い傾向を有し、特に越冬期間中  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  の恒温で処理すると孵化率は著しく低下した。孵化率の高いD、E、F区および対照区は、いずれの区の雄蛹も越冬期間中  $-5 \sim 5^\circ\text{C}$  の変温に53日間継続して接していた。以

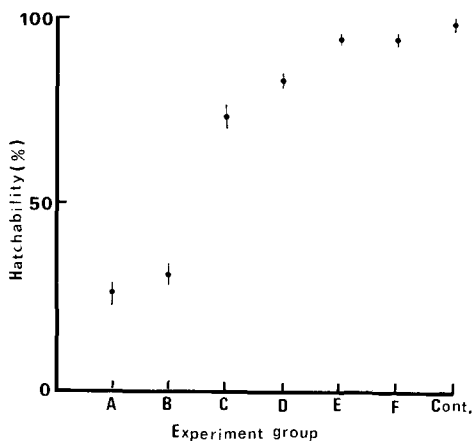


Fig. 2. The hatchability of the eggs deposited by female adults which had been mated with male adults from each experimental group.

↓ : Average  $\pm 95\%$  confidence limits.

上の結果から、次代卵の孵化率の点からみると、休眠雌蛹の越冬適温範囲は  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  以下であると言える。交配に用いた雌蛾は上記のとおり同一条件下のものを用いており、したがって各区分で孵化率に高低のみられた原因は雌蛾にあることは明らかである。

サクサン休眠蛹の越冬適温と羽化との関係については、山崎ら<sup>14)</sup>、および田中<sup>12)</sup>の報告がある。これらの報告を総括すると、サクサン休眠蛹の羽化に対する越冬適温は  $-5 \sim 5^\circ\text{C}$  の範囲内にある。田中<sup>12)</sup>はサクサン休眠蛹を越冬期間中  $5^\circ\text{C}$  で処理した場合、羽化率は最も高いことを報告している。一方、今回の実験でサクサン休眠蛹を  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  の恒温で処理すると、次代卵の孵化率は著しく低下したことから、羽化と妊性に対する越冬適温は必ずしも一致しないと言える。このことは、変態と精子形成機構とは異なっていることを示している。越冬温度と妊性との関係については、山崎ら<sup>15)</sup>がサクサン休眠蛹を2~3月の2カ月間を  $2.5^\circ\text{C}$  で処理した場合、次代卵は殆どが孵化することを報告している。以上結果ならびに考察から、休眠雌蛹の羽化と妊性に対して共通する越冬適温範囲は  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  以下であると考えられる。

### (2) 精子形成および異常生殖細胞

上記のとおり、休眠雌蛹の越冬温度は妊性に影響をおよぼすことが明らかとなった。そこでこの原因を解明するための端緒として、対照区と  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  処理区における精子形成および異常生殖細胞について検討した。

両区ともに、将来、有核精子を形成する精母細胞と無核精子を形成するそれとの成熟分裂像は異なっていることは、カイコの場合と同様であった (Fig. 3)。したがって成熟分裂像の相違により、成熟分裂期の精母細胞は有核精母細胞と無核精母細胞とに区別された。

#### 1) 対照区

##### i) 精子形成

11月21日の蛹から成虫に至るまでの、精室内における成熟分裂期の精母細胞からなる細胞嚢および精子束の量的消長は Fig. 4 に示すとおりである。すなわち、成熟分裂期の有核精母細胞からなる細胞嚢は既に11月21日の蛹で多数みられ、この状態は2月4日まで継続していた。これらの結果は、2化期のサクサン休眠蛹における成熟分裂期の精母細胞は1~2月に多数観察されるという川口<sup>5)</sup>の報告と一致する。銭・馮<sup>10)</sup>は、2化期の休眠型サクサンでは5齢10日目に成熟分裂期の有核精母細胞がみえはじめることを報告している。したがって成熟分裂期の有核精母細胞からなる細胞嚢は、5齢幼虫から11月21日の蛹に至るまでの期間中に多数存在してい

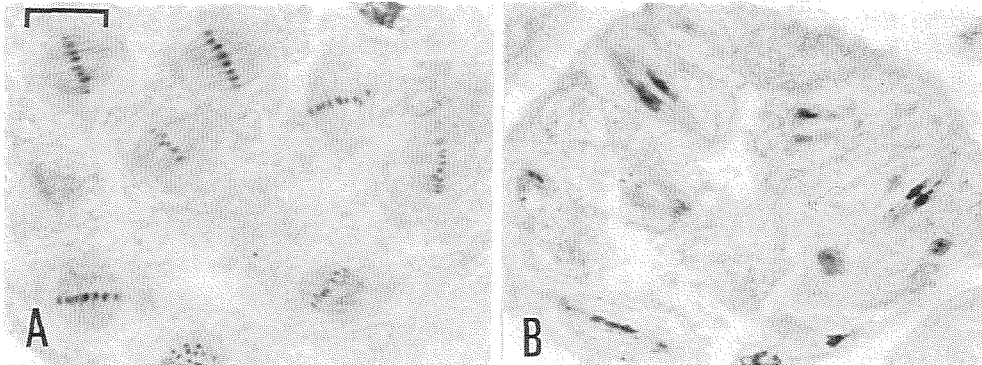


Fig. 3. The 1st meiotic division of the spermatocytes in the pupa on the 5th day of incubation in the Control group.

A: Eupyrene spermatocyte, B: Apyrene spermatocyte. Scale A, B: 10 μm.

たものと推察される。本研究にて、これらの細胞嚢は温度が上昇する3月1日および25日における蛹では減少したが、加温後5日目の蛹では再びみられるようになり、その後は有核精子束への移行に伴って減少した。したがって有核精母細胞における成熟分裂時期は2段階に区別された。次に有核精子束は11月21日の蛹で既に多数みられ、この状態は加温後5日目まで継続していた。WAKU<sup>13)</sup>は1化期の休眠型サクサンにおいて、化蛹時に少数の有核精子束を観察していることから、化蛹時頃から有核精子が形成されたものと言える。しかし本研究にて多数の有核精子束は加温後10日目の蛹では減少したが、15日目に再び多数みられ、20日目から成虫に至るまでは多数のものが精室から小輸精管内へ脱出した。したがって有核精子の形態形成時期も、有核精母細胞における成熟分裂時期と同じく2段階に区別された。これに対し、無核精母細胞における成熟分裂時期および無核精子の形態形成時期は有核精子の場合と異なり、いずれの時期も2段階に区別されることはなかった。すなわち、成熟分裂期の無核精母細胞からなる細胞嚢は加温後5日目の蛹で多数観察され、その後は無核精子束への移行に伴って徐々に減少した。したがって無核精子束は加温後10日目の蛹で多数みられ、5日目から10日目に至るまでは少数のものが精室から小輸精管内へ脱出しはじめ、20日目から25日目に至るまでは多数のものが精室から脱出することにより、精室内の無核精子束は減少した。

以上の結果から、最初に形成された多数の有核精子は加温後10日目までの蛹において退化し、これに代って加温後5日目以降の蛹でみられた成熟分裂期の有核精母細胞から有核精子が再形成されたものと考えられる。したが

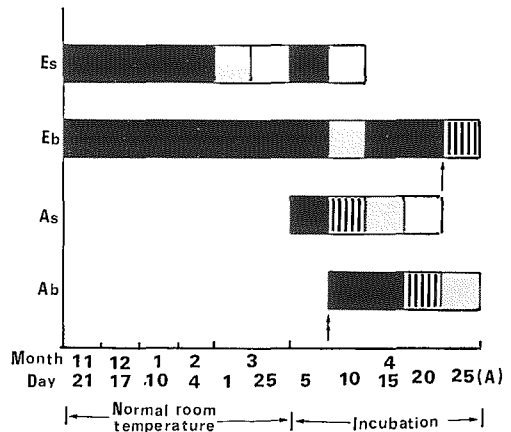


Fig. 4. Schematic illustration of quantitative changes of the spermatocyst and sperm bundles in the Control group.

Eupyrene (Es) and apyrene spermatocyst (As) at the stage of meiotic division. Eupyrene (Eb) and apyrene sperm bundles (Ab). (A): Adult.

Single arrow: The time at which the eupyrene spermatozoa initially get out from the testicular follicle.

Double arrow: Indicates the same point for the apyrene spermatozoa.

Amount: (a large number)

■ > ▨ > ▩ > □ (a small number)

って加温後15日目の蛹で有核精子が多数みられた。すなわち再形成された有核精子は、蛹期に成熟分裂を終了した精母細胞から形成されたものと言える。カイコの場合は、無核精子は有核精子より遅く形成されるが<sup>2)</sup>、サ

クサン休眠蛹の場合は、上述の結果から、無核精子は再形成された有核精子より早く形成されていることになる。

ii) 異常生殖細胞

11月21日の蛹が成虫に至るまでの発育過程における精室内の異常生殖細胞は次のとおりであった。

- a) 異常精原細胞：ピクノーシス核が存在する。すなわちピクノーシス精原細胞
- b) 異常精原細胞囊：ピクノーシス精原細胞からなる細胞囊
- c) 異常精母細胞囊 I：ピクノーシス核を有する精母細胞からなる細胞囊
- d) 異常精母細胞囊 II：囊内の細胞の配列が不定のもの、および囊内に各種の異常形態物質または空胞部分が存在するもの
- e) 異常精子細胞囊：不定形の細胞によって構成される
- f) 異常有核精子束 I：頭部が膨大し、大きな顆粒を有する
- g) 異常有核精子束 II：大きな顆粒が尾部に存在する
- h) 異常有核精子束 III：尾部に太い繊維状物質が散在する

钱・冯<sup>10)</sup>は、2化期の休眠型サクサンにおいて生殖細胞に著しい退化がみられることを報告している。すなわち、2齢期から5齢期に至るまでの期間中に、異常精原細胞および異常精母細胞を観察している。本研究では、異常精原細胞および異常精原細胞囊は11月21日の蛹から成虫に至るまでの期間中に精室上部にみられたが、加温後4日目の蛹に多少多くみられる以外は極めて少数みられるのにすぎなかった。異常精母細胞囊 I は11月21日の蛹で精室側壁に沿ってみられ、特に3月1日および25日に極めて多く (Plate I-1)、加温後の蛹では急速に退化した。異常精母細胞囊 II は11月21日以降の蛹において精室の上・中部に正常の精母細胞囊に混在して少数みられ、3月1日および25日に多少増加し (Plate I-2)、加温後の蛹では急速に退化した。なお钱・冯<sup>10)</sup>は、精母細胞の退化は減数分裂以前に起ることを報告している。本研究においては異常成熟分裂像は認められなかったが、成熟分裂期の有核精母細胞からなる細胞囊は、前述のとおり3月1日および25日の蛹で減少が認められた。これらの結果から、減数分裂以前の精母細胞の1部は、3月に温度が上昇する時期の蛹で退化したものと考えられる。今後さらに精母細胞に異常分裂像がみられるか否

かを明らかにする必要がある。異常精子細胞囊は、11月21日以降の蛹において精室下部にみられ、1月10日から3月25日までの期間中に増加し、加温後の蛹では急速に退化した。異常有核精子束 II は3月25日の蛹において精室下部に少数みられ、加温後10日目では蛹は異常有核精子束 I, II および III が多数みられた (Plate I-3)。この時期は上述のとおり正常な有核精子束の減少期に当たっている。また、このうち I は異常精母細胞囊 I に由来することは、カイコの場合<sup>1)</sup>と同様であった。以上の生殖細胞の異常ならびにその退化は、3月1日から加温10日目までの蛹で、多数の生殖細胞の退化物が精室内にみられたことから裏付けされた。なお異常無核精子束は認められなかった。

以上のとおり屋内自然温度条件下の休眠雄蛹では、休眠期間中および加温後の蛹が羽化に至るまでの期間中、精室内に極めて多数の異常生殖細胞が観察された。しかしながら前述のとおり有核精子が再形成され、加温後19日目の蛹では、多数の有核精子束が基底膜上にみられ、小輸精管内には多数の無核精子がみられた (Plate I-4)。なお成虫の小輸精管内には、多数の正常な有核精子束および無核精子が観察された。したがって上記の多数の異常生殖細胞は、有核精子の再形成に対し何らかの役割を果たしているものと考えられる。ただし異常生殖細胞の無核精子形成に対する役割は、有核精子形成の場合と同様であるか否かは明らかでない。

サクサン以外の、蛹で休眠する鱗翅目昆虫における生殖細胞の異常ならびにその退化については2~3の研究者によって報告されている。すなわち SCHMIDT and WILLIAMS<sup>11)</sup>は、*Hyalophola cecropia* の休眠雄蛹における生殖細胞の一部は前蛹期において伸長したものがみられたが、その後これらの細胞は退化し、休眠期には第1次精母細胞までのものがみられ、休眠覚醒後、急速に成熟分裂が行われ精子に発育することを報告している。また NUMATA and HIDAKA<sup>9)</sup>は休眠型 *Papilio xuthus* にて、5齢1日目には球形の精子細胞は退化しはじめ、5齢4日目で精子形成は完全に停止し、蛹期では凡ての精子細胞囊および精子束は退化することを報告している。さらに退化の原因は精子形成の抑制よりは、むしろ休眠プログラムの重要な過程の一部ではないかと推定している。休眠型 *P. xuthus* におけるこのような現象は NISCHITSUTSUJI-UWO<sup>7)</sup>によっても報告されている。さらに同氏<sup>8)</sup>は、生殖細胞の退化の原因について、精巢および内分泌器官の移植を行って検討した。しかしその原因は明らかでなく、多分、成長分化ホルモ

ンの欠如によるものと推定している。本研究の休眠型サクサンにおける生殖細胞の異常ならびにその退化は *H. cecropia* や *P. xuthus* におけるそれと近似していた。以上の結果ならびに報告から、生殖細胞の異常ならびにその退化は蛹休眠と密接な関係を有するものと考えられる。

2)  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  処理区

i) 精子形成

蛹期間中の精室内における成熟分裂期の精母細胞からなる細胞嚢および精子束の量的消長は Fig. 5 のとおりである。すなわち成熟分裂期の有核精母細胞からなる細胞嚢は、前述のとおり 11 月 21 日の蛹で多数みられたが、12 月 17 日から 1 月 10 日までの期間中に減少し、その後は極めて少数みられるにすぎなかった。次に有核精子束は 11 月 21 日から 3 月 25 日までの蛹で多数みられ、その後は成虫に至るまで次第に減少した。また加温後 15 日目から 20 日目までの蛹においては、有核精子束は精室から小輪精管内へ脱出しはじめたが、成虫の小輪精管内には極めて少数みられるにすぎなかった。これに対し成熟分裂期の無核精母細胞からなる細胞嚢は、加温後 10 日目の蛹で多数みられ、15 日目には正常な無核精子束および後述する異常無核精子束への移行に伴って減少した。正常な無核精子束は、加温後 10 日目から 15 日目までの蛹において、精室から小輪精管内へ脱出しはじめ、したがって精室内の正常な無核精子束は、加温後 15 日目の蛹から成虫に至る間に次第に減少した。

ii) 異常生殖細胞

異常精原細胞、異常精原細胞嚢および異常精母細胞嚢

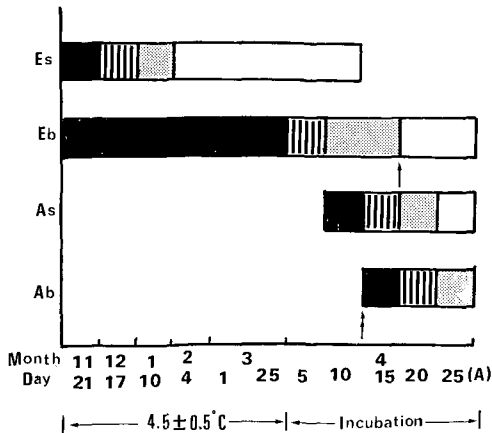


Fig. 5. Schematic illustration of quantitative changes of the spermatocytal cysts and sperm bundles in the  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  group. For explanation see Fig. 4.

I の量的消長は対照区の場合とほぼ同様であった。これに対し異常精母細胞嚢 II は 11 月 21 日の蛹で、正常な精母細胞嚢に混在して少数みられ、その後は急速に増加し、2 月 4 日から加温後 4 日目までの蛹では、精室の上方より精室の 3/1~2/1 を占めるようになり極めて特異的であった (Plate II-5)。この細胞嚢は加温後 10 日目以降の蛹では急速に退化し、退化物質と思われる顆粒物質が多数みられた (Plate II-6)。異常成熟分裂像は認められなかったが、成熟分裂期の有核精母細胞からなる細胞嚢は、上述のとおり 1 月 10 日以降の蛹では少数みられるにすぎなかった。異常精子細胞嚢は、加温後 15 日目の蛹から成虫に至るまでかなり多数みられた。異常有核精子束 I, II および III は、加温後 10 日目の蛹において精室の中・下部に多数みられ、このうち III は加温後 20 日目の蛹から成虫に至る間に顕著であった。これらの異常有核精子束が多数みられる時期は、上述の正常有核精子束の減少期に当たっている。なお対照区の場合と異なり、加温後 15 日目から 20 日目の蛹では、異常有核精子束のほか散在核を有する球形の異常無核精子束が精室下部に集中し (Plate II-7)、成虫では多少減少したが多分退化によるものと思われる。この異常無核精子束は、カイコにて、成熟分裂期の無核精母細胞が多数存在する化蛹初期の蛹を高温処理した場合にみられたものと同様な形態を呈していた<sup>3)</sup>。加温後 20 日目以後の蛹では精室内に正常な有核精子束は極めて少なく、各種の異常生殖細胞が混在し、極めて特異的な状態を呈していた (Plate II-8)。なお加温後 15 日目以後の蛹の小輪精管内には無核精子は多数認められたが、有核精子束は極めて少なかった。以上の結果、サクサン休眠蛹を、越冬期間中  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  の恒温で処理すると生殖細胞は加温前の蛹において異常を呈して退化しはじめ、加温後も引き続いて退化した。しかし対照区の場合と異なり、正常な有核精子の再形成は認められなかった。すなわち、越冬期間中、休眠蛹を  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  の恒温で処理すると妊性が著しく低下したが、その直接的な原因は精子形成の異常によることが明らかとなった。

3. 結論

サクサン休眠雄蛹の越冬期間中における保護温度と妊性との関係について検討した。その結果、休眠雄蛹を  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  の恒温で処理すると妊性は著しく低下し、妊性からみた越冬適温範囲は  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  以下であることを、次代卵の孵化率、精子形成および異常生殖細胞の面から明らかにした。

## II. 休眠蛹の越冬適温

I項の結果から、休眠雄蛹の越冬適温範囲は $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 以下であることが明らかとなった。そこで今回は、休眠雄蛹および雌蛹の越冬適温について検討した。

### 1. 材料および方法

供試材料は、1985年札幌にてミヅナラ (*Quercus mongolica* var. *grosseserrata*) で飼育し、7月上旬から8月上旬に吐糸をはじめた1化期のサクサンを用い化蛹後は試験開始まで屋内自然温度に保護し休眠を確認した。試験開始の1985年11月21日より1986年3月31日までの131日間を越冬期間とした。この間における屋内自然温度は $-5.0 \sim 8.5^\circ\text{C}$ で12月5日から3月15日までの101日間は $-5 \sim 5^\circ\text{C}$ であった。試験区は雄蛹および雌蛹を上記の131日の期間中、それぞれ $8^\circ\text{C}$ 、 $5^\circ\text{C}$ 、 $2.5^\circ\text{C}$ 、 $0^\circ\text{C}$ 、 $-5^\circ\text{C}$ で処理した区および対照区(屋内自然温度保護区)の各6区とした。処理後の各区の雄蛹および雌蛹の保護温度は4月1日より徐々に上げて2日間で $25^\circ\text{C}$ とし、その後は羽化するまでそのまま保護した。各区の雄蛹および雌蛹から羽化した雄蛾および雌蛾は、それぞれ屋内自然温度に保護した雌蛹および雄蛹から羽化した雌蛾および雄蛾と交配させた。なお産下卵は個別別とし、各試験区それぞれ6~10頭を対象として、産卵数、造卵数および次代卵の孵化率について検討した。

### 2. 結果と考察

#### (1) 雄蛹の処理温度と次代卵の孵化率との関係

$-5^\circ\text{C}$ 処理区の雄蛹は羽化前にすべて死亡した。 $8^\circ\text{C}$ 処理区の雄蛹から羽化した雄蛾は腹部が膨大し、行動は緩慢で交尾は不能であった。したがって観察は $5^\circ\text{C}$ 、 $2.5^\circ\text{C}$ 、 $0^\circ\text{C}$ 処理区および対照区の4区を対象として行った。各区からの雄蛾と交配した雌蛾の平均産卵数 $\pm 95\%$ 信頼区間は、 $5^\circ\text{C}$ 処理区 $178.3 \pm 17.3$ 、 $2.5^\circ\text{C}$ 処理区 $192.0 \pm 15.5$ 、 $0^\circ\text{C}$ 処理区 $150.4 \pm 43.3$ および対照区 $169.9 \pm 23.3$ で各区間に有意差はみられなかった。この理由はI項の場合と同様である。孵化率はFig. 6に示すとおりで、 $2.5^\circ\text{C}$ 処理区が最も高く、 $5^\circ\text{C}$ 処理区が最も低かった。 $0^\circ\text{C}$ 処理区と対照区では有意差は認められなかった。またI項と同様な理由により、孵化率に高低のみられた原因は雄蛾にある。したがって休眠雄蛹の越冬適温は $2.5^\circ\text{C}$ であることが明らかとなった。

#### (2) 雌蛹の処理温度と産卵数、造卵数および次代卵の孵化率との関係

$-5^\circ\text{C}$ 処理区の雌蛹は羽化前にすべて死亡した。 $8^\circ\text{C}$ 処理区の雌蛹から羽化した雌蛾は、上記の雄蛾の場合と

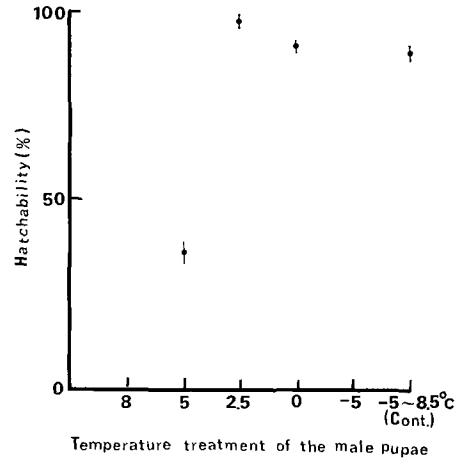


Fig. 6. The hatchability of the eggs against the temperature of hibernation experienced by the male pupae.

†: Average  $\pm 95\%$  confidence limits.

同様に膨部は膨大し行動は緩慢であったが、交配に用いた正常な雄蛾の行動により受動的に交尾した。したがって観察は $8^\circ\text{C}$ 、 $5^\circ\text{C}$ 、 $2.5^\circ\text{C}$ 、 $0^\circ\text{C}$ 処理区および対照区の5区を対象として行った。

#### 1) 産卵数

Fig. 7に示すとおり、 $8^\circ\text{C}$ 処理区は他区に比べて産卵数は極めて少なく有意差がみられたが、他区間では有意差はみられなかった。この結果は、各区で交配に用いた雄蛾は、同一条件下のものであるため、雌蛾に原因していることは明らかである。

#### 2) 造卵数

産卵後、雌蛾体内の残留卵を数え、産卵数と合わせて造卵数とした。各区の造卵数に対する残留卵の平均比率 $\pm 95\%$ 信頼区間は、 $8^\circ\text{C}$ 処理区 $75.4 \pm 3.2\%$ 、 $5^\circ\text{C}$ 処理区 $6.6 \pm 1.3\%$ 、 $2.5^\circ\text{C}$ 処理区 $1.4 \pm 0.6\%$ 、 $0^\circ\text{C}$ 処理区 $4.8 \pm 1.3\%$ および対照区 $1.7 \pm 0.7\%$ で、 $8^\circ\text{C}$ 処理区は極めて高く、他区は低かった。したがってFig. 7に示すとおり、 $5^\circ\text{C}$ 、 $2.5^\circ\text{C}$ 、 $0^\circ\text{C}$ 処理区および対照区の造卵数は産卵数とほぼ平衡しており、各区間に有意差はみられなかった。 $8^\circ\text{C}$ 処理区の造卵数は産卵数に比べて多く、このことは造卵数の中に未完成卵や発育異常卵が含まれているためと思われる。 $8^\circ\text{C}$ 処理区の造卵数は $0^\circ\text{C}$ 処理区のそれとは有意差は認められなかったが、未完成卵や発育異常卵を除き完成卵のみを対象とすれば、 $8^\circ\text{C}$ 処理の造卵数は $0^\circ\text{C}$ 処理区のそれと比べて少ないものと考えられる。

#### 3) 孵化率

Fig. 8に示すとおり、次代卵の孵化率は $2.5^\circ\text{C}$ 処理区

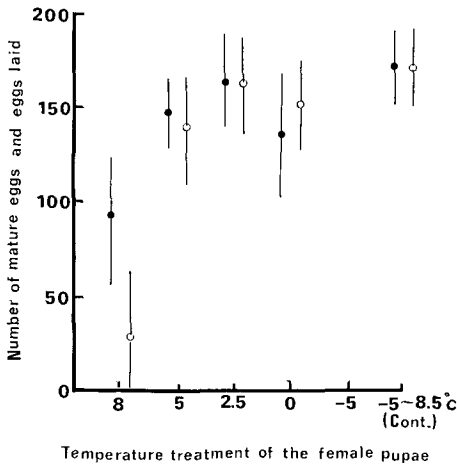


Fig. 7. The number of mature eggs found in the adult female and the number of eggs laid against the temperature of hibernation experienced by the female pupae.

♠ : Average  $\pm 95\%$  confidence limits in number of mature eggs, ♢ : Ditto in number of eggs laid.

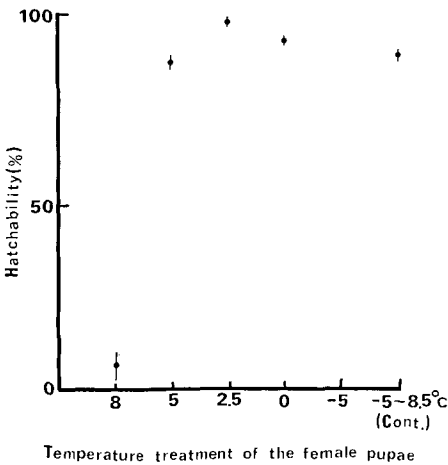


Fig. 8. The hatchability of the eggs against the temperature of hibernation experienced by the female pupae.

♠ : Average  $\pm 95\%$  confidence limits.

が最も高く、0°C 処理区がこれについて高かった。5°C 処理区と対照区間では有意差はみられず、8°C 処理区が最も低かった。したがって休眠雌蛹の越冬適温は2.5°C であることが明らかとなった。

以上の結果、雄蛹および雌蛹ともに越冬適温は2.5°C

であることが明らかとなった。このことは前述のとおり、山崎ら<sup>15)</sup>がサクサン休眠蛹を2~3月の2カ月間を2.5°C で処理した場合、次代卵は殆どが孵化するとの報告を裏付けしている。次に雄蛹および雌蛹を越冬期間中5°C で処理した場合、雌雄によって次代卵の孵化率に相違を生じた原因について考察する。雄蛹を5°C で処理した場合、妊性が著しく低下する原因は、1項の4.5 $\pm$ 0.5°C 処理の結果から、多数の異常ならびに退化生殖細胞の出現によることは明らかである。これに対し雌蛹を5°C で処理した場合は、11月21日の処理当日の蛹の卵管は卵巣から脱出していないか、または僅かに脱出しているにすぎず、3月31日の処理終了日の蛹でも卵管は多少伸長しているのに止まり、卵発育は極めて緩慢であった。しかし処理期間中の卵発育は正常に継続されていることが外部観察から確認され、加温後の蛹では卵は急速に発育し腹腔内に充満した。なお雌蛹を2.5°C および0°C で処理しても、また屋内自然温度に保護しても、卵形成の過程は5°C で処理した場合とほぼ同様であった。以上のことから、越冬期間中、雄蛹を5°C で処理した場合は生殖細胞の発育は異常となるが、雌蛹を5°C で処理した場合のそれは正常であり、その結果、雌雄によって妊性に相違を生じたものと言える。

### 3. 結 論

サクサン休眠雄蛹および雌蛹を越冬期間中、種々の温度で処理して妊性の点から越冬適温について検討した。その結果、次代卵の孵化率の面から、雌雄蛹ともに越冬適温は2.5°C であることが明らかとなった。

### III. 休 眠 覚 醒

II 項の結果から、サクサン休眠蛹の越冬適温は雌雄ともに2.5°C であることが明らかとなった。今回は休眠覚醒のために要する2.5°C 処理期間について検討した。

#### 1. 材料および方法

供試材料は、1986年有明天柞蚕試験地においてクヌギで飼育し7月上~中旬に吐糸をはじめた1化期のサクサンを用い、化蛹後は試験開始まで札幌にて屋内自然温度に保護し休眠を確認した。試験は1986年11月10日に開始した。すなわち、雌雄蛹をそれぞれ2.5°C で30, 50, 70, 90, 100, 130 および150日間処理した7区を設け、処理後は雌雄蛹の保護温度を徐々に上げて2日間で25°C とし、その後は羽化するまでそのまま保護した。今回、雌雄蛹について加温後羽化に至るまでの期間および雌蛹については、このほかに処理期間と造卵数との関係について検討した。供試頭数は各区12~16頭とした。なお

このほかに、信州大学繊維学部で飼育して得られた材料についても実験を行ったが、上記の材料を用いた場合とほぼ同様な結果を得たので、これについては省略することとした。

## 2. 結果と考察

### (1) 加温後の蛹が羽化に至るまでの期間

雄蛹の場合は Fig. 9 に示すとおりである。すなわち、130 日および 150 日間処理区は、加温後の蛹が羽化に至るまでの期間に有意差は認められず、かつ両区ともに 95% 信頼区間の幅は狭く、全個体が羽化するまでの期間は、加温後 27 日目から 35 日目までの 9 日間の短期間であった。100 日間処理区と 130 および 150 日間処理区との間には、加温後の蛹が羽化するまでの期間に有意差は認められなかった。しかし 100 日間処理区の 95% 信頼区間の幅は広く、全個体が羽化するまでの期間は、加温後 27 日目から 87 日目までの 61 日間の長期間に互り、個体によるばらつきが大きかった。また 100 日間以下の各処理区では加温後の蛹が羽化に至るまでの期間には有意差は認められなかったが、いずれの区でも 95% 信頼区間の幅は広く、すなわち全個体が羽化するまでの期間は長く、個体によるばらつきが大きかった。雌蛹の場合は Fig. 9 のとおりで、雄蛹の場合とほぼ同様な傾向がみられた。なお処理期間の長短に関係なくすべての蛹は羽化した。以上の結果、加温後の蛹が羽化するまでの期間の長短を考慮すると、休眠覚醒のためには雌雄蛹ともに 2.5°C で

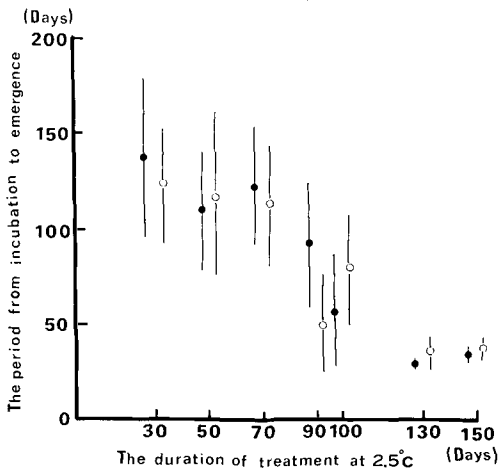


Fig. 9. The relationship between the duration of treatment at 2.5°C and the period from incubation to emergence of the male and female pupae.

♠ : Average  $\pm$  95% confidence limits in male pupae.

♢ : Ditto in female pupae.

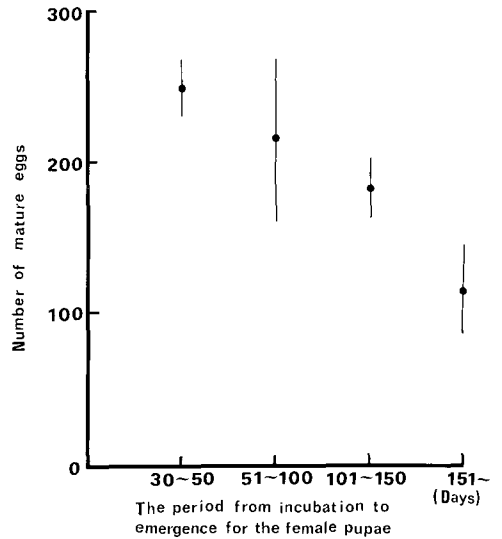


Fig. 10. The relationship between the period from incubation to emergence for the female pupae and the number of mature eggs found in the adult.

♠ : Average  $\pm$  95% confidence limits.

130~150 日間、すなわち 4~5 カ月間の処理が必要であることが明らかとなった。山崎ら<sup>15)</sup>はサクサン蛹の休眠性は微弱で、本格的な寒気に接触しなくても羽化するが、越冬期の低温に接触して初めて本格的な休眠覚醒が起ることを報告している。またこの事実を上記のとおり、短期間の 2.5°C 処理の場合でもすべての蛹は羽化することを裏付けている。

### (2) 加温後の雌蛹が羽化に至るまでの期間と造卵数との関係

各処理区の枠を除き、加温後の雌蛹が羽化に至るまでの期間を 30~50、51~100、101~150 日間および 151 日間以上の 4 区に分け、各区の羽化した雌蛾の造卵数の多寡について検討した。なお各区の雌蛾数はそれぞれ 52、9、24 および 14 頭であった。その結果は Fig. 10 に示すとおりで、加温後の蛹が羽化に至るまでの期間が短いほど、すなわち Fig. 9 の結果から、長期間 2.5°C で処理した個体ほど造卵数が多い傾向がみられた。

## 3. 結論

サクサン休眠蛹の休眠覚醒のためには、休眠蛹を 2.5°C で 4~5 カ月間の処理が必要であることが明らかになった。さらに休眠雌蛹では加温後の蛹が羽化に至るまでの期間が短い個体ほど、すなわち 2.5°C 処理期間が長いものほど造卵数が多い傾向がみられた。

IV. 休眠雄蛹の越冬期間中における感温時期

II 項の結果から、休眠蛹の越冬適温は 2.5°C で、5°C では著しい雄性不妊現象がみられることが明らかとなった。また III 項の結果から、休眠覚醒のためには、休眠蛹は 2.5°C にて 4~5 か月間の処理が必要であることが明らかとなった。そこで今回は、雄蛹の越冬期間中における処理温度を 2.5°C および 5°C とし、越冬期間中、2.5°C と 5°C との温度処理期間を組み合わせることにより、次代卵の孵化率の点から休眠雄蛹の越冬期間中における感温時期について検討した。

1. 材料および方法

供試材料は、1987 年有明天柞蚕試験地においてクヌギで飼育し 7 月上~中旬に吐糸をはじめた 1 化期のサクサンを用い、化蛹後は試験開始まで札幌にて屋内自然温度に保護し休眠を確認した。試験は屋内自然温度が 5°C 近くまで下された 12 月 1 日から開始した。すなわち 1987 年 12 月 1 日から 1988 年 4 月 8 日までの 130 日間を越冬期間とした。この期間中における雄蛹の処理温度および処理期間の違いにより、供試群 I は 5°C 区、A~G 区および 2.5°C 区の 9 区 (Fig. 11)、試験群 II は 2.5°C 区、A'~G' 区および 5°C 区の 9 区とした (Fig. 12)。なお 2.5°C 区と 5°C 区とは両試験群で共通のものである。処理後の各試験群における各区の雄蛹の保護温度は 4 月 9 日より徐々に上げて 2 日間で 25°C とし、以後は羽化するまでそのまま保護した。羽化した各区の雄蛾は、まず上記 130 日間、2.5°C で処理した休眠雄蛹から羽化した雌蛾との交尾の可否について検討した。次にこれら雄蛾と交尾した雌蛾の産下卵は個別別とし、次代卵の孵化率

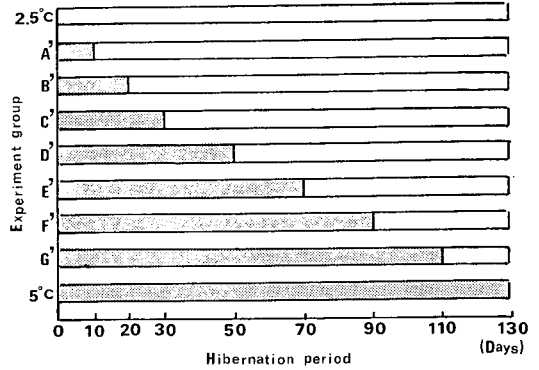


Fig. 12. Experiment group II. For explanation see Fig. 11.

について検討した。なお供試雌蛾数は Table 1 に示した交尾雄蛾数に相応する。

2. 結果と考察

(1) 雄蛾の交尾の可否

Table 1 に示すとおり、交尾不能蛾数は両試験群共通の 5°C 区、試験群 I の A~C 区および試験群 II の G' 区に多かった。すなわち、雄蛹の 5°C 処理期間が 90 日間以上の長期間に互った場合に多かった。なお雄蛹の越冬期間中において、 $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  処理期間が長い場合は次代卵の孵化率は低下し、その原因は生殖細胞の退化によるものであることは I 項で述べたとおりである。したがって雄蛹を 5°C で長期間処理することは、生殖細胞の発育に影響をおよぼすばかりでなく、交尾不能蛾の出現等、その他の生理的異常をもたらす原因になるものと考えられる。

(2) 孵化率

最初に産卵数を調べ、引き続いて次代卵の孵化率について検討した。

試験群 I, II の各区の平均産卵数  $\pm 95\%$  信頼区間は次のとおりであった。すなわち試験群 I の 5°C 区  $182.3 \pm 29.6$ , A 区  $184.4 \pm 35.7$ , B 区  $167.5 \pm 23.4$ , C 区  $188.7 \pm 42.9$ , D 区  $207.2 \pm 27.3$ , E 区  $204.7 \pm 22.1$ , F 区  $233.6 \pm 46.4$ , G 区  $212.9 \pm 49.1$  および 2.5°C 区  $211.0 \pm 37.3$  で各区间に有意差はみられなかった。また試験群 II の各区のそれは、2.5°C 区  $211.0 \pm 37.3$ , A' 区  $187.4 \pm 32.0$ , B' 区  $216.8 \pm 40.7$ , C' 区  $222.3 \pm 41.2$ , D' 区  $192.1 \pm 24.6$ , E' 区  $220.3 \pm 27.1$ , F' 区  $211.8 \pm 29.6$ , G' 区  $199.2 \pm 118.2$  および 5°C 区  $182.2 \pm 29.6$  で各区间に有意差はみられなかった。このように試験群 I, II において、各区间で産卵数に有意差がみられなかった理由は、I 項の場合と同様で

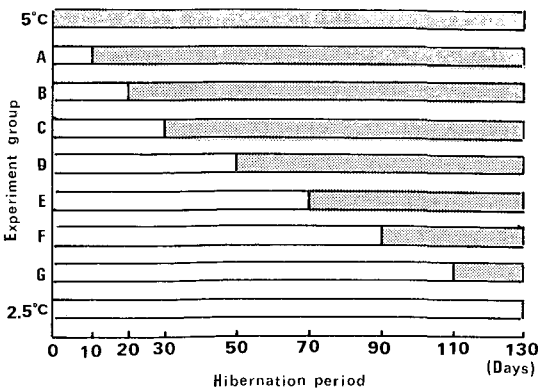


Fig. 11. Experiment group I. Preservation temperature in hibernation period of the diapausing male pupae.

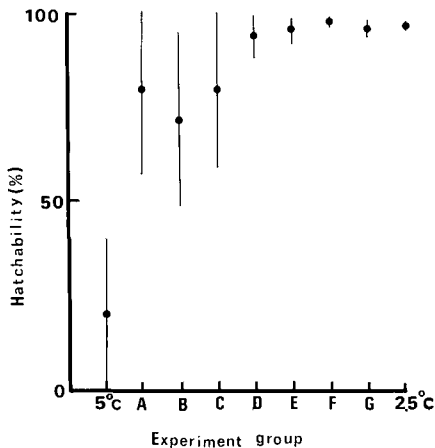
Open bands: 2.5°C, Semi-solid bands: 5°C.

**Table 1.** The relationship between the preservation temperatures in the hibernation periods of the diapausing male pupae in each group and the ability of adult male to copulate with the adult female

Experiment group I				Experiment group II			
Each group	No. of male adults	No. of male adults which could be mated	No. of male adults which could not be mated	Each group	No. of male adults	No. of male adults which could be mated	No. of male adults which could not be mated
5°C	15	10	5	2.5°C	9	9	0
A	13	7	6	A'	12	11	1
B	11	8	3	B'	13	12	1
C	14	10	4	C'	13	13	0
D	10	9	1	D'	12	12	0
E	12	11	1	E'	12	12	0
F	10	9	1	F'	14	12	2
G	11	10	1	G'	12	5	7
2.5°C	9	9	0	5°C	15	10	5

ある。

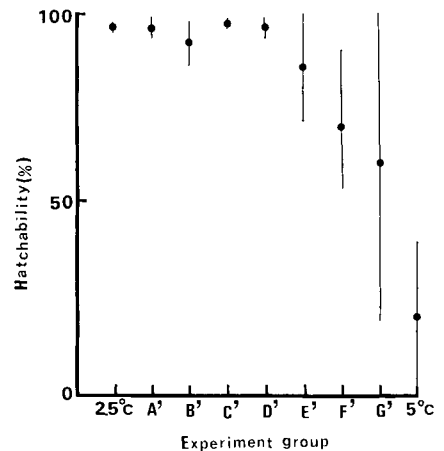
次に試験群 I における次代卵の孵化率は Fig. 13 に示すとおりである。すなわち、A~G 区および 2.5°C 区の各区間に有意差はみられず、これら各区と 5°C 区間には有意差がみられ、5°C 区の孵化率は著しく低かった。しかし 95% 信頼区間の幅からみて、D~G 区および 2.5°C 区は A~C 区に比べ孵化率の高いことは明らかである。これらの結果から、処理開始 50 日目以後の期間を 5°C



**Fig. 13.** Experiment group I. The hatchability of the eggs deposited by female adults which had mated with male adults from each experiment group.

† : Average  $\pm$  95% confidence limits.

で処理しても、それ以前の期間を 2.5°C で処理すれば孵化率は低下しないことが明らかとなった。また試験群 II における次代卵の孵化率は Fig. 14 に示すとおりで、試験群 I と同様に 5°C 区の孵化率は他区に比べて著しく低かった。また試験群 I と同様な理由により、2.5°C 区および A'~D' 区は E'~G' 区に比べて孵化率は高かった。これらの結果から、処理開始から 50 日目までの期間を 5°C で処理しても、その後の期間を 2.5°C で処理すれば孵化率は低下しないことが明らかとなった。このことは 5°C で処理した蛹は、処理開始から 50 日目までは処理当日の状態を維持していることを示している。



**Fig. 14.** Experiment group II. For expansion see Fig. 13.

なお雄蛹を越冬期間の全期間 130 日を 5°C で処理すると、次代卵の平均孵化率 ± 95% 信頼区間は 19.5 ± 20.7% であった (Figs. 13, 14-5°C 区)。しかし前期 10 日間を 2.5°C、後期 120 日間を 5°C で処理した場合のそれは 81.8 ± 24.1% (Fig. 13-A 区)、前期 20 日間を 2.5°C、後期 110 日間を 5°C で処理した場合のそれは 71.7 ± 22.8% (Fig. 13-B 区) であった。また前期 110 日間を 5°C、後期 20 日間を 2.5°C で処理した場合のそれは 70.6 ± 50.5 (Fig. 14-G' 区) であった。これらの結果から雄蛹を越冬期間中、10~20 日間を 2.5°C で処理し、他期間を 5°C で処理した場合は、全期間を 5°C で処理した場合に比べると、次代卵の孵化率はかなり高くなることが分った。ただし処理時期については、さらに詳細な検討が必要である。

### 3. 結 論

サクサン休眠雄蛹を、越冬期間 130 日間のうち 90 日間以上 5°C で処理すると、その雄蛾の交尾数は低下した。次に休眠雄蛹を越冬期間 130 日間のうち全期間を 2.5°C で処理し、その雄蛾を正常雌蛾と交配させた場合の次代卵の孵化率は高く、5°C の場合のそれは低かった。また休眠雄蛹を処理開始から 50 日目以前または以後 5°C で処理し、それ以外の期間を 2.5°C で処理した場合のそれは、全期間 2.5°C で処理した場合に比べて大差ないことが分った。したがって次代卵の孵化率からみた両温度の臨界期は処理開始から 50 日目に当ることが明らかとなった。

以上の I~IV 項の結果から、サクサン休眠雄蛹の妊性低下の直接的な原因は、不適当な越冬温度にもとづく精子形成の異常によることが明らかとなった。しかし次の点についての根本的原因の解明のためには、越冬温度、内分泌器官および生殖細胞の相互の関連の面からの今後の検討が必要とされる。

- a) 変態と精子形成機構との関連
- b) 休眠雄蛹の越冬温度と精子形成との関連
- c) 越冬温度に対する生殖細胞の発育が雄蛹と雌蛹とで異なる点

## V. 総 括

妊性の観点から、屋内自然温度下のサクサン休眠蛹は、屋内自然温度がおよそ 5°C に低下したならば、2.5°C の越冬温度に移し 4~5 カ月間処理することが適切で、5°C に長期間放置することは妊性低下の原因となることが判明した。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当り、材料の提供をいただいた信

州大学繊維学部、田中一行教授および長野県蚕業試験場中嶋福雄博士に深謝する。またデータの統計的処理に当ってご援助下さった北海道大学農学部、中田徹博士に併せて謝意を表す。なお本研究の一部は、文部省科学研究費 (総合 A. No. 62304016, 代表者、勝野貞哉) 「野生絹糸虫の発生学的研究」の補助によって行った。

## 引用文献

1. 勝野貞哉：家蚕の異常精子束。日蚕雑，45：528-532. 1976
2. KATSUNO, S.: Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) I. The intratesticular behaviour of the spermatozoa at various stages from the 5th instar to the adult. *Appl. Ent. Zool.* 12: 142-153. 1977
3. 勝野貞哉：家蚕における蛹期の高温処理と雌性不妊化との関係。II. 雄不性妊化をもたらす原因。応動昆，21：135-141. 1977
4. KATSUNO, S.: Time of differentiation and determination of eupyrene and apyrene spermatozoa and resulting spermatogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.* 22: 13-18. 1987
5. 川口栄作：家蚕及其近縁絹糸虫の細胞学的研究。II. 天蚕 (*Antheraea yamamai* GUÉRIN) 及び柞蚕 (*Antheraea pernyi* GUÉRIN) 並に其雜種に於ける精虫発達史。遺雑，10：135-151. 1934
6. 倉沢美徳・小山長雄：越冬中の柞蚕蛹に対する低温接触がその発蛾に及ぼす影響 (予報)。日蚕雑，19：352-357. 1950
7. NISHITSUTSUJI-UWO, J.: Developmental features of the male germ cells in the prospective diapausing and non-diapausing swallowtails, *Papilio xuthus*. *Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto Ser. B.* 26: 9-14. 1959
8. NISHITSUTSUJI-UWO, J.: Further studies on developmental features of the male germ cells in the prospective diapausing and non-diapausing swallowtails, *Papilio xuthus*. *Annot. Zool. Japan.* 34: 30-37. 1981
9. NUMATA, H. and T. HIDAKA: Development of male sex cells in the swallowtail, *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) in relation to pupal diapause. *Appl. Ent. Zool.* 15: 151-158. 1980
10. 钱惠田・冯绳祖：柞蚕学 (沈阳农学院主编)。北京：农业出版社，pp. 251-257. 1981

11. SCHMIDT, E. L. and C. M. WILLIAMS: Physiology of insect diapause. V. Assay of the growth and differentiation hormone of Leidoptera by the method of tissue culture. *Biol. Bull.* **105**: 174-187. 1953
12. 田中茂男: サクサン休眠蛹の低温処理による成虫化について. *日蚕雑*, **29**: 341-344. 1960
13. WAKU, Y.: Seasonal change of the pupal respiratory metabolism in the chinese oak-silkworm, *Antheraea pernyi* GUÉRIN, with special regard to its hibernation and diapause. *Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. 4. Biol.* **23**: 101-118. 1957
14. 山崎 寿・西村国男・松村タカ子: 柞蚕蛹の越冬温度と羽化との関係. *日蚕雑*, **22**: 266-268. 1953
15. 山崎 寿・西村国男・山田たけを: 環境温度の野蚕の生育に対する影響に関する研究(第2報) 柞蚕蛹の越冬期間の短縮及び延長が成虫, 幼虫並びに化性に及ぼす影響. *農業気象*, **10**: 23-26. 1954

### Summary

The optimal temperature of hibernation for the diapausing pupae of *Antheraea pernyi* was studied from the point of view of fertility and the results obtained as follows:

(1) From the results of hatchability of the eggs it was found that the range of optimal temperature of hibernation for the diapausing male pupae existed below  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . These facts were supported by observation of the spermatogenesis. Namely, that the grown germ cells and eupyrene spermatozoa in the diapausing male pupae under normal room temperature of  $-5 \sim 10^\circ\text{C}$  degenerated temporally. Although, new eupyrene spermatozoa were formed from the young germ cells due to the diapausing male pupae being continuously exposed

to low temperature of  $-5 \sim 5^\circ\text{C}$  for about 50 days during the hibernal period under normal room temperature. On the other hand, the germ cells continued degenerating and re-formation of new eupyrene spermatozoa was not observed when the diapausing male pupae preserved at a constant temperature of  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  during the hibernal period.

(2) It was found that the optimal temperature of hibernation for the male and female diapausing pupae was  $2.5^\circ\text{C}$  from the hatchability of the eggs of the adults which mated with the female and male adults at normal room temperature respectively.

(3) From the relationship between the period of treatment under  $2.5^\circ\text{C}$  and the period from incubation to emergence in the diapausing pupae, it was found that it was necessary to expose the diapausing male and female pupae to  $2.5^\circ\text{C}$  for 4~5 months for diapausal termination.

(4) During the hibernal period of 130 days for the diapausing male pupae, when the pupae were exposed to  $2.5^\circ\text{C}$  for the entire period, the hatchability of the eggs produced from the mating of the male adults with normal female adults was high but the hatchability was markedly low in the case of  $5^\circ\text{C}$ . Regardless of whether the male pupae were exposed to  $5^\circ\text{C}$  before or after the 50th day from the commencement of temperature treatment, if the pupae were exposed to  $2.5^\circ\text{C}$  during either period, the hatchability remained high. If the temperature was changed at another point in the hibernal period, rather than at day 50, the hatchability was decreased. From the above results, it was found that the critical time of both temperature corresponds to the 50th day after commencement of temperature treatment.



### Explanation Plate

#### Plate I.

Abnormal germ cells and normal spermatozoa in the Control group

1. A large number of abnormal spermatocytal cysts I (arrow) in the pupa on Mar. 1.
2. A small number of abnormal spermatocytal cysts II (arrows) mix with the normal spermatocytal cysts on Mar. 1.
3. A large number of abnormal eupyrene sperm bundles (arrows) in the pupa on the 10th day of incubation.
4. A large number of new eupyrene spermatozoa (single arrow) above the basement membrane of the testicular follicle and a large number of apyrene spermatozoa (double arrow) in the vas efferens in the pupa on the 19th day of incubation.

Scale (1-4): 100  $\mu$ m.

#### Plate II.

Abnormal germ cells in the  $4.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  group

5. A large number of abnormal spermatocytal cysts II (arrows) mix with a small number of normal spermatocytal cysts in the pupa on the 4th day of incubation.
6. Many degenerate substances (arrow) in the pupa on the 10th day of incubation.
7. Abnormal eupyrene (arrow) and apyrene sperm bundles (double arrow) in the pupa on the 20th day of incubation.
8. Various abnormal germ cells in the testicular follicle in the pupa on the 20th day of incubation.

Scale (5-8): 100  $\mu$ m.

