

东北师范大学

Northeast Normal University



长白山露水河地区双簇污天牛 与黄密白点墨天牛染色体核型分析

小组：动物 5 组

组长：于迪

组员：

陈剑锋、郭丽娜、姜雅莉、罗敏惠

宋丽美、杨强、袁山迪、周盈君

长白山露水河地区双簇污天牛 与黄密白点墨天牛染色体核型分析

于迪* 陈剑锋 郭丽娜 姜雅莉 罗敏惠 宋丽美 杨强 袁山迪 周盈君

(东北师范大学 生命科学学院 吉林 长春 130024)

摘要: 采用常规压片法^[1]对在长白山露水河地区采集的双簇污天牛与黄密白点墨天牛的染色体核型进行分析。研究表明: 双簇污天牛(*Moechotypa diphysis* Pascoe) 染色体数 $2n(\delta)=20$, 性别决定机制为 X_{Y_p} 。染色体组式: $5L+4M+X_{Y_p}$; 黄密白点墨天牛(*Monochamus impluviatus* Motschulsky) 染色体数 $2n(\delta)=20$, 性别决定机制为 X_{Y_p} , 染色体组式: $6L+3M+X_{Y_p}$ 。

关键词: 双簇污天牛、黄密白点墨天牛、染色体、核型

Karyotype analysis of *Moechotypa diphysis* Pascoe and *Monochamus impluviatus* Motschulsky in the area of Lushui River

(Northeast Normal University, School Of Life And Science, Changchun 130024)

Abstract: In this paper, the model karyotypes of *Moechotypa diphysis* Pascoe and *Monochamus impluviatus* Motschulsky were studied and it was analyzed by conventional chromosome analysis. The sex-determining mechanism of *Moechotypa diphysis* Pascoe is X_{Y_p} and the chromosome number is $2n(\delta)=20$ with a karyotype formula of $5L+4M+X_{Y_p}$. The sex-determining mechanism of *Moechotypa diphysis* Pascoe is X_{Y_p} and the chromosome number is $2n(\delta)=20$ with a karyotype formula of $6L+3M+X_{Y_p}$.

Key words: *Moechotypa diphysis* Pascoe, *Monochamus impluviatus* Motschulsky, chromosome, karyotype

0 前言

染色质是遗传物质——基因的载体, 易被碱性染料着色, 在细胞分裂前期, 染色质从高度水合凝胶状态失水和螺旋化而逐渐浓缩, 形成染色体。各种生物染色体的形态、结构和数目都是相对稳定的。每一生物细胞内特定的染色体组成叫染色体组型, 染色体组型分析也称核型分析^[2]。

染色体核型分析作为细胞遗传学检查方法之一, 由于其实用性和一定程度的准确性, 已经成为染色体异常的常规筛选技术, 且有助于探明染色体组的演化和生物种属间的亲缘关

系与分类鉴定。从 20 世纪后期始, 逐步发展起来的 GRQ 带技术、荧光原位杂交技术以及光谱核型分析技术^[3]在安全性、速度、敏感度等方面均逐步提升, 克服了染色体经 Giemsa 染色呈均质状的鉴别困难性。

目前, 直翅目、双翅目的昆虫以及膜翅目中的蜂类和蚁类的染色体核型均有较详尽的研究, 而对蜉蝣目、双翅目、鞘翅目等昆虫的染色体研究有限^[3]。双簇污天牛隶属于鞘翅目、天牛科、沟胫天牛亚科、污天牛属, 在黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、河南、安徽、浙江、广西、重庆均有分布, 以核桃、杨树、松树、柏树、蒙古栎等经济作物为寄主, 危害其生长^[5]。黄密白点墨天牛隶属于鞘翅目、天牛科、沟胫天牛亚科、墨天牛属, 也是一种较常见的林业害虫。

本研究所用的精巢取自从长白山露水河地区采集的双簇污天牛与黄密白点墨天牛, 通过直接压片法对其精巢小管制片, 经镜检, 拍照。通过测量、计算和分析染色体的数目、实际和相对长度、着丝粒位置以及臂比等确定其染色体组成, 并绘制染色体终变期的核型模式图, 从而讨论两种天牛的染色体差异。本研究对以上两种天牛的染色体核型进行了分析, 旨在为双簇污天牛与黄密白点墨天牛的鉴定提供一定的细胞学依据, 并且为其防治奠定了理论基础。

1、 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 供试昆虫

供试双簇污天牛 (*Moechotypa diphysis* Pascoe) 与黄密白点墨天牛 (*Monochamus impluviatus* Motschulsky) 为 2012 年 7 月末于吉林省长白山露水河地区采集, 实验时选取雄性天牛。

1.1.2 供试药剂

0.05%的秋水仙素溶液

Carnoy 固定液 (无水乙醇:冰醋酸 3:1, 新鲜配制)

70%的乙醇

无水乙醇

60%的冰醋酸

Giemsa 染液 (pH6.8, Giemsa 原液: 磷酸缓冲液 1:20)

中性树胶

1.2 实验方法

1.2.1 虫体解剖与精巢采集

捕捉雄性双簇污天牛与黄密白点墨天牛成虫, 并活体注射 0.05%的秋水仙素溶液 (2-8, μ L/个, 剂量, 根据虫体大小而定), 处理 3-6h。在实体显微镜下, 用解剖剪沿活体成虫的腹部气门线, 由腹末一直剪到头部顶端, 剪时剪刀紧贴体壁, 取出精巢, 在纯水中低渗 5min, 利用新配制的 Carnoy 固定液 (无水乙醇:冰醋酸 3:1) 固定 8-12h, 移入 70%的乙醇内, 置于 4℃冰箱中保存备用。

1.2.2 染色体制片

采用直接压片法, 在实体显微镜下, 用解剖针挑取精小管, 并切取其末端约 2/3 处膨大的部分^[5], 置于滴有 60%冰醋酸溶液的洁净载玻片上, 软化 10-20min, 待选取的精小管由乳白色变为透明后压片使细胞均匀分散。置于液氮中 10min, 取出后立即揭片。在室温下无尘处自然干燥后, 用 Giemsa 染液 (pH6.8, Giemsa 原液: 磷酸缓冲液 1:20) 染色 15min, 用缓水流冲洗载玻片背面直到流下的水洁净无色, 自然晾干, 并用中性树胶封片制成永久玻片

标本，镜检拍照。

1.2.3 染色体核型分析

选取双簇污天牛与黄密白点墨天牛个体各 3 只，在显微镜下观察用以上方法制得的染色体玻片标本，每个个体挑选出 6 个分散适度，形态清晰，染色体数目完整的染色体分裂相细胞片子冲洗并放大到理想倍数。将染色体按同源染色体配对，再依染色体大小递减排列，依次编号 1-9，性染色体不编号，用 X_{Y_p} 表示，排在最后，将十对（条）染色体依次剪下，并以此制作染色体核型图。再用与染色体照片放大等倍数的螺旋测微尺测量并计算出染色体的绝对长度、相对长度、臂比值、着丝点指数，再计算出核型平均值^[7]并确定染色体类型。

2、 结果分析

2.1 双簇污天牛天牛染色体测量结果

通过观察双簇污天牛终变期 80 个细胞并计数统计，双簇污天牛单倍体染色体数目： $n=10$ 。在丝球期观察到“降落伞状的二价体”结构^[8]，即在减数分裂过程中 X 染色体相对大于呈点状的 Y 染色体，因此性别决定机制为 X_{Y_p} 型。染色体组式： $5L+4M+X_{Y_p}$ 。视野中，大部分染色体的着丝点清晰可辨，测定和计算双簇污天牛染色体实际长度、相对长度、臂比值、着丝点指数和染色体类型，其具体情况如表 1 所示。染色体照片、染色体核型图如图 1、2 所示。其中，大型染色体 5 条，相对长度 RL 值为 16.53-10.72；、中型染色体 4 条，相对长度 RL 值为 9.82-5.80；性染色体很小仅为点状，按染色体长度排列顺序位于最后一位。其染色体实际长度最长者为 $6.7 \mu m$ ，最短者为 $1.7 \mu m$ ，最长的染色体是最短者的 3.94 倍。根据着丝点指数，有 4 条染色体着丝点指数 i 为 25.06、25.07、33.38、36.88，在 37.5-25 之间，为亚中着丝粒染色体（sm）；其余 6 条染色体着丝点指数 i 在 50.5-37.5 之间，为中部着丝粒染色体（m）。

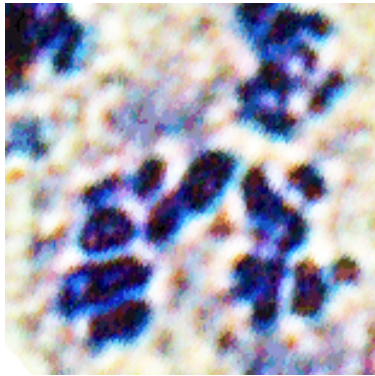


图 1. 双簇污天牛染色体终变期分裂相

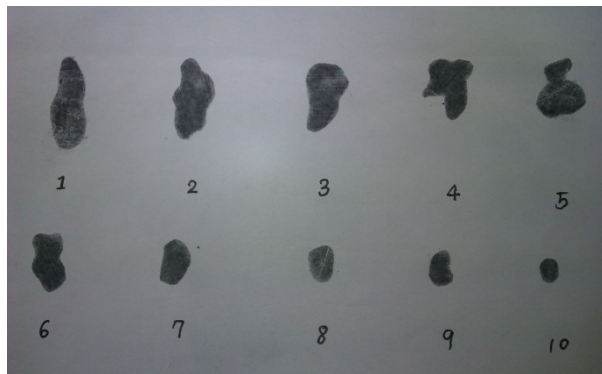


图 2. 双簇污天牛终变期染色体核型图

表1 双簇污天牛核型指数

Tab1 Indices of karyotype of *Moechotypa diphysis* Motschulsky

染色体编号	实际长度 (μm)	相对长度	臂比值	着丝点指数	类型
1	7.21	16.53	1.31 ± 0.05	43.23	m
2	6.27	14.37	1.13 ± 0.05	46.91	m
3	5.85	13.41	3.02 ± 0.04	25.06	sm
4	5.08	11.65	1.36 ± 0.01	42.37	m
5	4.68	10.72	2.25 ± 0.03	33.38	sm
6	4.28	9.82	1.27 ± 0.01	45.50	m
7	3.77	8.56	1.71 ± 0.12	36.88	sm
8	2.54	5.83	1.17 ± 0.02	46.24	m
9	2.53	5.80	1.71 ± 0.04	38.56	sm
10	1.58	3.62	3.04 ± 0.15	25.07	sm

2.2 双簇污天牛染色体形态描述

根据表1对双簇污天牛形态描述如下:

1号、2号均为中部着丝粒染色体,形态比其他染色体大,易区分。

3号为最大的亚中部着丝粒染色体,臂比值为 3.02 ± 0.04 。

4号和5号均为二价体形态,相对长度也较为接近,但其臂比值不同,5号染色体臂比值为 2.25 ± 0.03 ,明显大于4号臂比值。4号为中部着丝粒染色体,5号为亚中部着丝粒染色体,容易进行识别。

6号和8号为中部着丝粒染色体,臂比值和着丝点指数*i*较为接近,6号相对长度较8号大些。

7号形态及相对长度明显大于9号,但其臂比值、着丝点指数*i*十分接近,属于亚中部着丝粒染色体。

Y染色体形态是最特殊的一个,为一个小圆点,在染色体图片中能清晰的看到它是最小的染色体。

2.2 黄密白点墨天牛

2.2.1 黄密白点墨天牛染色体测量结果

通过观察黄密白点墨天牛终变期80个细胞并计数统计,黄密白点墨天牛单倍体染色体数目: $n=10$ 。在丝球期观察到“降落伞状的二价体”结构^[8],即在减数分裂过程中X染色体相对大于呈点状的Y染色体,因此性别决定机制为 X_{Y_0} 型。染色体组式: $6L+3M+X_{Y_0}$ 。视野中,大部分染色体的着丝点清晰可辨,测定和计算双簇污天牛染色体实际长度、相对长度、臂比值、着丝点指数和染色体类型,其具体情况如表1所示。染色体照片、染色体核型图如图1、2所示。其中,大型染色体6条,相对长度RL值为16.02-10.44;、中型染色体3条,相对长度RL值为8.78-5.49;性染色体很小仅为点状,按染色体长度排列顺序位于最后一位。其染色体实际长度最长者为 $15.41 \mu m$,最短者为 $1.19 \mu m$,最长的染色体是最短者的12.95倍。根据着丝点指数,有5条染色体着丝点指数*i*为26.70、33.3、27.2、33.3、28.6,在33.3-26.7之间,为亚中着丝粒染色体(sm);有两条中部着丝粒染色体(m),其着丝点指数分别为46.2、40.0;其余3条染色体着丝点指数*i*在22.2-18.2之间,为亚端部着丝粒

染色体 (st)。

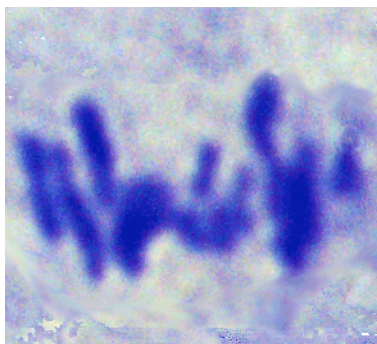


图 1. 黄密白点墨天牛染色体终变期分裂相

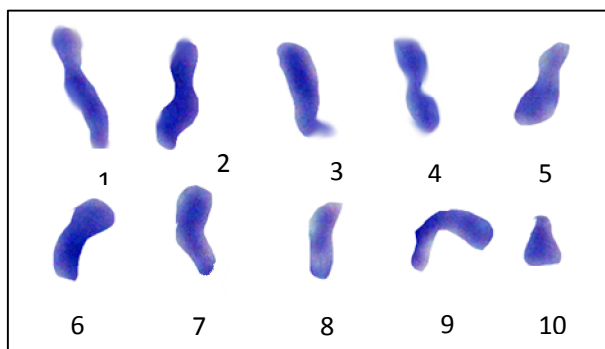


图 2. 双簇污天牛终变期染色体核型图

表 1 黄密白点墨天牛核型指数

Tab1 Indices of karyotype of *Monochamus impluviatus* Motschulsky

染色体编号	实际长度 (μm)	相对长度	臂比值	着丝点指数	类型
1	15.41	16.02	2.75 ± 0.05	26.70	sm
2	14.23	14.79	4.50 ± 0.05	18.2	st
3	12.36	12.85	2.01 ± 0.04	33.3	sm
4	11.70	12.16	1.16 ± 0.01	46.2	m
5	10.12	10.52	1.50 ± 0.03	40.0	m
6	10.04	10.44	2.66 ± 0.01	27.3	sm
7	8.45	8.78	3.50 ± 0.12	22.2	st
8	5.44	5.65	2.00 ± 0.02	33.3	sm
9	5.28	5.49	2.50 ± 0.04	28.6	sm
10	1.19	1.24	4.00 ± 0.15	20.0	st

2.1.2 黄密白点墨天牛染色体形态描述

根据表 1 对黄密白点墨天牛形态描述如下:

1 号为亚中着丝粒染色体, 形态比其他染色体大, 易区分。

2 号为最大的亚端部着丝粒染色体, 臂比值为 4.50 ± 0.05 , 在整个染色体组中很容易区分。

3 号为亚中着丝粒染色体, 臂比值和 1 号较为接近。

4 号和 5 号均为中部着丝粒染色体形态, 其相对长度不同, 但其臂比值较为接近, 容易进行识别。

6 号为亚中着丝粒染色体, 相对长度与 5 号的中部着丝粒染色体接近, 但其臂比值相差较大。

7 号的臂比值大于 3.00, 属于端部着丝粒染色体。

8 号形态及相对长度明显大于 9 号, 但其臂比值、着丝点指数 i 十分接近, 属于亚中着丝粒染色体。

Y 染色体形态是最特殊的一个, 为一个梨形的小圆点, 在染色体图片中能清晰的看到它是最小的染色体。

3 讨论

不同物种具有不同的核型, 核型是区别物种的基本遗传学依据。双簇污天牛与黄密白点墨天牛均隶属于鞘翅目、天牛科、沟胫天牛亚科, 其染色体数目 $2n(\delta) = 20$ 与鞘翅目昆虫染色体的“典型数目”保持一致, 证明这两种天牛在染色体数目上保守性的特点^[4]。且均为 Xy_p 的性别决定机制。虽二者虽同属沟胫天牛亚科, 但二者分别隶属于污天牛属和墨天牛属, 在染色体核型方面存在一些差异。

从染色体方面来看, 双簇污天牛共有 5 对大型染色体和 4 对中型染色体, 而黄密白点墨天牛有 6 对大型染色体和 3 对中型染色体。从着丝点指数来看, 双簇污天牛共有 4 对亚中染色体与 5 对中部着丝粒染色体, 而黄密白点墨天牛共有 5 对亚中着丝粒染色体、2 对中部着丝粒染色体与 3 对亚端部着丝粒染色体。说明沟胫天牛亚科的不同属之间染色体核型存在差异。根据染色体相对长度和着丝点指数两个指标, 可以对以上两种天牛加以区分。

本研究旨在为天牛科昆虫在遗传学上的分类依据, 也为天牛染色体的进一步研究奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 李敏, 王寅亮, 宋慧华, 任炳忠. 东北地区亚洲飞蝗染色体核型分析[J]. 应用昆虫学报, 2012, 84(4): 831-834
- [2] 徐丽霞, 王秦秦. 染色体核型分析技术的发展[A]. 医学综述, 2009, 15(2): 188-190
- [3] 何军, 薛永权, 李建琴, 何海龙, 何亚香, 黄益萍, 柴忆欢, 朱伶俐. 多重 RT-PCR 技术联合染色体核型分析在儿童急性淋巴细胞白血病诊断分型中的应用[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(7): 413-416 .
- [4] 刘平. 松墨天牛、光肩星天牛、桑天牛染色体核型研究 [D].
- [5] 谢广林, 王文凯. 中国污天牛属一新记录种(鞘翅目:天牛科)[J]. 长江大学学报(自然科学版)农学版, 2008, 5(4): 8-9.
- [6] 马恩波, 白贵荣, 郭亚平, 任竹梅, 金晓弟, 马拉仙. 斑腿蝗科精小管形态及其分类学意义探讨[J]. 动物学报, 2001, 47(专刊): 30-36.
- [7] 李懋学, 陈瑞阳, 1985. 关于植物核型分析的标准化问题. 武汉植物研究, 3(4): 297-302.
- [8] 刘平, 嵇保中, 刘曙雯, 张凯, 于秀坤, 林晓. 桑天牛染色体核型及制备材料的选择[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2010, 34(6): 5-8.