

东北师范大学生命科学学院 2011 级长白山野外综合实习报告



## 长白山露水河地区 常见天牛的染色体核型分析研究

指导老师：任炳忠

小组成员：陈家民 舒 杨 任 平 张予姝

侯琳琳 廖 望 张 娜 叶泽俊

实习时间：2013 年 7 月 1 日—2013 年 7 月 11 日

中国•长春

二〇一三年九月

# 长白山地区常见天牛的核型分析

陈家民 廖望 舒杨 任平 侯琳琳 张娜 张予舒 叶泽俊  
(东北师范大学 生命科学学院)

摘要：本文以长白山鞘翅目天牛科的曲纹花天牛和云杉花墨天牛为研究对象。选取天牛的分裂旺盛组织精巢(卵巢)，通过直接压片法，进行天牛染色体玻片的制备和观察，对 2 种天牛的染色体核型进行分析比较，确定它们之间的差异以及种间联系。实验结果表明：曲纹花天牛染色体数为  $2n=20$ ；云杉花墨天牛染色体数为  $2n=22$ 。在染色体长度上，两种天牛染色体长度比较接近，但从自身染色体上来看，云杉花墨天牛的染色体相对整齐些。

关键词：天牛；染色体；核型；种类差异

## Karyotype analysis of common beetles in Changbai Mountain area

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

Abstract: In this paper, we take *Leptura arcuata* and *Monochamussaltuarius* Gebler in the Changbai Mountain as the object of study. We select the longicorn division strong organization testis (ovary) and use direct comparison method to observe the Longicorn chromosome. Finally, doing the chromosome analysis, so we can determine the difference and relationship between them. From the experiments, we can see that *Leptura arcuata* has 10 pairs of chromosomes ( $n=10$ ), *Monochamussaltuarius* Gebler has 11 pairs of chromosomes ( $n=11$ ). And the length of *Leptura arcuata* is close to *Monochamussaltuarius* Gebler. But from their own chromosomes, the chromosomes of *Monochamussaltuarius* Gebler are relative to the neat.

Key words: Long-horned beetles; chromosome; karyotype; species differences

### 前言

长白山地区我国东北部，是我国建立最早、地位最重要的自然保护区之一。长白山地

区保存着欧亚大陆北半部最珍贵的野生动植物资源，它是同纬度上五种最丰富、生态系统原始状况保护最好的自然保护。

天牛科（*Gerambycidae*）是鞘翅目中最大的科之一，全世界约有 45000 种，是鞘翅目昆虫中形态变异最具多样性的类群之一。到 2005 年止，中国天牛记录已有 3100 余种。天牛科昆虫绝大多数取食植物，部分种类的天牛是林木的重要害虫，严重危害果树和观赏类树木；其他种类的天牛危害落叶树和阔叶树，少部分的天牛危害农作物[1]。因此天牛种类的鉴定对病虫害的防治至关重要。通过天牛的核型分析，能够直接阐明天牛的种间差异与关系。核型是生物的重要特征之一，染色体的数目和核型组成具有种的特异性[2]。迄今为止，有关鞘翅目昆虫染色体的报道中对天牛染色体的报道非常少，我国仅有刘平等对沟胫天牛亚科的 3 种天牛（松墨天牛、光肩星天牛和桑天牛）进行了核型分析[3]。由于天牛生活史太长，饲养成本高、周期长，靠人工饲养取得实验材料难度大，只有通过林间采集补充标本材料[2]。本文就长白山野外采集的曲纹花天牛和云杉花墨天牛进行核型分析。

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称为染色体组型。通过一定的方法制得染色体的玻片标本，经显微照相，冲洗放大等步骤获得染色体照片。从染色体的玻片标本和染色体照片的对比分析，进行染色体分组，并对组内各染色体的长度，着丝点位置，臂比和随体有无等形态特征进行观测和描述，从而阐明生物的染色体组成，确定其染色体组型。染色体组型分析是细胞遗传学研究的基本方法，是研究物种演化、分类以及染色体结构、形态与功能之间关系所不可缺少的重要手段。随着昆虫生长发育期的变化，昆虫精母细胞的分裂会相应的发生周期性变化，既有有丝分裂和减数分裂，既有单倍体时期，也有多倍体时期，是观察染色体的好材料。

染色体核型分析的方法有很多种，本实验采取的是直接压片法。直接压片法中需要用到吉姆（*Giemsa*）染液，吉姆染液由天青，伊红组成。伊红为酸性染料，可与碱性蛋白质结合，将碱性蛋白质染成粉红色；天青为碱性染料，可与呈酸性的细胞核蛋白和淋巴细胞胞浆结合，将其染成紫蓝色；伊红和美蓝均可与呈等电状态的中性颗粒结合，将其染成淡紫色。细胞均含有蛋白质，由于蛋白质为两性电解质，所带电荷随溶液 PH 而定，在偏酸性的环境下，电荷增多，易与伊红结合，染色偏红；在偏碱性的环境中负电荷增多，易与美蓝或天青结合，染色偏蓝。因此氢离子浓度对染色结果有一定的影响，染色所用的载玻片必须清洁，无酸碱污染。稀释染色必须用缓冲液，冲洗用水应近中性，否则可导致各种细胞染色反应异常，以致识别困难，甚至造成错误。

## 1. 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试昆虫

实验所用的两种天牛为中国吉林省长白山露水河地区生长的雄性天牛，分别为：曲纹花天牛和云杉花墨天牛

#### 1.1.2 供试药剂

蒸馏水，无水乙醇，甲醇，冰醋酸，60%冰醋酸，70%的乙醇，吉姆 *Giemsa*（PH6.8）

## 1.2 方法

### 1.2.1 样本的选择

从长白山露水河地区（主要有红松王、五道江口等几个地方）随机捕获，选取雄性、

成熟的天牛。用解剖剪将天牛腹部剪开，取出精巢，如若精巢分辨不清，则可将天牛腹部消化道等全部取出，先在蒸馏水中低渗，时间不超过 5min，然后放在新配制的 Carnoy 固定液（无水乙醇：冰醋酸=3:1）固定 8-12h，置于 70%的乙醇内后放入 4℃冰箱保存备用。实验过程中要事先将保存天牛以及其精巢的小管准备好，并对应一一标号。标号内容应有采集编号、采集时间、采集地点。

### 1.2.2 染色体标本的制作方法

实验采用直接压片法。在实体显微镜下，取出小管内精巢置于事先准备好的蒸馏水内，用解剖针挑取精巢和连接的小管，选择末端分离小管的约 2/3 处的膨大的部分，将其置于滴有 60%冰醋酸溶液的洁净载玻片上软化 10-20min（待小管由乳白色变为透明白色为宜）。适当压片，让细胞均匀分散。再放入液氮中 10min，从液氮中取出后迅速将盖玻片挑去，之后于室温条件下自然风干。然后用 Giemsa (PH6.8) 染色 15~30min，染色结束后，用水冲洗载玻片背面，冲去残留的染液。待自然晾干后，用中性树胶封片保存，用于镜检拍照。

### 1.2.3 染色体的观察拍照

将干燥后的染色体标本用显微镜观察分析并拍照，选择比较清晰、明显的分裂相照片进行分析。将染色体按同源染色体进行配对，再按照染色体大小递减进行排列，依次编号，性染色体不编号，并放在最后面，将配对好的染色体剪下来，以此制作染色体核型图。然后根据相对长度的计算公式，算出染色体的相对长度<sup>[3]</sup>（相对长度的计算公式是：（每个染色体的长度/全部染色体长度）×100%）。

### 1.2.4 天牛标本的鉴定

天牛标本的鉴定工作主要通过检索表、工具书、手册及图鉴等进行，但一些从形态上较难鉴定的种类需要通过做生殖器玻片，在视体镜下鉴定<sup>[4-8]</sup>。最后，将鉴定好的天牛标本与制作的染色体样本一一对应。

### 1.2.5 实验注意事项

- A. 将精巢与去精巢后的天牛各自放入小管中保存，小管中的保存液要尽量溢满小管，防止在运输过程中导致精巢或去精巢天牛没有完全浸入到保存液中。
- B. 挑取精巢及其连接小管时，尽量选择 2~3 根至于片子上，如若不能清晰看到与精巢相连的小管，可以将消化道的小颗粒挑到片子上。
- C. 压片时压片力道要适中，可先试做两个片子，然后判断力道。
- D. 片子放入液氮中的时间切不可过长，时间过长容易导致片子被冻碎。
- E. 挑去盖玻片时速度要快，防止在挑片时将精巢小管等随着盖玻片被挑去。
- F. 冲洗片子时要注意用适当的水流冲洗片子背面。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 染色体数量的确定

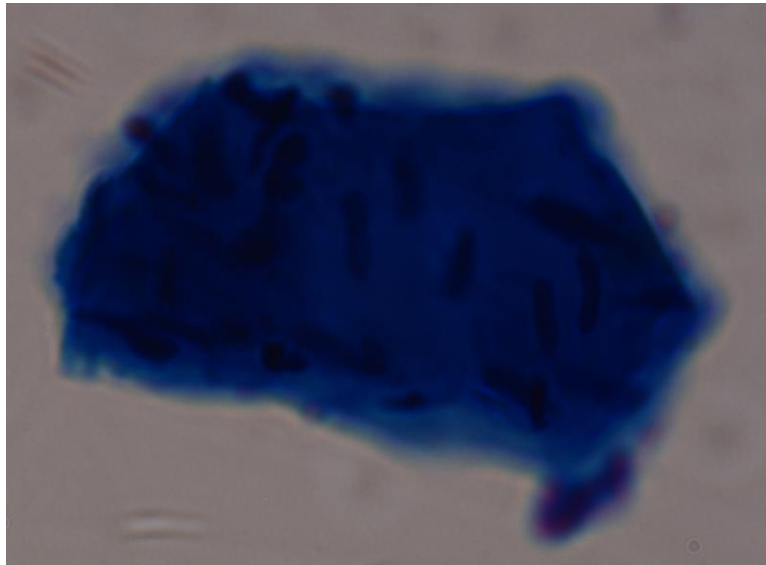


图 1 曲纹花天牛染色体的实体图

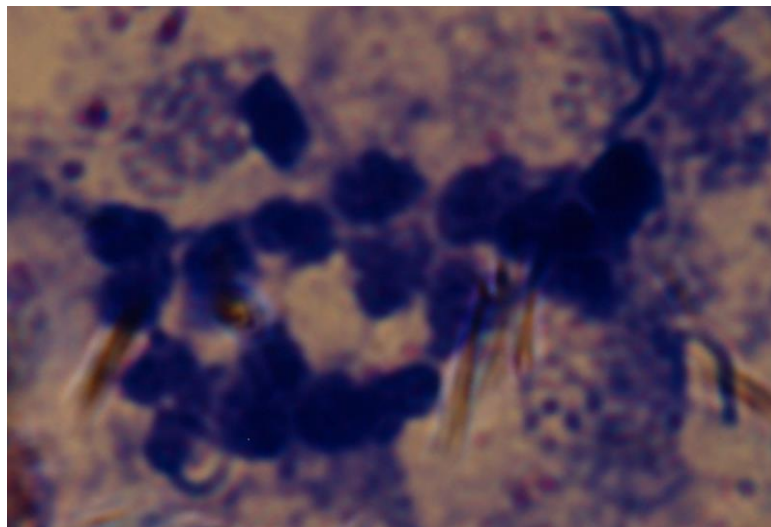


图 2 云杉花墨天牛染色体的实体图

观察分析实验过程中拍摄的照片，进行了染色体数目的统计。由于染色体有重叠现象，导致统计出不同的数量，但曲纹花天牛的染色体数目多为 20，故可推测曲纹花天牛的染色体数目为  $2n=20$ 。根据同样的道理可推测，云杉花墨天牛的染色体数  $2n=22$ 。

## 2.2 核型的确立

核型是指染色体组在有丝分裂中期或减数分裂某一时期的表型，包括染色体数目、大小、形态特征的总和，尤其是形态特征包括相对长度、臂比指数、着丝粒指数等核型排列的常用指标<sup>[4]</sup>。由于鞘翅目染色体的特殊性(弥散的点状)，所以选择染色体的直径作为测量指标。运用传统的剪纸法，将多张较清晰的染色体照片中的染色体剪下来，配成对，用 ImageJ 测量出其实际的长度，计算出相对长度。

Table1 曲纹花天牛的染色体相对长度和实际长度

染色体编号	实际长度(mm)	相对长度
1	0.00850	16.19
2	0.00725	13.81
3	0.00625	11.90
4	0.00325	6.19
5	0.00450	8.57
6	0.00350	6.67
7	0.00300	5.71
8	0.00525	10.00
9	0.00625	11.90
10	0.00475	9.05



图 3 曲纹花天牛染色体核型图

Table2 云杉花墨天牛的染色体相对长度和实际长度

染色体编号	实际长度(mm)	相对长度
1	0.00500	9.71
2	0.00375	7.28
3	0.00575	11.17
4	0.00500	9.71
5	0.00700	13.59
6	0.00450	8.74
7	0.00450	8.74
8	0.00400	7.77
9	0.00725	14.08
10	0.00475	9.22
11	0.00375	7.28



图4 云杉花墨天牛染色体核型图

## 2.3 讨论

### 2.3.1 关于实验过程的总结

做了几十张的核型图在显微镜下观察发现依然不是很清晰，天牛染色体重叠现象或者细胞破碎现象严重，数染色体条数时辨别困难，总的来说改实验方法还需改进。从实验整个过程分析来看，出现问题原因可有以下几个方面：

(1)在采集天牛的过程中，由于天气及采集环境等问题，采集到的天牛多个体较小，在没有仪器辅助的情况下择取精巢卵巢的难度相对较高，易出现择取不完整甚至是取错部位的情况。部分个体较大的天牛体内含有大量的脂肪球，对实验所需部位的择取产生了极大的影响。

(2)在实验室制片的过程中，误把部分脂肪球当做生殖器官，以致在冰醋酸处理后脂肪溶解，部分切片无法观察到任何物体，或是没有染色体结构，整个细胞全部被染色。

(3)在观察切片的过程中，发现视野内部分细胞破裂或是无法分清细胞边界。这一问题是在压片时用力过度所致，并且在用冰醋酸处理时，由于经验不足，处理时间稍长，对细胞也会有一定损伤。在用液氮冰冻处理的过程中对时间的掌控不准确，以致部分切片在取出后碎裂，这也对切片的质量产生一定的影响。

(4)观察切片时发现染色部位较杂乱，部分非染色体结构也被染上颜色，妨碍观察。染色时间过长，可适当减短染色时间。

(5)观察切片时，视野内的染色体重叠现象比较严重，解离不够完全。

(6)部分切片所照相片内容完全不是染色体的结构，对油镜使用的经验不足所致。

### 2.3.2 染色体形态

该研究表明：两种天牛的核型特征均表现相似：染色体形态多为弥散型着丝粒的短杆状、颗粒状、点状或圆球状、极少数为亚中部或中部着丝粒的杆状。

### 2.3.3 染色体数量及长度与分类

总体上，天牛科染色体单倍体数量集中在 20 附近。其中，曲纹花天牛有 10 对染色体，云杉花墨天牛有 11 对染色体。可以根据这个在外形的辅助下对天牛进行分类。对于天牛本身染色体，曲纹花天牛和云杉花墨天牛的染色体形态均呈现长度参差不齐，但从核型图上来看云杉花墨天牛的染色体相对整齐有序些。在染色体大小上，两种天牛的染色体长度几乎相等，实际长度的平均值非常的接近，并在染色体数量上，曲纹花天牛和云杉花墨天牛比较接近。

可以看出,对于鞘翅目昆虫染色体运用传统的切片和压片法,只能看到一些高度浓缩的微小颗粒状的染色体,对于核型的研究不是那么的精准。在本研究中就无法得到臂比指数和着丝粒指数,只得到了实际长度和相对长度,对于核型的研究缺少很多的有力证据。这是由于鞘翅目染色体小于一般昆虫,对研究造成很到困难,普通的放大 100 倍的油镜不是研究鞘翅目染色体最好工具。希望以后对鞘翅目染色体的研究发现更多好的方法,将昆虫纲中第一大类的鳞翅目的染色体研究得更加完善。



#### 参考文献:

- [1] 张健; 吉林省天牛科昆虫分类学研究 东北师范大学 2011-05-01
- [2] 苏丽娟; 张鸿飞; 徐卫; 尹新明; 李京; 高新浩四种天牛的核型比较研究 昆虫学报 2013-03-20
- [3] 刘平; 松墨天牛、光肩星天牛、桑天牛染色体核型研究 南京林业大学 2009-06-01
- [4] 常平安, 宋方洲, 童建松等. 蓖麻蚕染色体的核型研究. 蚕业科学, 2002, 28(3).
- [5] 蒲富基; 膜花天牛五新种及一新纪录 昆虫学报 1992-5 第 35 卷 第 2 期
- [6] 牛西午, 田如霞等; 锦鸡儿属植物染色体制片与三个种的核型分析 西北植物学报 2006, 26(5): 1043-1047
- [7] 刘平, 林晓等; 桑天牛染色体核型及制备材料的选择 南京林业大学学报(自然科学版) 2010年6期
- [8] 刘平, 林晓等; 松墨天牛和光肩星天牛染色体核型 昆虫知识 2010年2期
- [9] 宋雅琴, 陈力; 中国楔天牛族昆虫区系的初步分析(鞘翅目: 天牛科: 沟胫天牛亚科) 西南农业学报 2008年2期
- [10] 宋墩福, 陈元生, 赖福胜; 杨树天牛成虫生活习性及其控制对策 湖北农业科学 2013年5期
- [11] 杨桦, 杨伟等; 云斑天牛的交配产卵行为 林业科学 2011年6期
- [12] 魏勇, 黄振裕等; 天牛成虫行为研究的现状和展望 南京林业大学学报(自然科学版) 2002年2期
- [13] 骆有庆, 黄竟芳, 李建光; 我国杨树天牛研究的主要成就、问题及展望 昆虫知识 2000年2期
- [14] 王直诚; 东北天牛志 吉林科学技术出版社 2013年12月第1版
- [15] 中国土天牛属雄性外生殖器研究(鞘翅目, 天牛科, 锯天牛亚科, 锯天牛族) 冯波, 陈力, 吴贵怡, 《动物分类学报》2010年1期
- [16] 高文韬等; 长白山北坡访花天牛区系研究 《昆虫知识》2005年6期
- [17] 时书青. 中国幽天牛亚科、瘦天牛科系统分类研究[D]. 西南大学 2012
- [18] 张健. 吉林省天牛科昆虫分类学研究[D]. 东北师范大学 2011
- [19] 郑哲民. 中国蝗虫的分类学研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版). 2003(S2)
- [20] 南宫自艳. 松毛虫属部分种类遗传多样性及影响因素研究[D]. 河北农业大学 2008
- [21] 刘建拓, 张丽红, 王国秀. 中华卵索线虫核型分析[J]. 植物保护. 2013(02)
- [22] 符碧, 王锐萍, 何滨, 王卓. 海南产锯腿小树蛙染色体核型分析[J]. 西南师范大学学报(自然科学版). 2009(01)
- [23] 章嘎, 李林凤, 娜仁图娜拉, 哈斯苏荣, 关伟军. 染色体分析技术及其意义[J]. 中国组织工程研究与临床康复. 2009(46)