

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



长白山露水河地区鳞翅目 3 种昆虫的染色体核型分析

指导老师：任炳忠

小组成员：王 鑫 孙科宇 赵文琦 宁 欣

郭剑征 赵旭阳 王 玥 王梦薇

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

长白山露水河地区鳞翅目3种昆虫的染色体核型分析

孙科宇 王鑫 赵文琦 王玥 宁欣 郭剑征 赵旭阳 王梦薇

(东北师范大学 生命科学学院 长春)

摘要：本研究以长白山蛱蝶科的柳紫闪蛱蝶 (*Apatura ilia*)、菜粉蝶 (*Pieris rapae* Linne)、白斑迷蛱蝶 (*Mimathyma schrenckii*) 三种蝶类作为研究对象。通过直接压片法，利用 Giemsa (PH6.8) 染色，进行核型分析，通过对不同种类蝴蝶核型的比较来确定三种蝴蝶之间的差异。结果表明：白斑迷蛱蝶有 30 对染色体 ($n=30$)，柳紫闪蛱蝶有 32 对染色体 ($n=32$)，菜粉蝶有 28 对染色体 ($n=28$)。在染色体形态上，白斑迷蛱蝶和柳紫闪蛱蝶染色体自身之间形态相差较大，菜粉蝶的染色体形态成规律性变化，同时，菜粉蝶染色体形态较小。在实际长度比较上，白斑迷蛱蝶和柳紫闪蛱蝶明显大于菜粉蝶的染色体长度。

关键词：蝴蝶；染色体；核型；分类

The Chromosome Analysis of three kinds of butterflies from *Lepidoptera Nymphalidae*

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

Abstract: we choose *Apatura ilia* *Pieris rapae* Linne and *Mimathyma schrenckii* as the researched objects. We should use direct comparison method with Giemsa (pH 6.8) staining, and then do the chromosome analysis. Finally, finding the differences among chromosomes, so we can get the differences among the three kinds of butterflies. From the experiments, we can see that *Mimathyma schrenckii* has 30 pairs of chromosomes ($n=30$), *Apatura ilia* has 32 pairs of chromosomes and *Pieris rapae* Linne has 28 pairs of chromosomes. As for the shape of chromosomes, the chromosomes of *Mimathyma schrenckii* and *Apatura ilia* make a big difference. However, the chromosomes of *Pieris rapae* Linne change regularly. The chromosome length of *Mimathyma schrenckii* and *Apatura ilia* is more than the length of *Pieris rapae* Linne.

Key words: butterflies; chromosome; karyotype; classification

前言

蝶，通称为“蝴蝶”，全世界大约有 14000 余种，大部分分布在美洲，尤其在亚马逊河流域品种最多，在世界其他地区除了南北极寒冷地带以外，都有分布，在亚洲台湾也以蝴蝶品种繁多著名。长白山地区共有蝴蝶 8 科 96 属 187 种，访花蝴蝶共有 89 种，约占长白山地区蝶类总数的 47.6%。其中凤蝶科、绢蝶科、喙蝶科所有种类均为访花蝶科，分别约占长白山地区蝶类总数的 3.7%、2.1%、0.5%；粉蝶科访花蝶类约占长白山地区该科蝶类总数的 82.4%，约占长白山地区蝶类总数的 7.5%；蛱蝶分别约为 51.6% 和 16.7%。由此可见，长白山地区蛱蝶科粉蝶科蝴蝶数量很多。

近些年来，有关于长白山地区的蝴蝶的研究多集中于种类、分布、数量与多样性的研究，较少见于染色体的研究。而染色体组型分析是研究物种演化、分类以及染色体结构、形态与功能所不可缺少的重要研究手段。因此我们主要对长白山露水河地区的两种蛱蝶科蝴蝶和一种粉蝶科蝴蝶进行核型分析，通过比较三种蝶类染色体组成进行分类，为今后长白山地区蝴蝶的研究提供基础资料。不同物种的染色体都有各自特定的形态结构（包括染色体的长度、着丝点位置、臂比、随体大小等）特征，而且这种形态特征是相对稳定的。染色体核型分析是根据染色体的长度、着丝点位置、臂比、随体的有无等特征，并借助染色体分带技术对某一生物的染色体进行分析、比较、排序和编号。其分析以体细胞分裂中期染色体为研究对象， $\text{相对长度} = (\text{待测的单个染色体长度} / \text{整套染色体的总长度}) \times 100$ ， $\text{臂比} = \text{长臂} / \text{短臂}$ 。核型研究所用的材料或是自然条件下活体中正在旺盛分裂的细胞（如植物的根尖、嫩叶、茎尖等细胞，以及动物的胚胎细胞、骨髓细胞、睾丸中的精原细胞等）或是离体培养的旺盛分裂的细胞。植物细胞一般不经低渗处理，如需经低渗处理则需用酶溶去细胞壁。动物细胞则往往经低渗处理后再行固定、染色。核型及其各种带型是动物、植物、真菌在染色体水平上的表型，研究和比较各种动物、植物、真菌的核型和带型有助于对各个种、属、科的亲缘关系作出判断，揭示核型的进化过程和机制。

Nymphalidae 是蝶类中最大的一科，全世界有 3400 多种。属小型至中型的蝶种，少数为大型种。色彩丰富，形态各异，花纹相当复杂。蛱蝶科成虫的下唇须特别粗壮；触角长且端部明显加粗呈锤状；复眼裸出或有毛；部分种类的中胸特别粗壮发达；前足退化，缩在胸下，无作用，雄性为一跗节，雌性 4 至 5 跗节，爪全退化。本科蝴蝶的翅形丰富多变，属间的差别较大。前翅多呈三角形，中室为开式或闭式，R 脉 5 分支，R2 至 R5 共柄，M1 与 R 脉不共柄，A 脉只有 1 条(2A)。后翅近圆形或近三角形，部分种类边缘呈锯齿状，中室开式或闭式，肩区具有较发达的肩横脉(h)，内缘臀区较发达，A 脉有 2 条(2A 及 3A)。飞翔迅速，行动活泼。有些种类在休息时，翅不停地扇动。

Apatura ilia 是原生于欧洲和亚洲大部份地区的一种蝴蝶。成虫翅展 59~64mm。翅黑褐色，翅膀在阳光下能闪烁出强烈的紫光。前翅约有 10 个白斑，中室内有 4 个黑点；反面有 1 个黑色蓝瞳眼斑，围有棕色眶。后翅中央有 1 条白色横带，并有 1 个与域前翅相似的小眼斑。反面白色带上端很宽，下端尖削成楔形带，中室端部尖出显著。成虫喜欢吸食树汁或畜粪，飞行迅速。幼虫绿色，头部有 1 对白色角状突起，端部分叉。一年发生 3~4 代，以幼虫在树干缝隙内越冬，寄主为杨、柳科的植物。蛹绿色，为垂蛹，蛹期约 9~12 天，幼虫期较长。卵单产于叶片背部，刚孵化的幼虫啃食自己的卵壳，以高龄幼虫最为危害，严重时叶片吃光，仅残有叶柄。

Mimathyma schrenckii 属鳞翅目，蛱蝶科，面黑色。飞行迅速，不易捕捉，翅展 76~89 毫米。主要分布于北京、东北、河北、河南、湖南等地。前翅正面顶角有 2 个白

色小斑，中域有 1 条外斜白带，白带后缘 2a 和 Cu2 室有 2 个橙红色斑，后缘中央有 2 个小白斑。后翅正面亚外缘前端有 2--3 个白斑，中域有 1 个近卵形大白斑，白斑边缘有蓝色闪光。前翅反面顶角银白色，外缘带棕褐色，白带内外侧蓝黑色。后翅反面银白色，外缘有 1 条棕褐色带，在前缘外侧 1 β 处有一条斜至臀角的褐色带，斜带内侧有 1 个极大白斑。雌蝶近臀角有橙色斑点。

Pieridae: 大约共有 1241 种蝴蝶，中国有 129 种，遍布中国各省的高山与平原，但南北的优势种类有所差异，同种发生的代数也不同。粉蝶科蝴蝶在花园中很普遍，是恶名昭著的害虫。粉蝶科成虫的前足端部两爪间具有一个中垫(吸盘)，因此它们能够停留在竖立的玻璃等光滑的垂直物体表面。前后翅近似隋圆形；两翅中室均为闭式。前翅 R 脉 3 至 5 分支，多数种类前翅的 R2 与 R3 常合并，部分种类的 R4 与 R5 也有合并；M1 与 R 脉共柄；A 脉只有 1 条(2A)。后翅具有肩横脉(h)；两翅外缘较钝圆；静止时侧面看不见腹部，后翅内缘较发达，A 脉有 2 条(2A 及 3A)。不少种类呈二型，也有季节型。成虫须补充营养，喜吸食花蜜，或在潮湿地区、浅水滩边吸水。多数种类以蛹过冬，少数以成虫越冬。有些种类喜群栖。寄主植物主要为十字花科、豆科、白花菜科、蔷薇科植物，有的为蔬菜或果树重要害虫。

Pieris rapae Linne 又称菜青虫，属鳞翅目，粉蝶科。广西各地均有发生。寄主植物有十字花科、菊科、旋花科、百合科、茄科、藜科、苋科等 9 科 35 种，主要为害十字花科蔬菜，尤以芥蓝、甘蓝、花椰菜等受害比较严重。成虫体长 12~20 毫米，翅展 45~55 毫米，体黑色，胸部密被白色及灰黑色长毛，翅白色。雌虫前翅前缘和基部大部分为黑色，顶角有 1 个大三角形黑斑，中室外侧有 2 个黑色圆斑，前后并列。后翅基部灰黑色，前缘有 1 个黑斑，翅展开时与前翅后方的黑斑相连接。常有雌雄二型，更有季节二型的现象。随着生活环境的不同而其色泽有深有浅，斑纹有大有小，通常在高温下生长的个体，翅面上的黑斑色深显著而翅里的黄鳞色泽鲜艳；反之在低温条件下发育成长的个体则黑鳞少而斑型小，或完全消失。

1. 材料和方法

1.1.1 供试昆虫

实验所用的三种蝴蝶为中国吉林省长白山露水河地区生长的雄性蝴蝶，分别为：昆虫纲(*Insecta*)鳞翅目(*Lepidoptera*)蛱蝶科(*Nymphalidae*)柳紫闪蛱蝶(*Apatura ilia*)；

昆虫纲(*Insecta*)鳞翅目(*Lepidoptera*)锤角亚目(*Rhopalocera*)蛱蝶总科(*Nymphaloidea*)蛱蝶科(*Nymphalidae*)闪蛱蝶亚科(*Apaturinae*)迷蛱蝶属(*Mimathyma Moore*)白斑迷蛱蝶(*Mimathyma schrenckii*)；

昆虫纲(*Insecta*)有翅亚纲(*Pterygota*)鳞翅目(*Lepidoptera*)粉蝶科(*Pieridae*)粉蝶亚科(*Pierini Duponchel*)菜粉蝶(*Pieris rapae* Linne)。

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 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，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（实际操作中一般寻找包有红色包膜的球形）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，但不能压坏细胞大致结构。再放入液氮中 10min，之后于室温条件下自然风干，用刀片等器具挑开盖玻片。然后用 Giemsa（PH6.8）染色 15min，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. 2 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（实际操作过程中，由于染色体过小，难于配对）。然后根据相对长度的计算公式，算出染色体的相对长度（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%）。

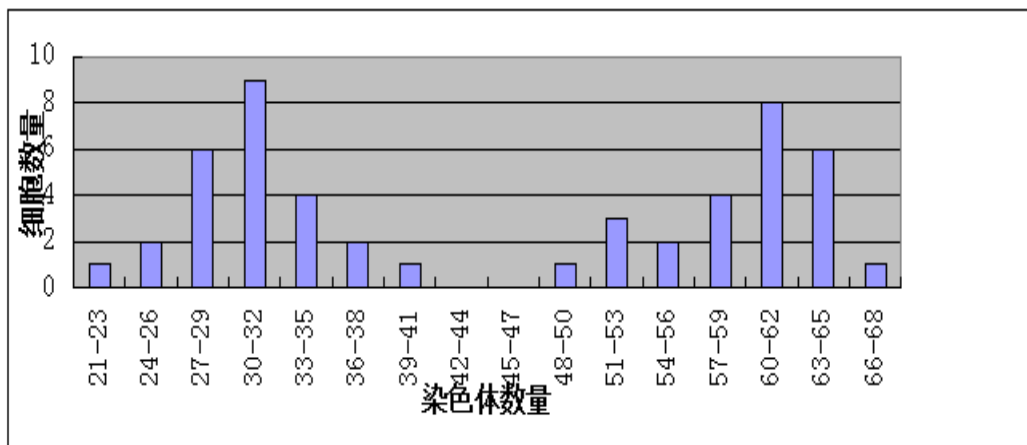
1. 2. 3 蝴蝶标本的鉴定

蝴蝶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。最后，将鉴定好的蝴蝶标本与制作的染色体样本一一对应。

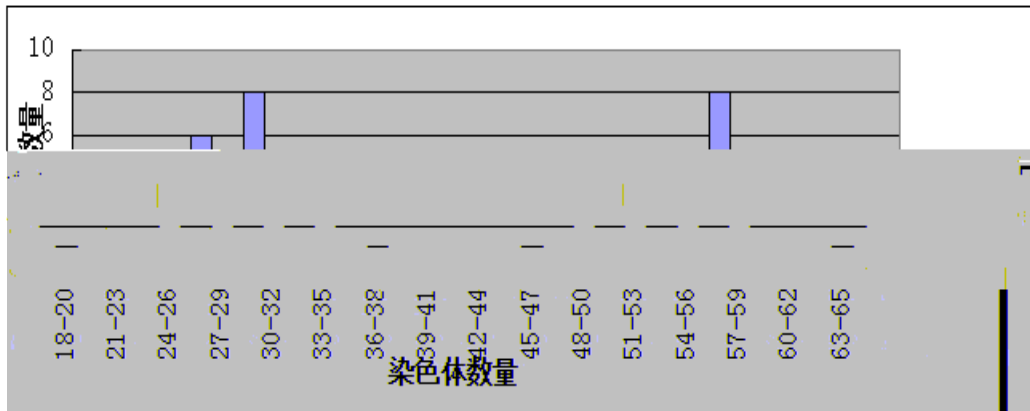
2. 结果与讨论

2. 1 染色体数量的确定

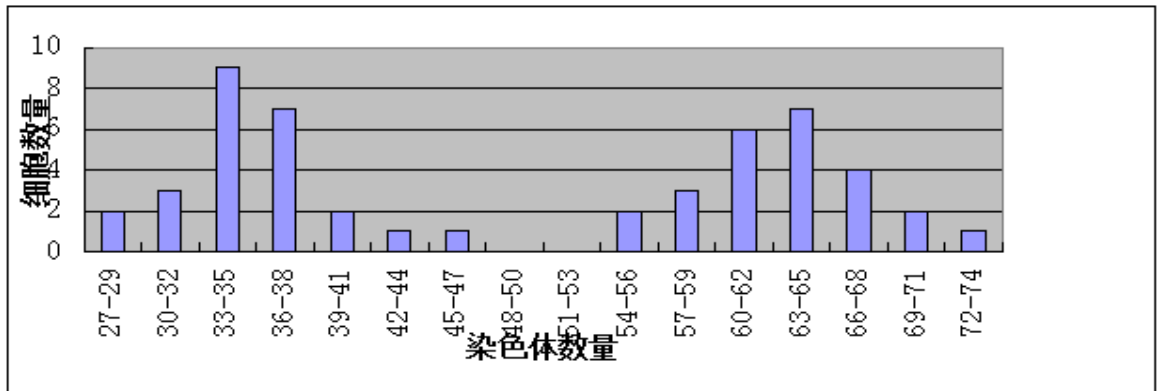
由于直接压片法的局限性,很难对鳞翅目昆虫的染色体进行详细的观察,甚至难以区分中期和后期^[9],不能确定观察到的细胞所在的时期。因此我们采取统计所有能看清染色体的细胞，得到了图一、图二、图三的结果。



图一 50 个白斑迷蛱蝶细胞中染色体在不同数量段的数量



图二 50 个菜粉蝶细胞中染色体在不同数量段的数量



图三 50 个柳紫闪蛱蝶细胞中染色体在不同数量段的数量

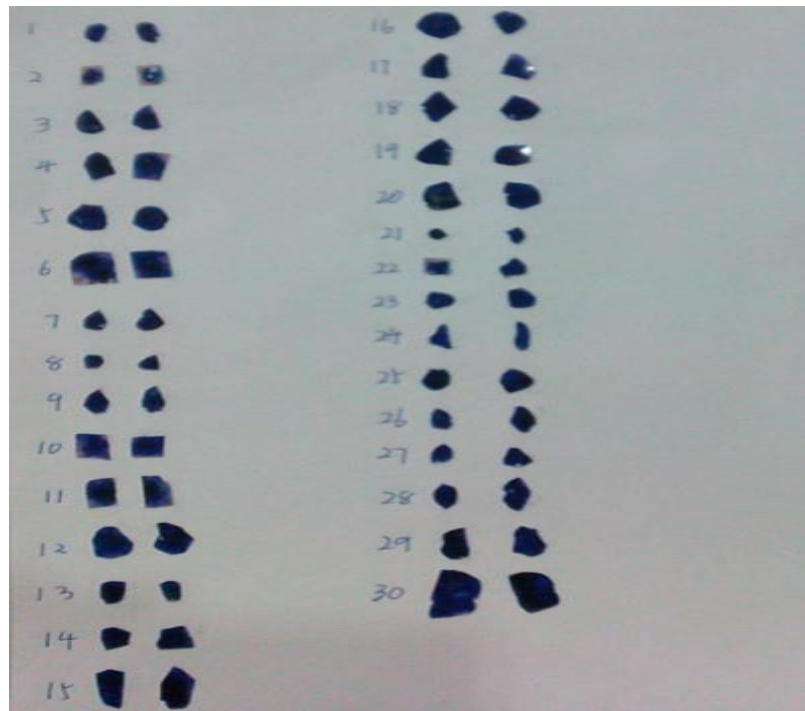
从图一可以看出，白斑迷蛱蝶的染色体数目在 30-32 和 60-62 这两个段最多，刚好他们有着 2 倍的数量关系，可以推测他们分别是单倍体和双倍体的数量关系。因为染色体有重叠现象,导致统计出不同的数量来。由于 66-68 的个数很少，那么 n 可能为 30 和 31，但 27-29 和 57-59 的数量也偏多，可推测白斑迷蛱蝶的单倍体染色体数目 $n=30$ 。

根据同样的原理，可以通过图二和图三得出 n 分别为 28 和 32,即菜粉蝶的单倍体染色体数目 $n=28$ ，柳紫闪蛱蝶的单倍体染色体数目 $n=32$ 。

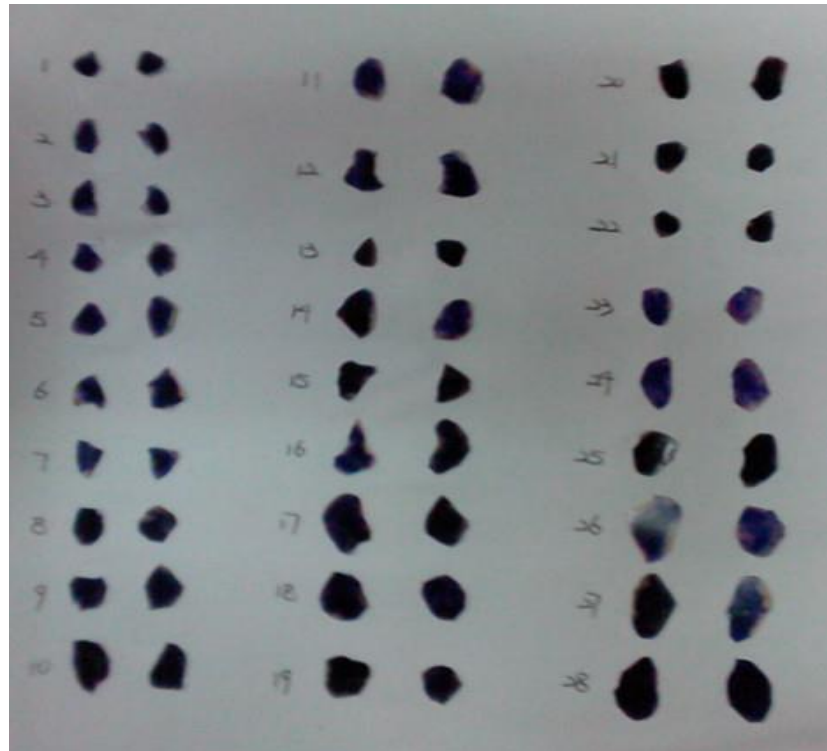
2.2 核型的确立

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。由于鳞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，

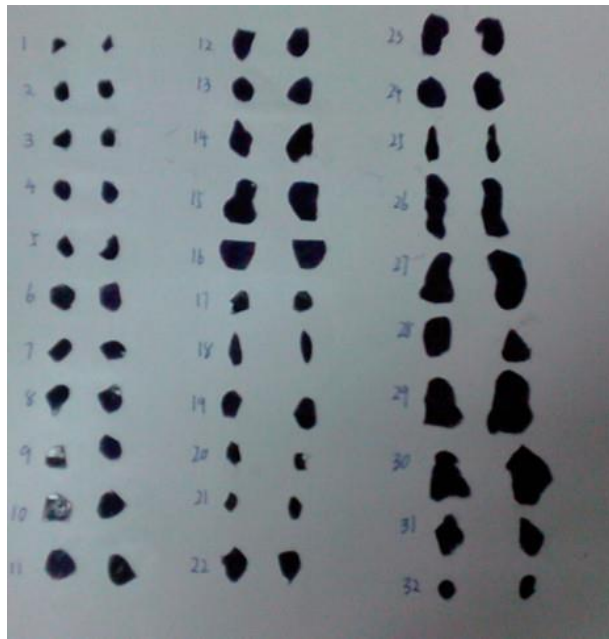
配成对,用 ImageJ 测量出其实际的长度,计算出相对长度。



图四 白斑迷蛱蝶染色体核型图



图五 菜粉蝶染色体核型图



图六 柳紫闪蛱蝶染色体核型

2.3 讨论

2.3.1 实验方法

实验过程中一共拍了三次照片，第一次照出的照片并未找到有完整细胞结构且染色体数目清晰的片子，第二次第三次找到个别能用的片子，但蝴蝶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，实验制片过程中压片力度难掌握，染色程度不一致，液氮中冷却时容易使片子破碎，总的来说改实验方法还需改进，直接压片法不是研究鳞翅目的最佳方法建议寻找更好的方法进行核型分析。

可以看出,对于鳞翅目昆虫染色体运用传统的压片法,只能看到一些高度浓缩的微小颗粒状的染色体,还有大面积的重叠的黑色阴影,对于核型的研究不是那么的精准。本实验只通过测量得到了染色体的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。这是由于鳞翅目染色体小于一般昆虫,数量上也比较多,形态无明显区别,对于使用剪纸法配对造成很多困难,普通的放大 100 倍的油镜不是研究鳞翅目染色体最好工具。实验过程中对于蝴蝶的捕获、解剖、分类、制片、拍照、分析使我们对鳞翅目的实验知识和过程有了更深的了解,从中也锻炼了实验的基本技能,受益良多。

希望以后对鳞翅目染色体的研究发现更多好的方法,将昆虫纲中第二大类的鳞翅目的染色体研究得更加完善,使我们更加了解鳞翅目的昆虫。

参考文献

- [1] 《长白山蝴蝶种类、分布及数量的调查》 周繇 《东北林业大学学报》
- [2] 《长白山地区访花蝴蝶的初步研究》 任炳忠, 魏文娟, 孟庆繁 《吉林农业大学学报》 2003年06期
- [3] 李储山, 刘生东. 长白山自然保护区蝴蝶区系研究[J]. 吉林林业科技, 2007, 36(4): 41-45.
- [4] 《中国蝴蝶分类与鉴定》 周桡 郑州河南科学技术出版社 1998
- [5] 《蝴蝶与蛾》(大卫·卡特)
- [6] 川副昭人, 若林守男. 原色日本蝴蝶图鉴[M]. Osaka: Hoikusha Publishing Co., LTD, 1976. 1-422
- [7] 《吉林省蝶类区系及分布》 邹娜, 张孝波, 魏晓红 《绿色科技》2011年第7期.
- [8] Avise JC. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution[M]. New York: Chapman & Hall.
- [9] Complete mitogenome of the Lesser Purple Emperor *Apatura ilia* and comparison with other nymphalid butterflies
CHEN Mei¹, TIAN Li-Li¹, SHI Qing-Hui¹, CAO Tian-Wen^{2,*}, HAO Jia-Sheng^{1,*}
- [10] insects and crustaceans[J]. Nature, 392(6677): 667-668.
- [11] 张礼生, 张青文, 蔡青年, 徐静等. 中国昆虫染色体研究现状与展望. 昆虫学报 Acta Entomologica Sinica, December 2003, 46 (6) : 773- 782.
- [12] 《吉姆沙氏染液显示肥大细胞的方法》 王士平, 汤传新 《新疆医科大学学报》 1981年01期
- [13] Butterflies[M]. Zhengzhou: Henan Scientific and Technological
- [14] 《鳞翅目昆虫染色体的研究方法》 黄国洋, 王荫长, 尤子平 华东昆虫学报 1994年01期
- [15] 《7种鳞翅目昆虫细胞系染色体分析》 张欣, 冯颖, 丁伟峰, 马涛, 马艳 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室
- [16] 常平安, 宋方洲, 童建松等. 蓖麻蚕染色体的核型研究. 蚕业科
- [17] 《柳紫闪蛱蝶形态特征研究初报》 林建华, 林仲, 刘亨平, 潘伟华, 杨丽琼 《武夷科学》 2005年00期
- [18] 《蛱蝶科遗传多样性及分子系统发育研究》 张敏 《山西大学》2008年
- [19] 《内蒙古大兴安岭林区蝶类种的记述(二)粉蝶科》 张效柱, 张军生, 滕文萍, 滕文霞 《内蒙古林业调查设计》 2009年05期
- [20] 《中国长白山蝶类彩色图志》 周繇, 朱俊义 2003年06月
- [21] Bozano G C. Guide to the butterflies of the Palaearctica region Satyridae part I[M]. Milano: Omenes Artes, 1999. 1-55.
- [22] Lee Seung Mo. Butterflies of Korea [M]. Seoul: Editorial Committee of Insecta Koreana: 1982. 1-125.