

## 烟青虫精母细胞减数分裂及单倍体核型研究

张礼生 张青文 蔡青年 徐环李 付建业

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100094)

**摘要** 采用压片法 HSG 显带技术,对烟青虫 *Helicoverpa assulta* Guenee 精母细胞减数分裂粗线期进行染色体组型研究,描述减数分裂各时期特征,分析其染色体数目频率分布与核型特征。烟青虫雄虫部分染色体为弥散型着丝粒染色体,另有部分染色体着丝点清晰可见,各染色体长从 1.27~5.01  $\mu\text{m}$  不等;单倍体染色体数  $n=31$ ,其中常染色体 30 条,性染色体 1 条;按 Lima-De-Faria 标准,烟青虫单倍体中含 5 条中型染色体和 26 条小型染色体;分裂相中染色体数目为 31 条者比例超过 50%,说明烟青虫染色体多态性较为显著。

**关键词** 烟青虫;减数分裂;染色体;核型

中图分类号 Q 963;S 433

文章编号 1007-4333(2004)04-0018-06

文献标识码 A

### Spermatocytes monoploid and karyotype of *Helicoverpa assulta*

Zhang Lisheng, Zhang Qingwen, Cai Qingnian, Xu Huanli, Fu Jianye

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** With HSG banding technique, we analyzed the karyotype of *Helicoverpa assulta* Guenee (Lepidoptera: Noctuidae) during meiosis pachytene. The results showed that the number of haploid monoploid chromosomes of *H. assulta* was  $n=31$ . There were 30 autosomes and one of sex chromosome in 31 chromosome of the male bollworm haploid, the most common number in Lepidopteran species. Part of chromosome was holocentromere. The chromosome length of *H. assulta* ranged from 1.27  $\mu\text{m}$  to 5.01  $\mu\text{m}$ . Based on the standard of Lima-De-Faria, there were also 5 middle-sized and 26 small-sized chromosomes among all the haploid. More than half of *H. assulta* had 31 chromosomes at their split phases showing that the chromosome polymorphism of *H. assulta* was much notable.

**Key words** *Helicoverpa assulta*; meiosis; chromosome; karyotype

烟青虫 *Helicoverpa assulta* Guenee 属鳞翅目,夜蛾科,其寄主植物有 70 多种,主要危害烟草、辣椒、番茄、棉花等,常与棉铃虫 *H. armigera* (Hubner) 同期为害,造成严重的经济损失。近年来研究发现烟青虫与棉铃虫间不存在严格意义的生殖隔离,种间杂交可育,其杂交子代具有生育能力,但正、反交与回交后代生命活力有显著差异<sup>[1]</sup>。目前对烟青虫和棉铃虫仍以化学防治为主,害虫抗药性、环境污染等弊端仍较明显。近年棉铃虫等害虫在转 Bt 基因抗虫棉田中的发生量又有回升,田间残虫较多,有学者认为棉铃虫已对转 Bt 基因抗虫棉产生一定程度的抗性,这个问题还有待研究。

国外昆虫染色体研究的报道较多,我国仅有 13 种鳞翅目昆虫的染色体得到了研究,多集中在蚕蛾类<sup>[2]</sup>,尚未见国内外有关烟青虫染色体研究的文献。本文将报道并探讨烟青虫精母细胞减数分裂行为及核型特征。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试虫标本制作

由中国科学院动物研究所提供烟青虫虫种,中国农业大学昆虫学系害虫综合治理(IPM)实验室饲养并建立纯化种群,饲养方法同 Teakle & Jensen<sup>[3]</sup>。选择五龄第 1~2 天幼虫的雄性个体剖

收稿日期:2004-05-10

基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(G2000016209);国家科技攻关计划资助项目(2001BA507A-11-02)

作者简介:张礼生,博士研究生;张青文,教授,通讯作者,主要从事昆虫染色体及害虫综合防治研究,E-mail:zhangqingwen@

263.net

取精巢。

在烟青虫五龄幼虫腹部注射 0.03% (质量分数) 秋水仙素, 黑暗中饲养 3~4 h 后, 取精巢, 浸入卡诺氏固定液 ( $V(\text{甲醇}) : V(\text{冰醋酸}) = 3 : 1$ ) 中固定, 8~12 h 后移入 70% (体积分数) 酒精溶液中, 置 4℃ 冰箱保存备用。

室温下将烟青虫精巢用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 解离 2 min, 45% (体积分数) 冰醋酸处理, 压片后冰冻揭片, 室温下晾干后在 95%—95%—100%—100% (体积分数) 的酒精中脱水脱醋酸, 室温下干燥。

HSG 显带法: 将材料于  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 室温下处理 30~40 min, 然后用  $2 \times \text{SSC}$  ( $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl +  $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_3\text{N}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 60℃ 恒温下培育 4~5 h, 水洗后在 5% (体积分数) 的 Giemsa 染液 (pH 7.2, 1/15 磷酸缓冲液稀释) 中染色 30 min。蒸馏水冲洗, 室温自然干燥。

## 1.2 观察照相与长度测量

玻片在 Olympus 显微镜下观察标记并进行照相处理 ( $\times 1000$ )。

选取清晰的染色体照片, 在放大的照片上以游标卡尺测量 20 组染色体数据, 或者用微细铜丝沿染色体长度使之重叠, 最后测量拉直后的铜丝长度。分别测定染色体全长, 并按下式换算染色体绝对长度和相对长度:

$$\text{染色体绝对长度} = \frac{\text{放大的染色体长度}(\text{mm})}{\text{放大倍数}} \times 1000$$

$$\text{染色体相对长度} = \frac{\text{该染色体长度}}{\text{染色体组总长度}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 烟青虫减数分裂各时期

镜检表明, 烟青虫精巢中大部分精母细胞发生减数分裂, 少数呈现有丝分裂特征。

烟青虫减数分裂的第 1 次分裂属于异型分裂, 染色体随着减数分裂进程总体上表现出逐步缩短变粗的趋势。

间期 (图 1-A): 镜检中大多数的分裂相都为间期, 此时染色质随机分布在整个核质之中, 核仁和染色中心由于染色深而显得突出。染色体随着减数分裂进程总体上表现出逐步缩短变粗的趋势。

前期: 这一时期并不是严格的实体, 一般被划

分为 5 个亚时期, 即细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期, 各亚时期均为连续的变化, 没有明显的界限。前期 的一个重要特征是由于水合作用的增加, 核的体积大大增加, 这个增加比有丝分裂时要大许多倍。这一时期持续时间很长, 染色体为完成有丝分裂不需要完成的特殊功能而在进行着准备, 这些功能就是染色体配对, 染色单体交换, 相斥以及端化。

细线期 (图 3-B): 镜检中观察到染色粒的珠状结构沿染色体全长度出现, 细线期染色体细长缠绕在一起, 难以区分各条染色体。这一时期与有丝分裂相比细胞要更大些, 染色体也比有丝分裂前期的染色体长和细。

偶线期 (图 3-C): 此时减数分裂的染色体由于逐步盘旋而变短变粗。同源染色体进行配对并出现联会复合体, 核仁非常显著。

粗线期 (图 3-D): 染色体清晰可辨认, 出现花束状结构, 染色体末端似乎被连接到核膜上。同源染色体紧密地靠拢并形成二价体。核仁在这一时期非常明显。

双线期 (图 3-E): 染色体进一步收缩变粗, 交叉后更加清晰。

中期 (图 1-F, G): 镜检可见烟青虫染色体二价体汇在赤道板上, 核仁、核膜均已消失。由于染色体数目过多, 彼此界限不易区分, 故中期 中, 31 个二价体并不容易辨别。

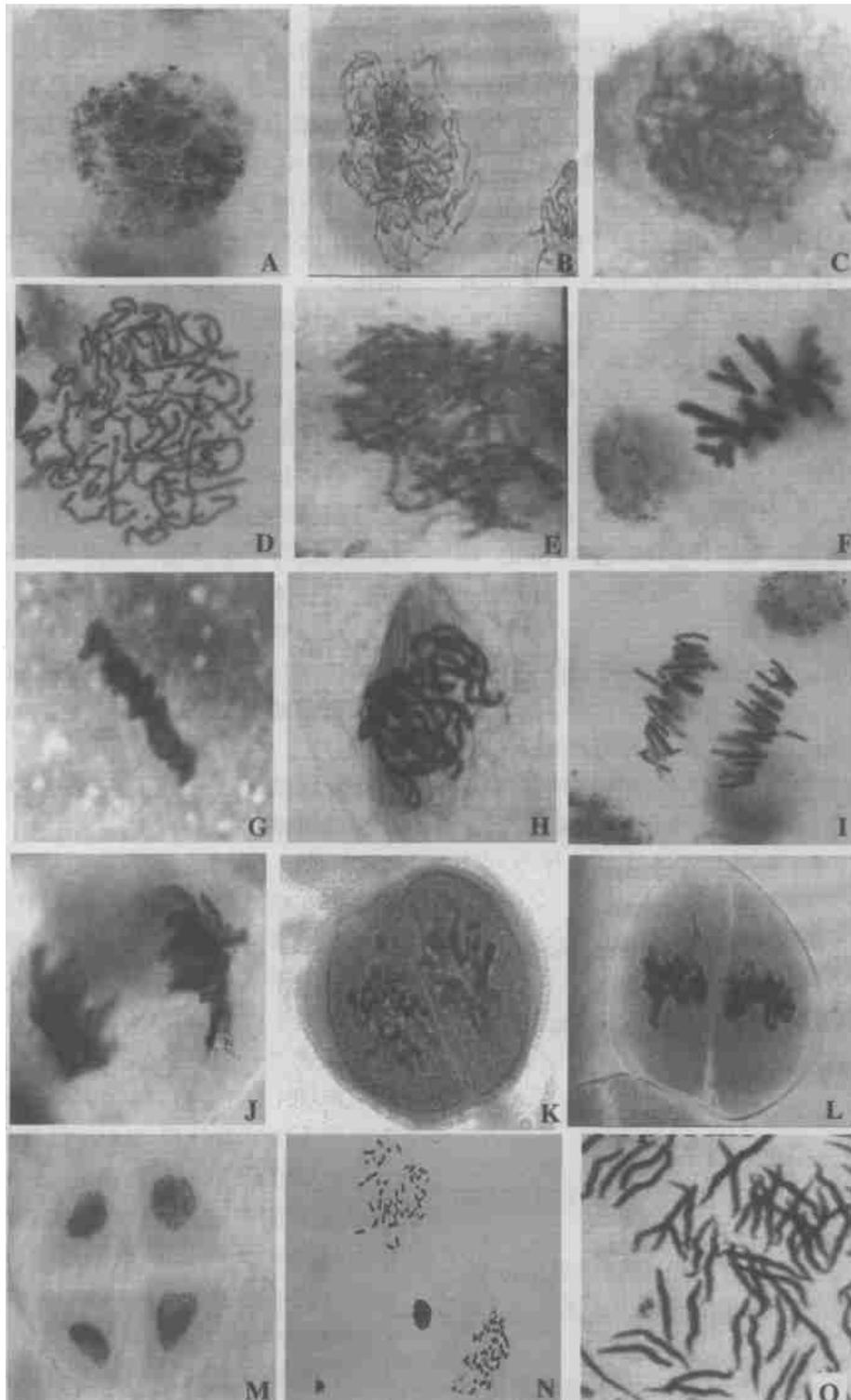
后期 (图 1-H, I): 此时烟青虫四分体染色体已分离成二分体染色体, 并开始移向两极。

末期 (图 1-J): 烟青虫染色体到达相反两极, 完成第 1 次减数分裂, 2 个次级精母细胞产生。

前期 (图 1-K)、中期 (图 1-L) 和末期 (图 1-M) 均如图所示, 经此过程完成了减数分裂的第 2 次分裂, 最终产生 4 个配子细胞 (图 1-N) 最后经过加尾修饰形成成熟的精细胞 (图 1-O)。

### 2.2 烟青虫染色体数目及核型

观察并计数清晰的烟青虫染色体单倍体, 计算其染色体数目出现的频率分布, 汇总结果如表 1 所示, 在观察的 547 个细胞中染色体数目从 25~33 条均有不同程度分布, 另有 27.06% 的配子细胞染色体数目为 30 条, 显示了烟青虫染色体的多态性。尽



A, B—间期; C—细线期; D—偶线期; E—粗线期; F, G—中期; H, I—后期; J—末期;  
K—前期; L—中期; M—末期; N—未成熟配子; O—成熟精细胞

图1 烟青虫精母细胞减数分裂各时期分裂相

Fig. 1 Spermatocytus meiosis of *Helicoverpa assulta*

表 1 烟青虫配子染色体数目频数分布  
Table 1 Occurrence frequency of chromosome  
in kidney cells of *H. assulta*

染色体数	配子数	频率/ %
25	5	0.91
26	11	2.01
27	11	2.01
28	17	3.11
29	43	7.86
30	148	27.06
31	283	51.74
32	21	3.84
33	8	1.46
合计	547	100

管配子中染色体数目出现 30 条的几率较高,但有 51.74% 染色体数目为 31 条,故可认定烟青虫染色体的单倍体数为  $n = 31$ 。

对清晰的烟青虫精母细胞减数分裂粗线期分裂相(图 2-A)进行剪切翻拍,获得烟青虫雄虫核型特征图(如图 2-B),由于烟青虫雄虫为 ZZ 型染色体,其性染色体形成二价体时与常染色体的二价体在形态上一致,故在全部染色单体中不能准确区分出性染色体来。

烟青虫粗线期绝对长度、相对长度见表 2,其绝对长度最短为  $1.27 \mu\text{m}$ ,最长者为  $5.01 \mu\text{m}$ ,是最短者的 3.95 倍。按关于染色体类型划分的 Lima-De-Faria“染色体场”理论评判,烟青虫单倍体中有 26 条染色体绝对长度在  $1 \sim 4 \mu\text{m}$  之间,属于小型染色体,另有 5 条染色体绝对长度在  $4 \sim 12 \mu\text{m}$  之间,属于中型染色体。

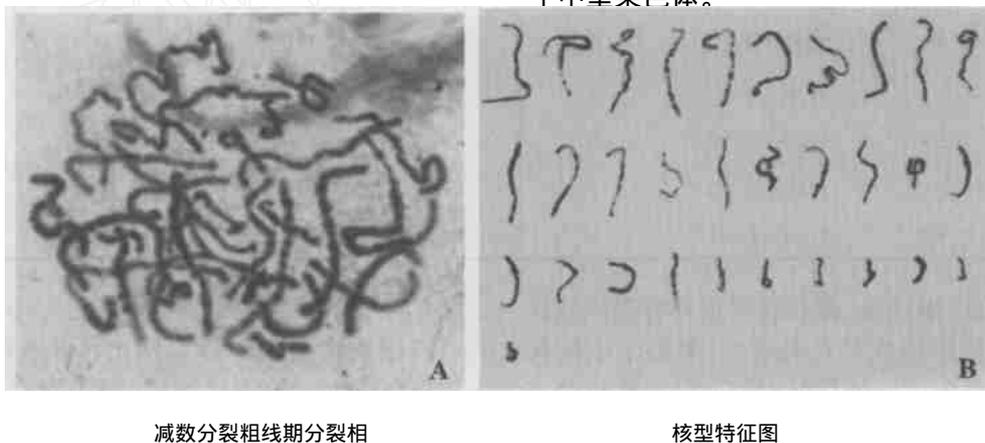


图 2 烟青虫染色体核型

Fig. 2 The karyotype of *H. assulta*

### 3 结论与讨论

1) 烟青虫与同属的棉铃虫、美洲棉铃虫 *H. zea* 都存在种间杂交且子代可育或部分可育的现象<sup>[5~9]</sup>。近年来的研究表明,烟青虫(铃夜蛾属)作为 *Heliothis* 的亚属<sup>[10]</sup>,其系统关系得到了进一步明确;然而烟青虫与同属的其他物种杂交可育的细胞遗传学机理尚未见报道。由于烟青虫与棉铃虫、美洲棉铃虫杂交子代的生存能力与繁殖能力存在性别间、正反交间的差别,可应用于遗传防治中,故此遗传理论上的探讨及细胞遗传学的研究都有必要深入展开。

鳞翅目是昆虫纲中第二大类群,但到目前为止

已知染色体数目的鳞翅目昆虫仅有 800 多种,只占其已知种类的很少部分<sup>[2,4]</sup>。究其原因有二,一是鳞翅目昆虫染色体体积较小而数目较多,各分裂相中极易互相叠加、交叉,给研究带来一定困难;二是尽管目前可选用的染色体分带技术较多如 A, C, G, N, R 和 T 带,银染表面铺展等等,但却都有其局限,往往要通过数种显带方法的综合应用才能更好地显示染色体特征,无疑这又是一个难点。

鳞翅目昆虫染色体单倍数多为 31 或 30<sup>[11]</sup>,本试验获得烟青虫的染色体单倍体数目  $n = 31$ ,符合夜蛾科染色体单倍体数目为 31 的常规<sup>[12,13]</sup>。在已知染色体数目的铃夜蛾属昆虫中,棉铃虫和美洲棉铃虫染色体的单倍体数目均为  $n = 31$ <sup>[6,7]</sup>,这就从

表 2 烟青虫染色体的编号、相对长度和分组类型

Table 2 Number, actual length, relative length and classified set of each chromosome of *H. assulta*

编号	绝对长度/ μm	相对长度 ± 标准差	染色体 类型	编号	绝对长度/ μm	相对长度 ± 标准差	染色体 类型
1	5.01	5.51 ±0.17	M	17	2.76	3.04 ±0.24	S
2	4.73	5.20 ±0.16	M	18	2.69	2.96 ±0.16	S
3	4.32	4.75 ±0.20	M	19	2.61	2.87 ±0.13	S
4	4.37	4.81 ±0.21	M	20	2.61	2.87 ±0.11	S
5	4.27	4.70 ±0.14	M	21	2.54	2.79 ±0.21	S
6	3.58	3.94 ±0.13	S	22	2.47	2.72 ±0.22	S
7	3.48	3.83 ±0.16	S	23	2.38	2.62 ±0.29	S
8	3.41	3.75 ±0.18	S	24	2.37	2.61 ±0.13	S
9	3.27	3.60 ±0.20	S	25	2.24	2.47 ±0.22	S
10	3.19	3.51 ±0.22	S	26	2.07	2.28 ±0.27	S
11	3.14	3.45 ±0.24	S	27	2.02	2.22 ±0.22	S
12	3.11	3.42 ±0.19	S	28	1.88	2.07 ±0.12	S
13	3	3.30 ±0.22	S	29	1.81	2.00 ±0.16	S
14	2.99	3.29 ±0.17	S	30	1.61	1.78 ±0.17	S
15	2.9	3.19 ±0.15	S	31	1.27	1.40 ±0.20	S
16	2.82	3.10 ±0.21	S				

遗传上为烟青虫、棉铃虫、美洲棉铃虫等铃夜蛾属昆虫种间杂交并可育创造了先决条件,来自于不同种亲本的配子染色体可以进行配对融合。当然也会有一系列的问题出现,从而导致杂交子代的生命活力包括生存力、繁殖力等有显著的衰减等差异。

2) 在本试验获得的烟青虫减数分裂各时期分裂相中,细线期发现了染色粒的珠状结构,沿染色体的全部长度出现。关于此现象,有学者认为这就是基因的可见表现形式<sup>[14]</sup>,而另有学者的研究证明其是染色质丝盘绕比染色粒间区域更紧一些的区域<sup>[15-17]</sup>。试验中发现了呈花束状排列的粗线期染色体构造,此时染色体末端似乎被连接到核膜上中心体所在位置,曾有学者设想花束的形成可能对下一时期有所帮助<sup>[18]</sup>。由于烟青虫染色体数目较多,观察其他物种染色体数目、形态最理想的终变期和中期并不特别适合观察研究烟青虫染色体。烟青虫减数分裂中染色体的行为与棉铃虫精母细胞减数分裂的染色体行为<sup>[19]</sup>较为相似。

3) 由于烟青虫染色体中部分着丝点属于弥散型染色体,几乎所有分裂相都有数目不等的弥散型着

丝粒染色体的存在,即便按广泛应用的 Levan 的四点四区系统<sup>[20]</sup>可以计算臂比和着丝粒指数,将烟青虫染色体划分为不同类型,但由于存在弥散型着丝粒染色体,做为整体而言,依旧不能得到烟青雄虫单倍体的核型公式。

按 Lima-De-Faria 的“染色体场”(chromosome field)理论<sup>[21]</sup>划分,烟青虫单倍体中有 26 条染色体属于小型染色体,另有 5 条染色体属于中型染色体。“染色体场”理论认为,在长度为 1~4 μm 的小染色体中,除弥散型染色体外都具有正常的着丝点和端粒,但由于二者相距太近,其基因调动的自由度非常小,相邻基因有着很强的相互影响,所以其染色体场是严格的。而长度为 4~12 μm 的中型染色体,除弥散型染色体外,着丝点和端粒二者间的距离适宜,包含有 DNA 序列的主要类型,染色体场处于最合适的工作条件,这也是最适于基因调控和表达的染色体场。有关烟青虫染色体场及基因调控等还有待深入研究。

4) 鳞翅目昆虫染色体的着丝粒是否为弥散型目前尚未有定论。一种观点认为鳞翅目昆虫着丝粒为

弥散型,并且弥散型着丝粒是由初级着丝粒演化而来<sup>[22]</sup>;另一种观点则认为鳞翅目昆虫染色体上存在主缢痕,其染色体着丝粒有初级着丝粒和弥散着丝粒2种<sup>[18]</sup>。在一些高级的蛾类如家蚕中具有清晰的弥散着丝粒,蝶类中也存在弥散着丝粒<sup>[23]</sup>。试验分析获得的烟青虫的染色体上具有非常明显的主缢痕,并可以清晰地看到着丝点,但也有部分染色体的着丝点不可见,属弥散型着丝点,支持了后种观点。这种现象同时也表明在系统进化上夜蛾科较天蚕蛾科、蝶类更为原始。

目前已知鳞翅目的性别决定机制为ZW/ZZ,其雄性个体性染色体为ZZ型,即2个性染色体的大小和形状是相同的,与常染色体对没有差别,故此有助于染色体核型在精母细胞减数分裂粗线期还不足以确定性染色体,性染色体确定还要依赖于进一步的联会复合体研究。

中国科学院动物研究所王琛柱研究员惠赠烟青虫虫种,深表谢忱!

### 参 考 文 献

- [1] 王琛柱,董钧锋. 棉铃虫和烟青虫的种间杂交[J]. 科学通报,2000,45(20):2209~2212
- [2] 张礼生,张青文,蔡青年,等. 中国昆虫染色体研究历史与展望[J]. 昆虫学报,2003,46(6):773~782
- [3] Teakle R E, Jenson J M. *Heliothis punctiger*. In: Singh P, Moore R F, eds. Handbook of insect rearing[M]. Vol 2. Amsterdam: Amsterdam University Press, 1985
- [4] Brown W V. Textbook of cytogenetics[M]. Saint Louis: C V Mosby Co, 1972
- [5] Wang C Z, Dong J F. Interspecific hybridization of *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Chinese Science Bulletin, 2001,46(6):489~491
- [6] Laster M L. Interspecific hybridization of *Heliothis virescens* and *H. subflexa* [J]. Environ Entom, 1972(1):682~687
- [7] Laster M L, Hardee D D. Intermating Compatibility between North American *Helicoverpa zea* and *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Russia [J]. J Econ Entom, 1995,88(1):77~80
- [8] Laster M L, Sheng C F. Search for hybrid sterility for *Helicoverpa zea* in crosses between the North American *H. zea* and *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China[J]. J Econ Entom, 1995,88(5):1288~1291
- [9] Krueger C M, Degrugiller M E, Narang S K. Size difference among 16S genes from endosymbiotic bacteria found in tests of *Heliothis virescens*, *H. subflexa* (Lepidoptera Noctuidae), and backcross sterile male moths [J]. Fla Entom, 1993,76:382~383
- [10] Matthews M. The classification of the Heliothinae (Noctuidae) [D]. London:University of London,1987
- [11] Makino S. A review of the chromosome numbers in Animals[M]. Revised Tokyo: Hokuryukan,1956
- [12] Robinson R. Lepidoptera genetics[M]. Oxford: Pergamon Press, 1971
- [13] Bigger T. Karyotypes of some Lepidoptera chromosomes [J]. Cytologia, 1975,40:713~726
- [14] Belling J. The ultimate Chromosomes of *Lilium* and *Aloe* with regard to the number of genes[J]. Univ Calif Publ Bot, 1928,14:307~318
- [15] Ris H. The structure of meiotic chromosomes in the grasshopper and its bearing on the nature of "chromomers" and "lamp-brush chromosomes"[J]. Bioi Bull, 1945,89:242~257
- [16] Crick F H C. General model for the chromosomes of higher organisms[J]. Nature, 1971,234:25~27
- [17] Judd B M, Shen M W, Kaufman T C. The anatomy and function of a segment of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*[J]. Genetics, 1992,71:139~156
- [18] Moens P B. The fine structure of meiotic chromosome polarization and pairing in *Locusta migratoria* spermatocytes[J]. Chromosoma, 1969,23:1~25
- [19] 张礼生,张青文,蔡青年,等. 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hubner) 精母细胞减数分裂研究[J]. 植物保护,2004,30(2):33~36
- [20] Levan A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964,52:201~220
- [21] Lima-de-Faria A. The chromosome size gradient of the chromosomes of rye[J]. Hereditas, 38:246~248
- [22] Bauer H. Die kinetische organisation der Lepidopteren chromosomen [J]. Chromosoma (Berl.), 1967,22:101~107
- [23] Murakami A. cytological evidence for holocentric chromosome of the silkworm, *Bombyx mori* and *mandarina*[J]. Chromosoma (Berl.), 1974,47:16~21