养。这里将该饲养技术介绍给读者参考。

1 水培法培育麦苗

1.1 种子处理

清水浸种(夏季可加少量的百菌清防止霉变,一般不用加),浸种 24 h 后,用清水将种子淘干净,除去不完整的种子,以保证种子的发芽率。

1.2 育苗

将普通滤纸剪成直径大约为 9 cm 的圆片,平铺在直径 9 cm 的玻璃或塑料培养皿(洗净,60 ℃恒温烘干,定期灭菌)中,加入 6 ~ 8 mL 清水(水量不宜过多,否则种子会烂掉,可视具体情况适当增减水量),将事先准备好的种子均匀的平铺在培养皿中,每皿大约 150 粒种子。早晚各往培养皿中加入 3 ~ 4 mL 水(可视具体情况适当增减水量),1 周后可 1 天加 1 次水。一般,在 25 ℃条件下,第 2 天种子出芽;第 4 天即可接虫(见封底彩版Ⅰ(图 1 ~ 4 同):图 1)。

2 麦蚜的饲养

2.1 饲养条件

麦蚜在温度 18 ~ 25 ℃,相对湿度大约为 50% ~ 70%,光照为 17h∶7h(日光灯)的条件下饲养。有麦苗的培养皿放在长 67.5 cm,宽 38 cm,高 28.5 cm,上下为玻璃,四周为 100 目尼龙纱网的养虫笼中,阻止外界昆虫的进入饲养。

2.2 接虫与繁育

待麦苗长至第 4 天,如没有特殊试验要求(例如单头饲养等),一般将新苗直接放到有虫苗的旁边即可(图 2),麦蚜会自行爬到新苗上进行繁育,一个培养皿苗上的蚜量多的可达 500 头以上,一般也能到 300 ~ 400 头(图 3);如需进行单头饲养,则先对取虫部位的麦苗哈一口气,麦蚜接受温热的反应,其口针会从麦苗组织中拔出,待其爬动后,用毛笔从其尾部伸入腹部下面将其挑起,接到新苗上,大约 10 d 后,繁育快,产若蚜多的(如麦禾谷缢管蚜),蚜量可达 150 头以上。麦长管蚜由于繁育慢,产若蚜数少等特点,比其他麦蚜需要的时间长一些,但每皿麦苗仍可达到 500 头。本实验室用此种方法饲养麦蚜 40 多代,继代存活率高,能达到 90% 以上,繁殖率没有降低的现象,1 头蚜虫(如禾谷缢管蚜)一生可产若蚜 30 头以上。蚜虫平均体重没有减轻的现象。

水培麦苗饲养麦蚜,麦苗发病率低,一批麦苗可维持 10 ~ 15 d 左右,但为了给麦蚜提供优良充足的营养,应及时更换补充新苗(7 d 左右更换 1 次)。在此条件下饲养的麦蚜生长历期为 5 ~ 9 d 左右,个体大小均匀。

利用水培麦苗饲养的麦蚜适用于喷雾、浸液、药膜、点滴等各种毒力测定方法以及其他研究用。也可将内吸性杀虫剂加到清水中进行内吸杀虫毒力测定。图 4 显示出麦蚜在室内大量的饲养。

参 考 文 献

1 陈巨莲,倪汉祥,丁红建,孙京瑞. 中国农业科学,2000,33(3):54 ~ 59.

2 李凤春,谢水仙. 植物保护,1981,7(5):40 ~ 42.

橘小实蝇染色体研究与相关技术探讨*

方 颖 林敏杰 王 莹**

(暨南大学 生命科学技术学院 生物工程学系 广州 510632)

Karyotype analysis and configuration observation of *Bactrocera dorsalis* chromosomes. FANG Ying, LIN Min-Jie, WANG Ying**(*College of Life Science and Technology*, *Jinan University*, Guangzhou 510632, China)

* 暨南大学本科生科技创新工程资助目(编号:cx04058)。

** 通讯作者,E-mail:tyingw@jnu.edu.cn

收稿日期:2006-05-15,修回日期:2006-08-08

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

Abstract To investigate chromosomes of *Bactrocera dorsalis*(Hendel), we performed karyotype analysis of the gonad chromosomes and configuration observation of the salivary gland chromosomes by using an improved phenol fuchsin. Our results show that: (a) the adult *B. dorsalis* has a diploid number of 12 chromosomes in the gonads with the length continuously varying. The sex chromosomes were identified as the XX/XY types; (b) In the polytene complements of larval salivary glands, five long chromosomes (ten polytene arms) correspond to the five pairs of autosomes in the adult. Our work thus confirms the effectiveness of the improved phenol fuchsin in studying chromosomes of salivary glands and gonads of Bactrocera dorsalis.

Key words *Bactrocera dorsalis*, the gonad, the salivary gland, chromosomes, improved phenol fuchsin

摘 要 以橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis*(Hendel)性腺和唾液腺为材料,采取改良苯酚品红染色后压片法,制备染色体标本。对橘小实蝇进行染色体组型研究和唾液腺染色体形态学的观察。结果表明:橘小实蝇成虫性腺染色体数目为 2n=12 条,染色体长度基本呈连续性变化,其性染色体属于 XX/XY 型。幼虫唾液腺染色体包含 5 条较长的多线染色体,与成虫常染色体相对应。实验显示苯酚品红染色后压片为制备染色体标本简单有效的方法。

关键词 橘小实蝇,性腺,唾液腺,染色体,改良苯酚品红

橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel)又名东方实蝇、黄苍蝇、果蛆,属双翅目(Diptera),实蝇科(Tephritidae)。该虫寄主范围广,主要危害番石榴、芒果等 46 个科 250 多种果树、蔬菜和花卉,世界许多国家和地区把它列为重要的危险性检疫对象。目前,国内外对橘小实蝇在形态描述,综合防治,分子遗传标记有部分报[1,2],而在染色体水平上的报道较少。梁广勤等采用橘小实蝇 3 龄幼虫的脑组织细胞进行了染色体的组型分析[3]。

染色体是生物遗传物质的载体,其结构特征具有相对恒定性,可以作为生物鉴别分类的参考依据[4],对进一步研究染色体畸变、分子水平的基因定位和基因转移具有重要价值。

双翅目幼虫唾腺细胞中具有多线化的巨大染色体,其染色体复制多次而不分裂,染色线紧密地结合在一个染色体结构之内,每个染色体上带纹的宽窄、数目、疏密及排列顺序都因物种不同而异。每一种幼虫唾腺及其染色体都有各自独特的形态结构,这种形态结构差异可为种群分化的研究提供十分有利的条件。

本研究对橘小实蝇成虫的性腺进行染色体组型分析。对 3 龄幼虫的唾液腺染色体进行了观察,并比较了数种制片技术,以期为进一步研究该虫的遗传防治和抗药性机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的橘小实蝇采自暨南大学,利用性引诱剂捕捉,于温箱饲养。

1.2 方法

1.2.1 染色体标本制备方法:(1)性腺染色体标本制备方法(Ⅰ):参照陈斌等的方法[5],取羽化时间较短,尚未交配的雄虫,解剖性腺浸泡于 0.05%的秋水仙素溶液中 8 h 后取出,置于 0.07 mol/L KCl 溶液中低渗 30 min,在甲醇:冰乙酸=3:1 的固定液中固定 45 min。将性腺置于载玻片加 1 滴 50%冰乙酸软化后,盖上玻片,压片使细胞分散,小心地移去盖玻片。载玻片置于无尘处晾干,10:1 Giemsa 染液(pH=6.8 的磷酸缓冲液配制),扣染 20 min,冲洗多余染液晾干后,镜检观察。

(2)性腺染色体标本制备方法(Ⅱ):性腺于 0.07 mol/L KCl 溶液中低渗 20 min,改良苯酚品红染液(常规配法)染色 20 min,用 1 滴 45%冰乙酸分色后压片,镜检观察。

(3)唾液腺染色体标本制备方法:取肥壮的 3 龄幼虫解剖唾液腺,0.2 mol/L HCl 解离 1 min,水洗后,用改良苯酚品红(同上)染色 20~30 min,加 1 滴 45%冰乙酸分色后压片,镜检观察。

1.2.2 染色体镜下观察与拍照:将制作较好的玻片标本置于 OLYMPUS 光学显微镜下观察分析,选择好的分裂相拍照(1 000×)。

1.2.3 染色体数目统计和组型分析:取性腺中

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

期分裂相照片，进行染色体数目统计，依据 Levan 等的标准进行组型分析。

2 结果与分析

2.1 橘小实蝇的染色体数目

橘小实蝇成虫性腺的中期分裂相染色体数目众数值为 2n＝12，与多数实蝇类染色体的数目一致[4,6]。12 条以下次之，另见少数染色体数目为 13 条。产生非众数分裂相的原因可能有部分染色体随试剂液体漂流而丢失，或者染料颗粒及杂质与染色体混淆，或者是计数时的误差。

2.2 橘小实蝇的染色体组型

染色体组型分析是在对染色体进行测量计算的基础上，进行分组、配对进行形态分析的过程。组型分析对于探讨物种亲缘关系与进化、远缘杂种的鉴定都有重要意义。

橘小实蝇完整的二倍体（2n＝12）中，可配对的常染色体为 5 对。同大多数双翅目昆虫一样[4,6,7]，橘小实蝇的性染色体为 XY 型。除 Y 染色体外，其它染色体多为中部和近中部着丝粒，无明显特殊性结构。5 对常染色体中，2 对较大，3 对中等大小，从 1 号到 5 号递减。X 染色体较短，稍大于 Y 染色体。有的细胞分裂相缺少 X 染色体。Y 染色体最小呈点状，不易看清楚着丝粒的位置。染色体组型图见封底彩插图版Ⅳ：图 1。

2.3 异染色质的位置

通常用 CBG 显带方法来观察染色体中异染色质[8]。而用苯酚品红染色也可以观察到异染色质。位于常染色质的基因容易被 DNA 酶接近，而异染色质被压缩成紧凑的结构，基因不容易被 DNA 酶接近[9]。未经 DNase-Ⅰ 切口移位的染色体部位对碱性品红（苯酚品红的主要原料）有较大的亲和力，形成深带。但经 DNase-Ⅰ 切口移位的染色体部位，失去了嗜碱性品红的特性，形成 DNase-Ⅰ 敏感区特征性的浅带[10]。故异染色质部位容易被碱性品红深染。图 1 部分染色体（如 1 号染色体）可以清楚地看到染色体的着丝粒和端粒部位被苯酚品红深染。由于不同种类昆虫的常，异染色质的部位差异很大[11]。因此异染色质的分布可以做为物种的鉴别和研究之用。

2.4 橘小实蝇幼虫唾液腺染色体

多线染色体由 Balbiani 首先在双翅目幼虫的唾腺细胞发现，它存在于双翅目幼虫的组织细胞如唾腺、气管、肠和马尔比基氏管。多线染色体来源于核内 DNA 多次复制而细胞不分裂，产生的子染色体并行排列且同源染色体配对紧密联结[12]，同时，染色质丝长度、数目的增加和盘旋的染色质丝的横向分离，都有助于形成多线染色体。

橘小实蝇幼虫的唾液腺染色体包含 10 条较长的多线染色体，与有丝分裂细胞的常染色体对应。橘小实蝇唾液腺染色体形态特点、带纹见封底彩插图版Ⅳ：图 2。

染色体上带纹是物种所固有的形态特征，其数目、分布、疏密程度等恒定且可靠。横纹被认为是染色小粒横向排列而成的，其线性排列与基因的线性排列密切相关，是研究染色体的部分缺失、倒位、重复、反复、易位等现象的标记。1 条横纹带可以包含 1 个以上的基因，间带也可能有基因定位[13]。在带和间带上，常染色质和异染色质的密度和分布不同，可以用作物种鉴别的标记[14]。巨大染色体多线化程度的差异性导致相应染色体在长度、宽度、伸展度与缠绕程度、带纹可见数目、染色性能等方面的变化。双翅目幼虫唾腺染色体因种的不同而在这些方面表现出差异[15]。

2.5 染色体标本制片方法的分析

2.5.1 性腺染色体标本制备的 2 种方法分析：通常昆虫的性腺染色体制片方法多为秋水仙素处理、低渗、固定、晾干后用 Giemsa 染液染色，方法（Ⅰ）采用的基本是这种方法。

分散细胞的方法一般有压片后液氮冰冻揭片法[16]，撕片法[17]和离心制取细胞悬液滴片法[18]等。根据不同情况可以采取不同的方法，本实验采用的是压片后揭片法。当材料数量有限时，不宜采用离心法。又该虫的性腺很小，用解剖针撕片不易操作，镜检时看到大部分组织

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

并未分开;使用解剖针操作常会因用力不当而在载玻片上刻出划痕,影响观察。压片前用1滴50%冰乙酸软化,然后盖片,固定住盖玻片并严防移动,用玻璃瓶胶塞将性腺从中间向四周轻轻压散,直到肉眼看不见有形组织为止。然而揭片后部分细胞沾染到盖玻片上造成损失,有待改进。

图3为采用方法(Ⅰ)的照片。可见图4的染色体聚缩而短粗,故其组型分析的效果欠佳。原因可能是秋水仙素的使用和载玻片的晾干处理引起染色体收缩,难以显示正常的染色体形态和精细结构[19]。

与方法(Ⅰ)相比,方法(Ⅱ)操作简单且效果更好。省去秋水仙素处理和甲醇:冰乙酸固定液固定的步骤,而且压片后不用揭片就可以直接观察。在制片过程中使用方法(Ⅰ)的玻片标本,其细胞数和分裂相数目均少于方法(Ⅱ),原因在于方法(Ⅰ)中盖玻片的揭取会损失一部分细胞,扣染和染色后的水洗又使更多的细胞流失。而方法(Ⅱ)保留全部组织和细胞,因此,能够观察到较多的细胞分裂相。

2.5.2 染液的选择:吉姆萨染液是常规的细胞学研究染色液,具有广泛的用途,但也有其缺陷:缓冲液的pH值要求严格,必须现配现用;染色分化不易控制[20]。

实验证明,改良的苯酚品红是性腺和唾液腺染色体的优良染色剂,着色力强且背景清晰。用此法制得的染色体具有耐保存、高稳定性、持久不褪色的优点。

本实验曾比较醋酸洋红和苯酚品红等几种染色剂的着色力,结果显示苯酚品红的效果包括染色深度[21]、清晰度、染色体的形态更好,染色体与背景的反差更大,染色耗时更短[22]。且发现配好后并保存5个月的改良苯酚品红染液(常规配法)的着色力强于新配置的染液。

3 小结

昆虫染色体的研究可以丰富昆虫遗传学的理论内涵与知识体系,揭示昆虫的种类演替和进化的客观规律,并指导害虫的遗传防治,也为探明昆虫抗药性形成的机理提供新的途径。本研究以重要经济害虫橘小实蝇的性腺和唾液腺染色体为材料,分析了橘小实蝇染色体的数目和组型特征并展示了唾液腺多线染色体的形态特点,有利于对橘小实蝇的遗传特性和抗药性机理的进一步研究。改良苯酚品红压片法操作简便,效果优良,是制作橘小实蝇染色体标本较为理想的方法,可以更广泛地应用于其它昆虫染色体的研究和实践中。

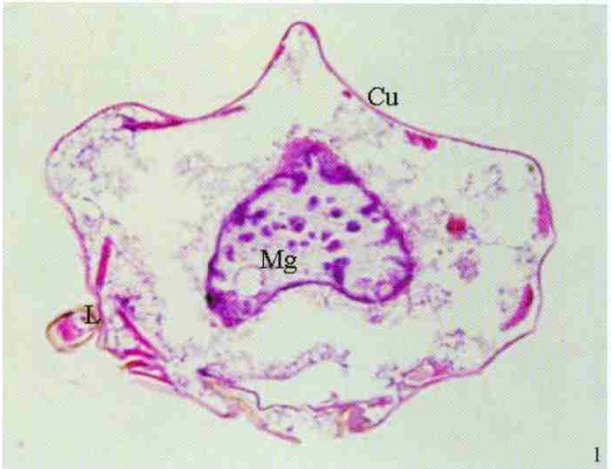
致谢 承蒙广东省农业科学院冯莉老师赠送橘小实蝇性引诱剂,暨南大学生物工程系梁郁强老师在显微摄影上提供帮助,特致谢意!

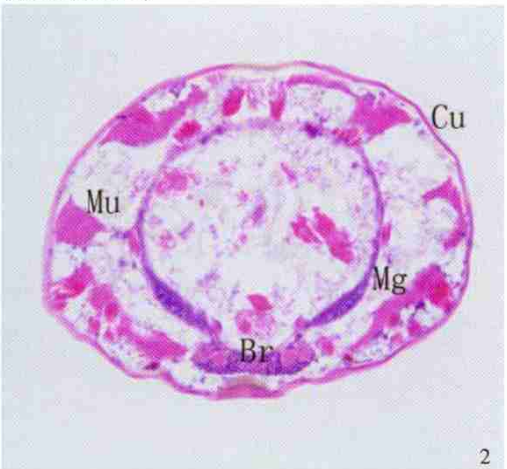
参 考 文 献

1 黄素青,韩日畴.昆虫知识,2005,**42**(5):479~483.
2 李志红,龚鹏,陈洪俊,陈乃中.植物检疫,2002,**3**:165~166.
3 梁广勤,梁帆.昆虫知识,1993,**3**(6):356~357.
4 张礼生,张青文,蔡青年,徐静,周明奘,等.昆虫学报,2003,**46**(6):773~782.
5 陈斌,杨本立,李正跃.云南农业科技,2005,**3**:15.
6 梁广勤,杨国海,梁帆,林双,徐伟,等.植物检疫,1994,**1**:4~9.
7 Mavragani-Tsipidou P. *Genetica*, 2002, **116**: 45~57.
8 李新江,张道川,王文强.遗传,2005,**27**(5):735~740.
9 刘峰涛.生命的化学,2004,**24**(2):108~109.
10 李桂源,姚开泰,潘世成.中国肿瘤,1997,**6**(6):32.
11 Baimai V., Phinchongsakuldit J., Sumrandee C. *Biol. J. Linnean Soc.*, 2000, **69**:399~409.
12 翟中和,王喜忠,丁明孝.细胞生物学.北京:高等教育出版社,2000.279~280.
13 Gavrila L., Ecovoiu A. A., Laura M. G. *J. Cell. Mol. Med.*, 2001, **5**(1):74~78.
14 Black W. C., Lanzaro G. C. *Insect Mol. Biol.*, 2001, **10**(1):3~7.
15 毛连菊,杨少闻,谢祚浑.中国水产科学,2000,**7**(2):22~27.
16 常岩林,廉振民.遗传,2002,**24**(2):155~158.
17 曹文清,林元烧,张跃军.厦门大学学报,1994,**33**(6):853~856.
18 杨秀芝,王俊森.动物学研究,1994,**15**(2):93~96.
19 孙红英,张锡然,苏翠荣,谢小燕,王进,高峰.动物学杂志,1998,**33**(2):30~31.
20 Cramer A. D., Roger E. R., Parker R. J. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1973, **60**: 148~156.
21 刘春明,张燕,何丽娟.吉林师范大学学报(自然科学版),2004,**11**(6):62~64.
22 何兰花,卢家现.生物学杂志,2000,**17**(2):28~29.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

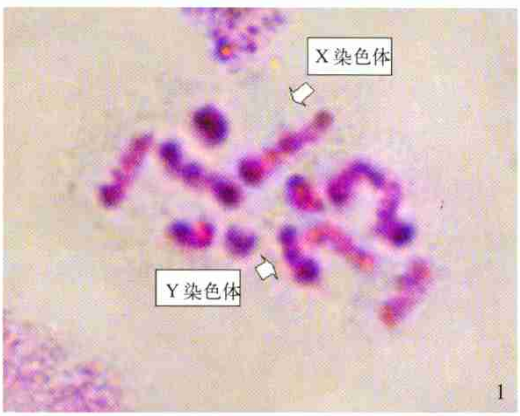
图版Ⅲ 张莺莺等：尘螨连续石蜡切片的制备及染色技术（正文见P294）

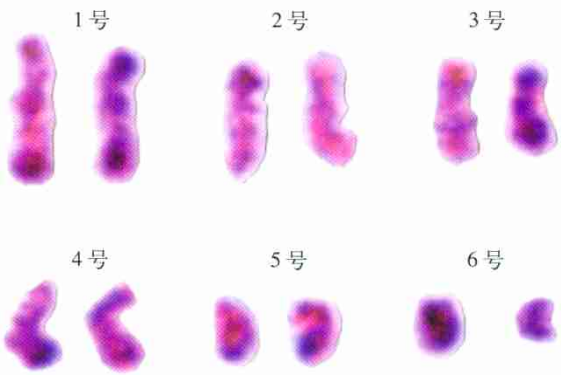


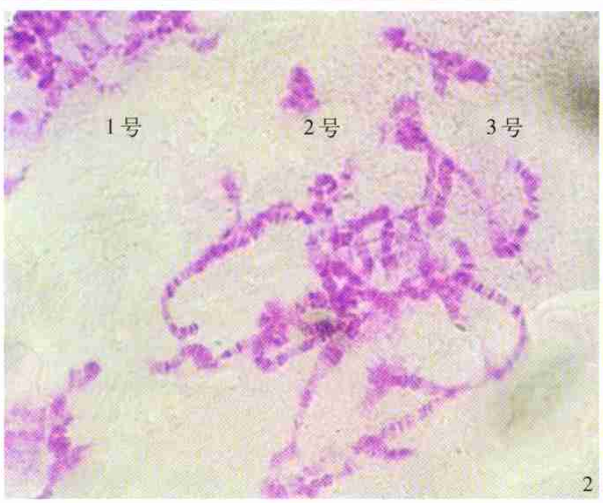


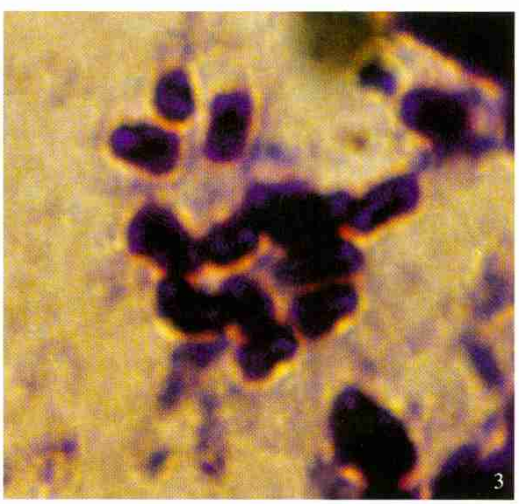
1．粉尘螨常规方法切片　2．粉尘螨改进方法切片（HE染色(×60) Cu 体壁；Mg 中肠；L 足；Mu 肌肉；Br 脑）

图版Ⅳ 方颖等：橘小实蝇染色体研究与相关技术探讨（正文见P290）









1．橘小实蝇的染色体组型（放大1 000倍）　2．橘小实蝇唾液腺染色体（放大200倍）
3．橘小实蝇性腺细胞染色体（放大1 000倍）

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n