DOI: 10.3969/j. issn. 1000 - 7083. 2012. 01. 027

榕树传粉昆虫榕小蜂染色体制备方法研究

柳青[1,2]，欧晓红[3]，侯香莲[1,2]，杨大荣[1*]

（1. 热带森林生态学重点实验室，中国科学院西双版纳热带植物园，昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院，北京 100049; 3. 森林灾害预警与控制重点实验室，西南林业大学，昆明 650224）

摘要：榕树与其传粉昆虫榕小蜂之间具有高度专一的互惠共生关系，榕小蜂为榕树传粉的同时又在榕果内营寄生生活，直至完成其整个生活史，因此一直以来对榕小蜂的染色体研究存在很大困难。本文以对叶榕 *Ficus hispida* 传粉榕小蜂 *Ceratosolen solmsi* 和鸡嗉子榕 *F. semicordata* 传粉榕小蜂 *C. gravelyi* 为材料，摸索出一套适合于榕树传粉昆虫榕小蜂染色体研究的详细、有效的技术和方法。应用该法对对叶榕传粉榕小蜂 *C. solmsi* 和鸡嗉子榕传粉榕小蜂 *C. gravelyi* 的染色体核型进行了研究，结果表明两种榕小蜂的染色体核型特征非常相似，具有相同的染色体数目 2n(♀) = 10，染色体类型全部为中着丝粒染色体，臂数 NF = 20。此外，在相对长度方面两者也没有明显的差异。最后与 Imai 等 1988 年研究蚂蚁染色体时提出的方法进行了比较。利用本文介绍的方法进行榕小蜂染色体制备，操作过程简单、重复性强，不仅能够得到大量的染色体分裂相，而且染色体细胞界限明确、形态清晰、分散良好。

关键词：榕小蜂；染色体制备；方法

中图分类号：Q969.54; Q343.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000 - 7083(2012)01 - 0116 - 04

Study on the Method of Chromosome Preparation of Fig-pollinating Wasps (Hymenoptera, Agaonidae)

LIU Qing[1,2], OU Xiao-hong[3], HOU Xiang-lian[1,2], YANG Da-rong[1*]

(1. Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbannan Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: The association between *Ficus* species and their pollinator-fig wasp is a most remarkable example of a plant-insect mutualism. The fig wasps need to lay their eggs in the minor receptive flowers of fig syconia and complete their lifecycle in it while they are pollinating the figs. With the materials of two fig-pollinating wasps species, *Ceratosolen solmsi* (pollinator of *Ficus hispida*, Hymenoptera, Agaonidae) and *C. gravelyi* (pollinator of *F. semicordata*, Hymenoptera, Agaonidae), a set of effective research method with detailed procedures of chromosome preparation is found. According to the method described here, the karyotype of *C. solmsi* and *C. gravelyi* were analysed, it was indicated that the two species have similar karyotype with a chromosome number of 2n = 10(♀), all the chromosome are metacentric(NF = 20) with little differences in relative length. Moreover, we compared this method with the one proposed by Imai *et al.* in 1988 that the procedure of this method described here was simple and repeatable, with which a number of well defined and dispersed metaphase plates can be obtained.

Key words: fig-pollinating wasps; chromosome preparation; method

榕树是榕属 *Ficus* 植物的总称，隶属荨麻目 Urticales 桑科 Moraceae。榕小蜂是榕树高度专一的传粉昆虫，隶属膜翅目 Hymenoptera 小蜂总科 Chalcidoidea 榕小蜂科 Agaonidae。榕小蜂雌雄异型，雌蜂黑褐色，个体最大的约 2 mm，头部呈扁平的铲状，复眼、触角正常，具翅能飞行，产卵器长短因种而异，有的种类前足基节、中胸腹侧具 2 对花粉筐；雄蜂淡黄色，体形比雌蜂略小，腹部弯曲，复眼、触角、双翅和中足均退化，上颚及前、后足腿节发达(陈勇等，2002)。

榕小蜂在为榕树传粉的同时又在榕果内营寄生生活，完成其整个生活史直至成虫羽化飞出。正是

收稿日期：2011-03-28　　接受日期：2011-05-23

基金项目：国家自然科学基金(30970403，30970439)；西南林业大学森林灾害预警与控制重点实验室开放基金(ZK10B302)

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yangdr@xtbg.ac.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由于榕小蜂这种特殊的生物学特性加之其微小的体型，都成为限制榕小蜂染色体研究的最大障碍。目前，有关榕小蜂细胞染色体方面的研究几乎一片空白。首先，榕小蜂的整个生长发育过程都是在榕果密闭的环境内完成，先后经历卵、幼虫、蛹及成虫四个虫态，然而对于各不同虫态的发育历期目前一无所知，而且不同的榕小蜂种类其生长发育情况又有很大不同，这对于选取时期恰当的染色体制备材料是相当困难的; 其次，自然条件下榕树隐头果内除了传粉榕小蜂外，还有许多非传粉小蜂种类，它们能够利用长的产卵器刺穿果壁到达果腔完成产卵(徐磊等，2005) ，并和传粉榕小蜂一起生长发育，在幼虫和预蛹期阶段无法与传粉榕小蜂区别，这就无法保证实验材料的准确性。迄今为止，有关榕小蜂染色体方面的研究国内还没有相关的报道，国外仅 Gokhman 等在 2010 年报道了无花果 *Ficus carica* Linnaeus 的传粉小蜂 *Blastophaga psenes* Linnaeus 的染色体(Gokhman *et al.*, 2010) 。本研究在参考了国内外有关蚂蚁和一些其他的寄生蜂以及双翅目的蝇类染色体研究(凌发瑶，1984; Imai *et al.*, 1988; Gokhman & Quicke，1995) 的基础上，结合榕小蜂材料的特殊性，提出一套较新的适合榕小蜂染色体研究的方法，并得到相当满意的结果，现报道如下。

1　材料和方法

1.1　研究地点及材料

该研究在中国科学院西双版纳热带植物园(Xishuangbanna Tropical Botanical Garden，XTBG) 内实施。该植物园位于云南省西双版纳傣族自治州勐腊县勐仑镇，约在 21°09′～22°36′N、99°58′～101°50′E 之间。

研究材料为对叶榕 *Ficus hispida* Linnaeus f. 传粉榕小蜂 *Ceratosolen solmsi* Mayr 和鸡嗉子榕 *F. semicordata* Buchanan-Hamilton *ex* Smith 传粉榕小蜂 *C. gravelyi* Grandi，两者隶属膜翅目小蜂总科榕小蜂科 *Ceratosilen* 属 *Ceratosolen* 亚属(Wiebes，1994) (表 1) 。

表 1　实验材料的采集信息及供试样本数
Table 1　Collection information and sample sizes of two *Ceratosolen species*

种名 Species	采集时间和地点 Date and locality	寄主树 Host species	样本数 Sample number
Ceratosolen solmsi	2009-04，XTBG	*F. hispida*	20
Ceratosolen gravelyi	2009-04，XTBG	*F. semicordata*	10

1.2　研究方法

1.2.1　榕果套袋放蜂　在中国科学院西双版纳热带植物园(勐仑镇) 榕树园内分别各选一棵结果量大、树高合适的对叶榕和鸡嗉子榕雄树挂牌标记。当被选定的样树刚开始结果时，选 50 个左右的榕果用纱网袋(20 cm × 25 cm，120 筛目) 套袋隔离，防止其他非传粉榕小蜂在实验果上产卵。待实验果进入雌花期时解开纱网袋实施人工放蜂。放蜂前一天用纱网袋各自收集两种榕树的传粉榕小蜂蜂源，第二天太阳出来前带着蜂源对实验果实施人工放蜂，每个榕果内放进 2～3 只传粉榕小蜂。放完蜂后继续套上纱网袋以隔离其他非传粉小蜂产卵，直至榕果发育到合适的取材时期。

1.2.2　染色体玻片的制备

(1) 取材: 正确选取处于预蛹期的榕小蜂材料是其染色体制备能否成功的关键。待套袋放蜂后的榕果发育至间花期中后期时，此时榕果内的榕小蜂发育至预蛹期，采摘榕果带回实验室。

(2) 脑组织解剖及培养: 剖开榕果，在蔡司公司生产的 ZEISS Discovery V12 体视解剖镜下从瘿花中剥离出榕小蜂幼虫，迅速用昆虫针挑入 Ringer 液中冲洗 2～3 次，然后再放入 Ringer 液中，在解剖镜下解剖出脑组织，并迅速挑入加有秋水仙素的培养液中(秋水仙素的浓度为 0.07～0.08 mg/mL) ，置于 25℃的恒温培养箱培养 3～4 h。

(3) 低渗: 吸弃培养液，加入浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液在 25℃下低渗 30～50 min。

(4) 固定: 吸弃低渗液，加入新配制的卡诺氏固定液(甲醇∶冰醋酸 = 3∶1) 于 4℃冰箱固定 1～3 h。

(5) 制片: 吸弃固定液，将材料移至一张滴有 60% 冰醋酸的干净载玻片上处理 1 h，使脑组织充分软化，并用解剖针充分撕碎脑组织，然后滴加数滴固定液，使细胞分散均匀，空气干燥。

(6) 染色: 干燥后的玻片用 5% Giemsa 液(pH6.8) 进行染色 30 min，接着用细流水小心冲洗，置室温下无尘处使其自然干燥。

(7) 镜检观察、测量和照相: 干燥后的玻片在 OLYMPUS BX51显微镜下观察标记，对分裂好的染色体进行显微拍照。

1.2.3　染色体核型分析　将标记好的玻片放在显微镜下观察，每种榕小蜂各选取染色体形态清晰、分散良好的5个细胞，进行染色体数目统计以及相关

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

核型参数的测量和计算，并用 Photoshop 8.0 软件对其染色体进行图像的切割配对。核型参数的计算方法如下：

染色体相对长度(RL) = 每条染色体实测长度/染色体组总实测长度 × 100%

臂比值(r) = 长臂长度(q) /短臂长度(p)

着丝粒指数(CI) = 短臂长度/染色体全长 × 100%

核型不对称系数 = 长臂总长/全组染色体总长 × 100%

分别计算每对染色体的相对长度、臂比和着丝粒指数。根据 5 个细胞的平均值，作为模式核型的参数，然后依据 Leven 等(1964) 的标准对染色体类型进行划分，并参照 Stebbins(1971) 的核型分类标准，根据核型中染色体的长度比(最长染色体与最短染色体之比) 和臂比两项参数，确定染色体核型分类。

2 结果与分析

2.1 对叶榕传粉榕小蜂

对叶榕传粉小蜂 *C. solmsi* 的染色体数目 2n(♀) = 10，染色体臂数 NF = 20。染色体全部为中着丝粒染色体。染色体相对长度变化范围为 24.85 ~ 14.42，最长与最短染色体的比值为 1.72，臂比值范围为 1.02 ~ 1.16(表 2，图 1)。核型公式为 2n = 2X = 10 = 10 m，核型不对称系数为 51.51%，核型为 Stebbins-1A 型。

表 2　对叶榕传粉榕小蜂 *C. solmsi* 染色体分析数据
Table 2　The chromosome data of *C. solmsi* from *F. hispida*

参数 Parameter	染色体序号 Serial number of chromosomes				
	1	2	3	4	5
长臂 Long arm (%)	12.69	11.61	9.81	9.89	7.50
短臂 Short arm (%)	12.16	11.21	9.65	8.56	6.92
全长 Total length	24.85	22.82	19.46	18.45	14.42
臂比 Arm ratio	1.04	1.04	1.02	1.16	1.08
染色体类型 Chromosome type	m	m	m	m	m
着丝粒指数 Centromere index	48.93	49.11	49.57	46.37	48.01

2.2 鸡嗉子榕传粉榕小蜂

鸡嗉子榕传粉小蜂 *C. gravelyi* 的染色体数目 2n(♀) = 10，染色体臂数 NF = 20。染色体全部为中着丝粒染色体。染色体相对长度变化范围为 23.86 ~ 15.37，最长与最短染色体的比值为 1.55，臂比值范围为 1.04 ~ 1.33(表 3，图 2)。核型公式为 2n = 2X = 10 = 10 m，核型不对称系数为 53.98%，核型为 Stebbins-1A 型。

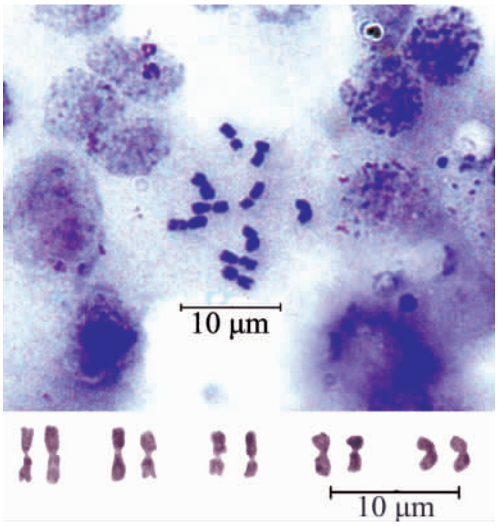

图 1　对叶榕传粉榕小蜂 *C. solmsi* 有丝分裂中期染色体核型
Fig. 1　The karyotype of *C. solmsi* from *F. hispida*

表 3　鸡嗉子榕传粉榕小蜂 *C. gravelyi* 染色体分析数据
Table 3　The chromosome data of *C. gravelyi* from *F. semicordata*

参数 Parameter	染色体序号 Serial number of chromosomes				
	1	2	3	4	5
长臂 Long arm (%)	13.30	10.53	11.12	11.19	7.84
短臂 Short arm (%)	10.56	10.07	9.43	8.42	7.53
全长 Total length	23.86	20.60	20.55	19.61	15.37
臂比 Arm ratio	1.26	1.04	1.18	1.33	1.04
染色体类型 Chromosome type	m	m	m	m	m
着丝粒指数 Centromere index	44.27	48.90	45.89	42.94	48.99

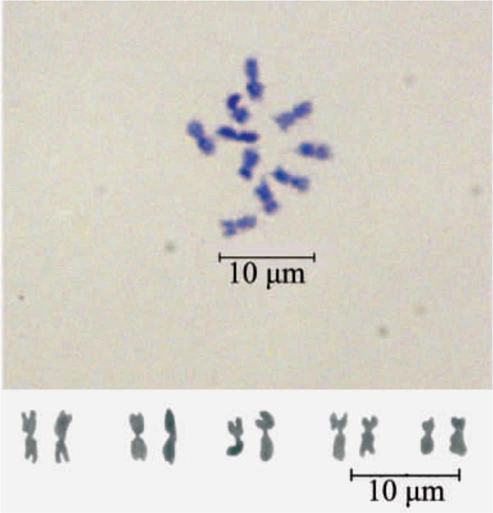

图 2　鸡嗉子榕传粉榕小蜂 *C. gravelyi* 有丝分裂中期染色体核型
Fig. 2　The karyotype of *C. gravelyi* from *F. semicordata*

3 讨论

本文介绍的方法是经作者反复试验和摸索总结出的，运用此方法以对叶榕传粉榕小蜂 *C. solmsi* 和鸡嗉子榕传粉榕小蜂 *C. gravelyi* 为材料进行染色体

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

研究，结果表明，在前期对榕果进行套袋隔离，并采用人工放蜂后能够保证实验材料的准确，后期用本文介绍的方法进行染色体制备取得了良好的效果，不仅能够得到大量的染色体分裂相，而且染色体细胞界限明确、形态清晰、分散良好。从两种小蜂的染色体核型来看，两者在核型特征上非常相似，种间分化不明显，具有相同的染色体数目 2n(♀) =10，染色体类型全部为中着丝粒染色体，染色体臂数 NF =20; 此外，两者在染色体相对长度方面也没有明显的差异。

Imai 等(1988) 以预蛹期脑神经组织为材料对分布于澳大利亚的 *Myrmecia* 属蚂蚁复合体(species complex) 进行了染色体研究，并在文中提出了一套完整的适合于蚂蚁及其他一些寄生性膜翅目昆虫的染色体制备方法。此法成为后来许多学者研究寄生性膜翅目昆虫染色体的常用方法。Gokhman 等(2010) 首先报道了无花果 *F. carica* 传粉小蜂 *B. psenes* 的染色体，文中写到他们的染色体制备过程就是按照 Imai 等提出的方法进行的。与 Imai 等的方法相比，本文介绍的方法有三个方面的优点。

(1) 玻片制备过程简单。Imai 等提出的方法在蚂蚁染色体研究中取得了一定的效果，但其染色体制备过程相对复杂，尤其是在染色体玻片制备后期固定时须采用 3 种不同的固定液分别对材料进行固定，既耗费时间又耗费溶剂。本文介绍的方法在后期固定时仅使用常用的固定液(甲醇∶冰醋酸 =3∶1) 进行一次性固定即可。

(2) 材料预处理效果理想。两种方法都以预蛹期虫体的脑组织为材料进行制片，但 Imai 等的方法在预处理时使用的处理液为含有秋水仙素的柠檬酸盐溶液，而本文介绍的方法在预处理时使用含有秋水仙素的小牛血清培养液对脑组织进行一定的培养，不仅可以在短时间内保持细胞的活力，而且可以促进细胞的分裂。

(3) 重复性较好。应用本文介绍的方法进行染色体制备时重复性较好。作者以对叶榕传粉小蜂 *C. solmsi* 和鸡嗉子榕传粉小蜂 *C. gravelyi* 的脑组织为材料，每种制片 100 张，95% 的玻片都能得到数量较多的中期分裂细胞。

目前染色体研究进入一个全新的阶段，不再是单一的染色体特征描述，而是结合染色体带型(C 带、G 带、Ag-NOR 等) 以及其他一些染色体研究的新方法如染色体显微分离与显微克隆(Microisolating and Microcloning) 、染色体连锁图谱(Linkage Map) 、染色体原位杂交(*in situ* Hybridization) 、染色体涂染(Chromosome Painting) 、染色体基因定位(Gene Localization) 以及染色体片段转移(Fragment Transferring) 等开展研究工作，而且已经取得了大量的研究成果。然而，成功制备出染色体是这些新方法应用的前提。榕小蜂作为榕树高度专一的传粉昆虫，有关其染色体的研究仍存在大量空白。本文介绍的方法为今后深入开展榕小蜂染色体研究提供了可能。作者认为，要做好本实验还需要把握好以下几个实验的关键: (1) 实验材料的准确选择: 以预蛹期脑组织为材料制片，就需要对材料准确鉴定。为了保证实验材料的准确，我们前期采用榕果隔离套袋、人工放蜂实验，发现可以很好地解决这一问题。(2) 预处理液中秋水仙素的浓度: 预处理液中秋水仙素的浓度高低事关染色体浓缩程度，浓度过高或过低都不利于后期的计数和测量。(3) 低渗时间的掌握: 低渗时间的长短直接关系到染色体的分散程度和染色体数目保持完整与否。低渗时间太短，则细胞中染色体分散不开，会发生染色体大量重叠在一起的现象，影响观察和计数。

4　参考文献

陈勇，李宏庆，马炜梁. 2002. 榕树传粉生物学的特性 [J]. 杭州师范学院学报(自然科学版) ，1(3) : 59 ~61.

凌发瑶. 1984. 七种蝇的染色体核型研究 [J]. 动物学研究，5(3) : 51 ~56.

徐磊，杨大荣，彭艳琼，等. 2005. 西双版纳榕树及其隐头果内的小蜂群落 [J]. 林业科学研究，18(4) : 497 ~503.

Gokhman VE, Mikhailenko AP, Fursov VN. 2010. Chromosomes of *Blastophaga psenes* (Hymenoptera: Agaonidae) [J]. Journal of Hymenoptera Research, 19(1) : 187 ~188.

Gokhman VE, Quicke DLJ. 1995. The last twenty years of parasitic Hymenoptera karyology: An update and phylogenetic implications [J]. Journal of Hymenoptera Research, 4: 41 ~63.

Imai HT, Taylor RW, Crosland MWJ, *et al*. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interation hypothesis [J]. Japanese Journal of Genetics, 63: 159 ~185.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 52: 201 ~220.

Stebbins GL. 1971. Chromosome evolution in higher plants [M]. London: Edward Aronld: 85 ~96.

Wiebes JT. 1994. The Indo-Australian Agaoninae (Pollinators of Figs) [M]. Amsterdam: North-Holland: 208.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net