

七星瓢虫成虫脂肪体细胞核的多倍性现象

关雪辰 陈娥英

(中国科学院动物研究所)

摘要 为要了解七星瓢虫 (*Coccinella septempunctata*) 成虫不同发育时间及不同发育部位脂肪体细胞核 DNA 合成的情况及激素对 DNA 合成的调节,我们以扫描显微分光光度法测定了脂肪体细胞核 DNA 的相对含量,并以该虫精细胞核作为单倍体参考标准,从而计算出脂肪体细胞核的倍数值。本文对雄成虫及不同发育阶段的雌成虫脂肪体细胞核 DNA 含量进行了测定,结果表明有多倍化现象发生;而且随着生殖腺的成熟, DNA 分布趋向于较高倍体。用 ZR-512 处理雌虫,经 72 小时后与对照相比脂肪体细胞核 DNA 合成较多,而且脏壁层脂肪体较体壁层脂肪体出现更为复杂的倍性变化,表明 ZR-512 对 DNA 合成有促进作用。

脂肪体是昆虫体内营养物质的贮存器官也是中间代谢的主要组织,与生长、变态和生殖等生理机能密切相关。近年来在很多昆虫中已证明脂肪体是卵黄蛋白合成的场所,卵黄原蛋白在脂肪体内合成、释放以及为卵母细胞摄取的过程均受激素的调节 (Couble P. et al. 1979, Dutkowaki A. B. et al. 1974)。激素对卵黄蛋白合成的调节主要是通过核酸代谢产生影响 (Chen et al. 1977)。过去我们曾针对七星瓢虫 (*Coccinella septempunctata*) 的人工饲料,生殖滞育及激素调节等问题进行了研究,结果表明发育的雌虫脂肪体合成卵黄原蛋白之前,脂肪体细胞 RNA 合成十分活跃,取食代饲料的雌虫,脂肪体 RNA/DNA 的比值一直较低,直到第 24 天才有所提高。这种雌虫产卵前期时间长,其原因在于脂肪体中核酸代谢的异常。但此雌虫经用保幼激素类似物 ZR-512 处理,3 天后脂肪体的 RNA 平均值明显增加,表明 ZR-512 对七星瓢虫脂肪体 RNA 合成有促进作用。

多种细胞产生的多倍体是因为产生大量的特殊蛋白,昆虫脂肪体细胞尤其是如此 (Brodsky 和 Uryvaeva 1977, Nagl 1978)。是否所有昆虫脂肪体细胞都产生核的多倍化? Swift 和 Rasch (1964), Wetch (1957) 曾对蝗虫、果蝇加以研究。脂肪体 DNA 含量的资料表明果蝇 (*Drosophila*) 幼虫,沙漠蝗 (*Schistocerca gregaria*) 成虫脂肪体细胞产生多倍化,而在红蝽 (*Pyrrhocoris apterus*) 成虫或丽蝇 (*Calliphora*) 幼虫不产生多倍化。这些差异说明脂肪体细胞核的多倍化发生在不同昆虫的不同发育期。我们曾以萤光法测定七星瓢虫成虫期脂肪体细胞核核酸含量变化 (吴秋雁等, 1981), 发现 DNA 含量变化较大,变化幅度为 20 倍。为了查明七星瓢虫雌成虫是否存在多倍化以及多倍化如何变化,我们采用 Feulgen 染色法对不同发育时间的成虫脂肪体细胞核进行细胞光度测定。

甲虫体内脂肪体可分为脏壁层 (visceral layer) 和体壁层 (parietal layer); 两者结构不同 (de Loof 等, 1970)。这种处于不同部位而又有不同结构的脂肪体细胞在卵黄发生过程中多倍体变化是否有差异? 激素对体内不同部位脂肪体细胞核 DNA 合成的影响如

本文于 1981 年 10 月收到。

本文在钦俊德教授指导下完成。

何? 这些均是问题。为了解答这些问题本文作了初步研究, 目的在于了解不同发育时间, 不同部位脂肪体细胞核 DNA 合成的情况以及激素对 DNA 合成的调节。

材料与方 法

5 月从野外采集七星瓢虫的老熟幼虫和蛹, 在实验室内羽化后置于 23—26°C, 相对湿度 60—80%, 基本全日光照条件下以蚜虫饲养。雄虫约羽化 3 天取睾丸制片测精细胞核 DNA 含量。

激素处理是用保幼激素类似物 ZR-512 (乙基-3, 7, 11-三甲基-2, 4-十二碳二烯酯) 于成虫羽化后 4 天点滴雌虫腹部背面, 剂量为每头瓢虫 100 微克/微升。

解剖瓢虫取少量纯净脂肪体组织, 放在小玻璃匀浆管内。加入 2—3 滴生理盐水, 小心轻轻地匀碎, 然后涂在洁净的底玻片上, 同时取一滴制备好的牛精液滴在底玻片上涂平 (样品与牛精液同涂在一底片上同时进行水解、染色等制片过程, 可尽量减少试验误差), 细胞要单层均匀分布。待自然干燥后, 放入 Carnoy's 液中固定 10 分钟, 再置入 1N HCl 液在 60°C 温浴中水解 10 分钟。水解后用蒸馏水漂洗, 再放入 Schiff 试剂内染色 60 分钟。随后用新配制的 0.5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 浸洗 3 次, 将多余的染色剂洗掉再放入蒸馏水中漂洗, 涂片自然干燥后于二甲苯中透明 5 分钟, 然后加上 2 滴光学树脂胶, 用盖玻片封片后贮于干燥器内待测。

所用仪器为 Zeiss 厂生产的 SMP-05 型显微扫描细胞分光光度计。于 545 毫微米测定 Feulgen 染色后的细胞核。选用牛精细胞核作为试验所测细胞 DNA 量的比较标准。首先测定一定数目的牛精细胞核平均 DNA 相对含量, 而以生化方法已测知牛精细胞核的 DNA 绝对量为 3.2×10^{-12} 克 (Wied, 1966)。由此可求出牛精细胞核 DNA 相对含量与绝对含量间的比例关系, 并将其它细胞核的 DNA 相对量换算成绝对量。

结果与讨论

1. 七星瓢虫精细胞核及雄成虫脂肪体细胞核 DNA 含量的测定

雄性成虫成熟生殖细胞只有单组染色体, 它含有定量的 DNA。它通常作为核内 DNA 相对含量的比较标准, 由此可计算出脂肪体细胞核的倍体值。所以为了给脂肪体细胞核 Feulgen 染色后消光系数提供对比的参考值, 首先测定了七星瓢虫精细胞的 DNA 含量。共测精细胞 30 个, 平均 DNA 含量为 0.83 ± 0.15 微微克。

取新羽化的雄虫体内各部位 (包括脏壁层和体壁层) 脂肪体细胞。经 Feulgen 染色后测定了 95 个脂肪体细胞核的 DNA 含量, 发现 6C 细胞核有 9 个; 7C 细胞核有 14 个; 8C 细胞核最多为 20 个; 9C、10C、12C 细胞核分别为 6、10、11 个; 16C 细胞核只有 1 个; 另外还有些异倍体。脂肪体细胞核最高倍体值为 22C, 有 1 个 (“C” 相当于其单倍体组 DNA 的数值, 瓢虫精细胞单倍体 DNA 含量为 0.83 ± 0.15 微微克)。此结果表明脂肪体细胞核有多倍化现象发生。从脂肪体细胞核 DNA 值的测定 (图 1) 可看出内复制水平是从 4C 到 22C。图 1 表明大多数细胞的 DNA 含量集中在 6C 到 12C 这一范围。

2. 不同发育期及不同部位的雌虫脂肪体细胞核 DNA 含量变化及类别

对羽化后 7、8、10、11、13 和 15 天雌虫体壁层及脏壁层脂肪体细胞核 DNA 含量进

行测定,结果见表 1。

表 1 雌虫羽化后不同天数、不同部位脂肪体细胞核 DNA 量

羽化天数	体壁层脂肪体			脏壁层脂肪体		
	平均每核 DNA (微微克)	标准差	测定核数	平均每核 DNA (微微克)	标准差	测定核数
7	8.63	±3.21	37	8.4	±3.76	56
8	8.89	±6.65	55	8.8	±3.70	50
10	9.48	±4.70	56	10.03	±5.86	56
11	12.51	±6.62	52	14.61	±8.62	62
13	5.77	±2.10	52	5.58	±2.45	52
15	6.96	±3.40	50	7.34	±2.75	50

结果说明羽化后不同发育天数的雌虫随着生殖腺的发育,脏壁层与体壁层脂肪体细胞核的 DNA 量都逐渐增加。羽化 11 天时生殖腺完全成熟,有的已产卵,此时 DNA 含量较羽化 7、8、10 天明显增加。产卵后,即羽化 13、15 天时, DNA 含量较羽化 11 天降低,然后卵母细胞内卵黄再次积累准备第二次产卵。羽化 7—8 天时脏壁层与体壁层脂肪体细胞核 DNA 量近似。羽化 11 天卵成熟时脏壁层脂肪体细胞核 DNA 平均值明显高于体壁层脂肪体细胞核 DNA 的平均值(图 2)。表明在卵黄形成时体内不同部位脂肪体细胞核 DNA 的合成与积累不同。

不同发育期的体壁层脂肪体细胞核就其 DNA 量来看可有三大类 (4C、8C 和 16C)

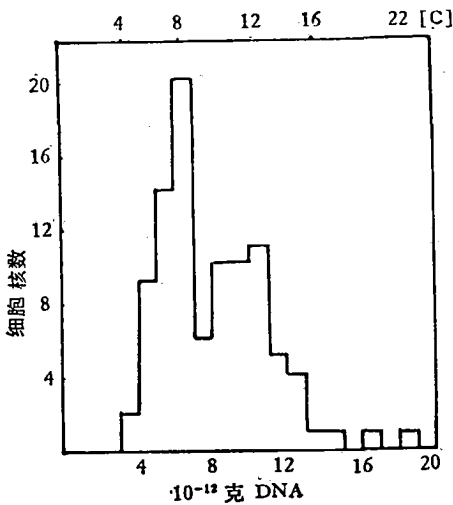
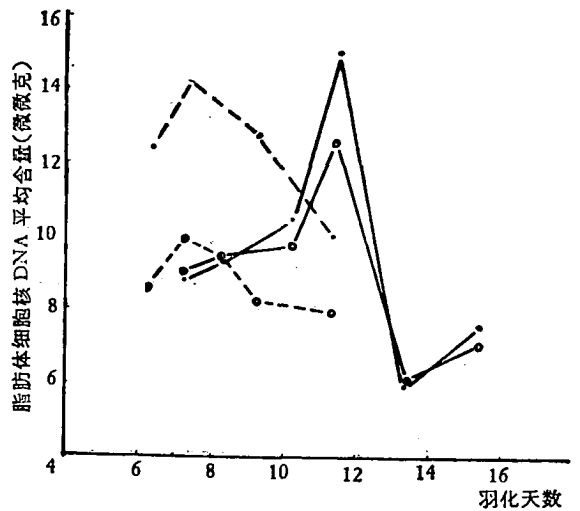


图 1 雄虫脂肪体细胞核 DNA 含量 [C] 为单倍体组 DNA 数值



ZR-512 处理后 3 天

图 2 雌虫发育期间及激素类似物处理后不同部位脂肪体细胞核 DNA 含量的变化

- 不同发育期体壁层脂肪体细胞核 DNA 含量的变化
- 不同发育期脏壁层脂肪体细胞核 DNA 含量的变化
- 用 ZR-512 处理后体壁层脂肪体细胞核 DNA 含量的变化
- 用 ZR-512 处理后脏壁层脂肪体细胞核 DNA 含量的变化

或更多,而且随着时间的增加 DNA 分布趋向于较高倍体。从柱形图 3—8 可看出,羽化 7—8 天的雌虫体壁层脂肪体细胞核主峰在 8C—10C 之间,次峰在 4C,所以主要是 8C—10C,少量为 4C 和其它高倍体。羽化 10 天主峰在 8C,次峰在 16C。11 天主峰在 16C,次峰在 8C、4C。这表明随着成虫的发育,DNA 倍体值增加。羽化 13—15 天时 DNA 多倍化程度下降,并和羽化 7—8 天时相近,主峰为 8C,次峰为 4C。脏壁层脂肪体细胞核 DNA 量也有相似的变化规律:羽化 7 天主峰在 9C—10C,次峰在 4C。羽化 8 天出现 14C。羽化 10 天主峰在 12C,次峰在 6C。羽化 11 天出现 21C。羽化 13—15 天 DNA 倍体值降低。

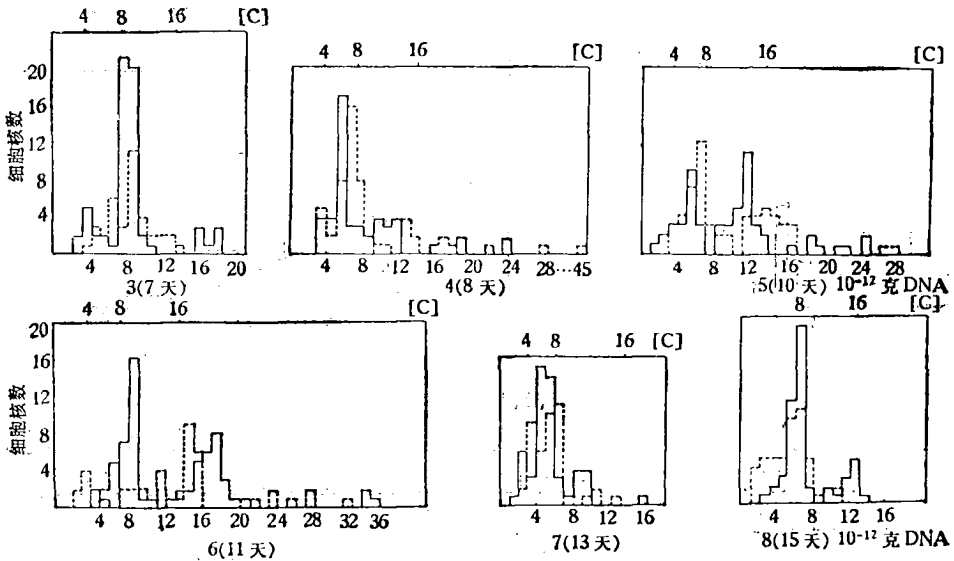


图 3—8 羽化 7、8、10、11、13、15 天雌虫脂肪体细胞核 DNA 含量。

□ 脏壁层脂肪体细胞核; ▨ 体壁层脂肪体细胞核; [C] 单倍体组 DNA 数值。

3. ZR-512 对脂肪体细胞核 DNA 合成的影响

用 ZR-512 处理雌虫后于不同时间取脂肪体测其核 DNA 量从而了解在发育中激素对 DNA 合成的效应,结果见表 2。

表 2 ZR-512 处理雌虫后脂肪体细胞核的 DNA 含量

羽化天数	体壁层脂肪体			脏壁层脂肪体		
	平均每核 DNA (微微克)	标准差	测定核数	平均每核 DNA (微微克)	标准差	测定核数
2	8.35	±3.27	55	11.92	±7.19	59
3	9.55	±4.12	55	13.73	±5.54	50
5	7.91	±3.44	51	12.34	±6.28	50
7	7.63	±2.55	34	9.63	±4.13	50

羽化后 4 天的雌虫用 ZR-512 点滴,然后测定 ZR-512 处理后不同时间及虫体内不同部位脂肪体细胞核 DNA 含量。结果表明激素处理 3 天脏壁层及体壁层脂肪体细胞核 DNA 合成最多,与同天羽化未用 ZR-512 处理的脂肪体细胞核相比 DNA 量高(统

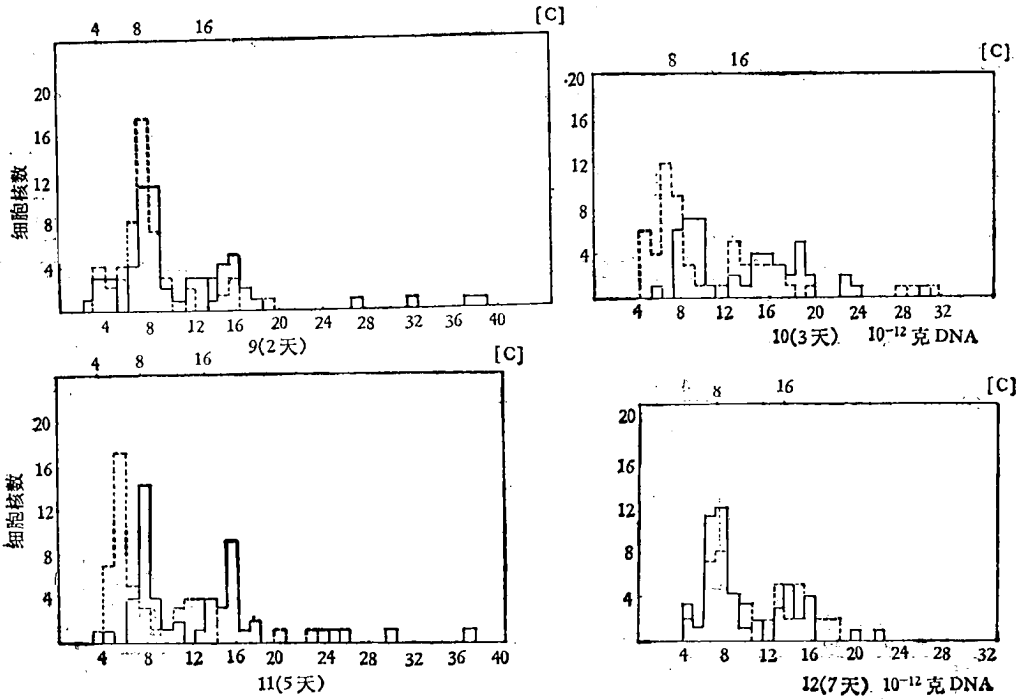


图9—12 点 ZR-512 后, 2、3、5、7 天雌虫脂肪体细胞核 DNA 量

计上差异较显著)(见图 2), 而且 DNA 合成主峰提前出现 (见图 3 和图 10), 说明 ZR-512 对 DNA 合成有促进作用。这一现象脏壁层脂肪体更明显。初步表明不同部位脂肪体细胞对 ZR-512 敏感性不同。

雌虫施加 ZR-512 经 2、3、5 和 7 天后, 可观察到脂肪体细胞核有几类 DNA。从柱形图 9—12 可看出点滴 ZR-512 后 2 天体壁层脂肪体细胞核 DNA 主峰在 8C, 次峰在 4C; 3 天时主峰在 8C, 次峰在 6C、16C; 5 天时主峰在 7C, 次峰在 16C, 7 天时主峰在 8C, 次峰在 16C、18C。与同天羽化但未点滴 ZR-512 的雌虫体壁层脂肪体细胞核 DNA 值相比, 高倍值的细胞核增多。表明 ZR-512 可刺激瓢虫体壁层脂肪体多倍性。脏壁层脂肪体细胞核经 ZR-512 处理后呈现更为复杂的多倍性变化, 柱形图右移, 细胞核 DNA 倍体值高于体壁层脂肪体核。点 ZR-512 3 天后呈现三个峰 10C、18C、23C。而且此时倍体值较高, 说明 ZR-512 处理 3 天后脏壁层脂肪体细胞核对激素反应最强烈, ZR-512 可诱导 DNA 复制, 导致多倍性增多。

我们曾以萤光法检测出七星瓢虫成虫期脂肪体细胞核 DNA 含量变化很大 (吴秋雁等, 1981)。本试验以细胞分光光度法测定, 同样表明瓢虫成虫期的脂肪体细胞核有多倍化现象发生, 但是这些脂肪体细胞核的 DNA 含量所呈现的分布图不都是完整的二倍体, 这可能是由于染色体不完全复制的影响或细胞核经 Feulgen 染色后化学计算的误差所造成, 此问题仍有待研究。不管是那种原因, 脂肪体细胞核 DNA 含量呈现一连续的多倍值。

七星瓢虫成虫体腔内的脂肪体与马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decem. lineata*) 一样是不连续的。脂肪体叶位于不同区域。一些牢固地连在表皮上的脂肪体称为体壁层脂肪体,

另外大部分脂肪体是呈瓣状松弛的网状物,位于气管末端或消化道及生殖腺附近称为脏壁层脂肪体,这两种脂肪体在形态与功能上皆不同(Lauverjat, 1977)。从瓢虫体内不同部位的脂肪体细胞核 DNA 值变化可看出,随着生殖腺的成熟, DNA 含量增加。羽化 11 天脏壁层脂肪体细胞核 DNA 平均值高于体壁层,而且 DNA 分布趋向于较高倍体。这表明脏壁层脂肪体是蛋白质合成很重要的组织。

不同部位脂肪体对激素敏感性不同(Keely, 1978)。脏壁层脂肪体似乎是吸收食物的消化产物并将其转化为贮藏物,或是影响代谢或动员周期代谢的激素最敏感的地方。作为主要是贮藏组织的体壁层脂肪体则比较稳定,并对激素调节反应较小。本试验表明激素处理后不同时间脏壁层脂肪体细胞核平均 DNA 量都比体壁层脂肪体细胞高。经 ZR-512 处理后脏壁层脂肪体细胞核的 DNA 含量较体壁层的呈现更为复杂的倍性变化。ZR-512 处理后 3 天 DNA 呈现 3 个峰,而且倍体值较高。这表明激素处理 3 天后脏壁层脂肪体细胞对激素的反应明显地比体壁层强烈。激素可诱导 DNA 复制,导致 DNA 合成,多倍化增多(Nair 等, 1981)。成虫期保幼激素作为一种促性腺的激素,以调节卵黄沉积。保幼激素的这种促性腺作用是通过刺激脂肪体和卵巢不同的生物合成释放和摄取等过程而达到的(Keeley, 1978)。我们曾用 ZR-512 处理取食代饲料及取食蚜虫的成虫,结果表明 ZR-512 可促使产卵前期缩短,卵巢发育加快。Chen 等(1977, 1979)曾以蜉蝣、飞蝗进行保幼激素作用原理的研究,从细胞学及生物学方面观察,发现保幼激素主要作用于雌虫脂肪体细胞核。卵黄蛋白合成前脂肪体细胞核长大,嗜碱性提高、DNA 含量几乎倍增。用合成的保幼激素类似物处理经过 48 小时延缓期后,卵黄原蛋白的合成在 72 小时达到高峰。这些结果提示了保幼激素作用于脂肪体等组织的细胞核,诱导 DNA 复制,加快蛋白合成系统的建立,如新的 mRNA 的合成等。

参 考 文 献

- 关雪辰,陈娥英 1982 七星瓢虫脂肪体核酸代谢与生殖滞育的关系。昆虫学报 25(3): 239—43。
 吴秋雁,关雪辰 1981 七星瓢虫脂肪体的核酸代谢。昆虫学报 24(2): 127—34。
 Brian Roberts et al. 1972 The DNA content of testes and malpighian tubule nuclei of *Trichloproctia impoliens* (Sarcophagidae: Diptera). *Chromosoma* (Berl) 39: 83—91。
 Brodsky, W. Y; and I. V. Uryvaeva, 1977 Cell polyploidy: Its relation to tissue growth and function. *Int. Rev. Cytol.* 50: 275—32。
 Chen, T. T., P. Couble., K. K. Nair. and G. R. Wyatt, 1977 Juvenile hormone-induced DNA synthesis in the adult locust fat body. *Canad. Fed. Biol. Sci. Proc.* 20: 181。
 Chen, T. T., P. Couble., A. Abu-Hakima. and G. R. Wyatt, 1979 Juvenile hormone-controlled vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body. Hormonal induction in vivo. *Develop. Biol.* 69: 59—72。
 Fox, D. P. 1970 A non-doubling DNA series in somatic tissues of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Chromosoma.* 29: 448—61。
 Keely, L. L. 1978 Endocrine regulation of fat body development and function. *An. Rev. Entomol.* 23: 329—52。
 Lauverjat, S. 1977 L'évolution post-imaginale du tissu adipeux femelle de *Locusta migratoria* et son contrôle endocrine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33: 13—34。
 Loof, A. de et al 1970 Juvenile hormone and the ultrastructure properties of the fat body of the adult colorado beetle, *Leptinotorsa decemlineata* Say. *Z. Zellforsch.* 106: 439—50。
 Nagl, W. 1978 "Endopolyploidy and Polyteny in Differentiation and Evolution." North-Holland, Amsterdam.

- Nair, K. K. et al. 1981 Juvenile hormone-stimulated polyoidy in adult locust fat body. *Development Biology*. 81: 356—60.
- Pelé, S. R. 1964 Labelling of DNA and cell division in so-called nondivision tissues. *J. Cell. Biol.* 22: 21—8.
- Rasch, E. M. et al. 1971 The DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma (Berl)* 33: 1—18.
- Roels, H. 1966 Metabolic DNA. *Inter. Rev. Cytol.* 19: 1—34.
- Swanson, C. P. 1969 *The Cell*. 3rd. ed; p. 53, Englewood Cliffs, N. J. Prentice-Hall, Inc.
- Swift and Rasch 1954 Nucleoproteins in *Drosophila* polytene chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 2: 456—8.
- Welch, R. M. 1957 A developmental analysis of the lethal mutant (2) GL of *Drosophila melanogaster* based on cytophotometric determination of nuclear deoxyribonucleic acid (DNA) content. *Genetics* 42: 544—59.
- Wied 1966 Introduction to Quantitative Cytochemistry. p. 281.

POLYPLOIDY IN THE FAT BODY CELLS OF ADULT *COCCINELLA SEPTEMPUNCTATA* L.

QUAN XUE-CHEN CHEN E-YING

(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

In order to elucidate the DNA synthesis and its hormonal regulation in the nuclei of fat body cells located in different positions at different developmental stages of the adult *Coccinella septempunctata*, we determined the relative DNA contents by means of scanning microspectrometry. Haploid spermatid nuclei were used as reference in the measurements and the classes of polyploidy of the fat body cell nuclei were estimated and sorted. The content of DNA in the fat body cells of both male and female adult beetles at different stages of development portrayed polyploidy changes. In the female beetles it increased with ovarian development. Three days after treatment with ZR-512 the DNA synthesis of the fat body nuclei was seen to exceed that in the control, and the visceral fat bodies showed more complicated polyploid changes. Our results indicate that ZR-512 treatment is capable of enhancing DNA synthesis and increasing polyploidy in the fat body cells.