

白腹叢蚊的精子發生

Spermatogenesis of *Armigeres subalbatus*

葉 國 義

Kwo-yih Yeh

引 言

由於蚊蟲和人類的生活有密切的關係，對於其細胞學之研究在過去已被熱衷的進行着，但大部份的工作只注意到蚊蟲的唾腺染色體 (Kitzmiller 1967) 及染色體組型 (Karyotype) (Breland 1961, Rai 1963c, Kanda 1968, Baker and Aslamkhan 1969, Hsiao et al. 1969, and Mukherjee et al. 1970)。而對於精子發生甚少研究，只限於 *Culex pipiens* L. complex (Stevens 1910, Taylor 1914, Whiting 1917, Moffett 1963, Grell 1946, Callan and Montallenti 1947), *Anopheles stephensi* (Rishikesh 1959), *Culiseta inornata* (Breland et al. 1964) 和 *Aedes aegypti* (Akstein 1962, Mescher and Rai 1966) 四種，與已知現有 2400 種的蚊蟲相比，吾人所做的研究實在太少了，而在這些研究之中大都只着重於減數分裂這一過程而忽略了精原細胞的分裂 (Spermatogonial division)，由於蚊蟲之體細胞具有染色體配對 (Somatic pairing of the chromosomes) 之現象，精原細胞分裂之各期常被誤認為減數分裂的過程之一。

白腹叢蚊 (*Armigeres subalbatus*) 是相當活動的嗜血蚊蟲，其採血對象為人、牛、豬等，其採血時間則不論白天或夜晚，雖然它可為疾病的媒介仍未確知，但無疑的它騷擾了人們的生活，關於其精子發生的過程仍未為人所知，故本研究的目的在了解其精子發生，包括精原細胞的分裂，減數分裂和精子形成 (Spermatogenesis) 的一切過程。

實驗材料和方法

本研究之標本大都採自新竹、桃園一帶之豬舍糞坑中，將其幼蟲帶回實驗室，飼養成蛹，取其雄蛹在生理食鹽水 (Ringer solution A) (Sharma and Sharma 1965) 中，於雙眼解剖顯微鏡下取出精巢，而後分別以下列五種不同的方法處理：

一、精巢的固定和染色依照 Kanda (1964) 的方法，以壓片法 (Squash method) 製成暫時壓片，此暫時壓片封以指甲油以防乾燥，有些壓片則以 Mc Klintock (1929) 之方法製成永久壓片。

二、精巢用 Carnoy's fluid 固定，以 Feulgen technique 染色再製成暫時壓片。

三、精巢用 Allen's PFA fixative (Galigher and Kozloff 1964) 固定，以石臘法做成 5 微米厚度的連續切片，用 Heidenhain's iron hematoxylin 染色。

四、精巢直接在生理食鹽水中製成暫時壓片而後使用相位差顯微鏡觀察。

五、精巢以生理食鹽水製成壓片，再依照 Breland and Gassner (1964) 的方法處理。

以 Leitz 相位差顯微鏡觀察，其上附 Leica 照相機及柯達 Plus-X Pan 黑白底片攝影。

結 果

精巢為一長披針形體，位於第六腹節之側背，長約 560 微米，最寬處約為 300 微米，其前端尖，後端鈍圓，此鈍圓後端連著輸精管 (Vas deferens)，整個精巢包被於淡黃色脂肪層中，觀察其縱切面，可見許多橫或斜的膈 (Septa)，將精巢隔成許多小室 (Testicular cysts)，每一小室含有許多生殖細胞 (Germ cells)，除了在前端的小室以外，同一小室中生殖細胞在發育過程中均為相同或近乎相同的階段，而且由前端的小室到後端的小室在發育過程中是由早期漸漸到成熟期，但偶而也有含較成熟的生殖細胞的小室，夾於較早期的小室間。茲將依次發生的程序分述於后：

一、精原細胞的分裂 (Spermatogonial division)

早期的蛹其精巢前端較易於見到此種分裂，其分裂的過程與其它之體細胞分裂情形相似。在分裂

的前期其同源染色體(Homologous chromosomes)已經緊密的偶合在一起,染色體之各臂(Arms)指向核之一方成極性(Polarization)(圖5—6)。在前期之末(Later prophase)往往可見染色體有清楚的交叉(圖7)現象,染色體變短變粗,移到細胞的赤道部位而達中期。此時本來已十分緊密偶合在一起的同源染色體,除了着絲點(Centromere)附近以外,已相互排斥而分開,每一同源染色體已可見到縱裂。其染色體組型(Karyotype)為二對較長及一對較短的中着絲式染色體(Metacentric Chromosome),在一對較長的同源染色體的一條上面,可見到一個副縊痕(Secondary Constriction)(圖8)。各對姊妹染色體(Sister Chromatids)的着絲點(Centromeres)於後期(Anaphase)開始分別向兩極移動,每一有絲分裂二價體(Mitotic bivalent)可清楚見到四條染色體(Chromatids)(圖9)。每一有絲分裂二價體的姊妹染色體的分開所需時間不同,較短的先分離完成(圖10上),分開時成對的染色體成V形,左右臂等長,成長條狀及互相排斥(圖10下)。此時染色體的外形很容易被誤認為減數分裂的第一後期,分開之新染色體到達兩極後,先被新形成的核膜包圍,再均勻的分散而形成精原細胞的核(圖11和圖12)。觀察此期細胞的切片可見核內有一着色很深的核仁(圖1)。

二、減數分裂 I (Meiotic division I)

在分裂之早期其染色體即已成對,細長的染色體可見粒狀的染色粒(Chromomeres),此即為粗絲期(Pachytene)。染色體再漸漸變短而顯出其極性(圖13和14),觀察切片,此時細胞核之核仁仍然存在(圖2)。至雙絲期(Diplotene)時,同源染色體繼續變短且開始相互排斥,除了在交叉部份以外其同源染色體已經分開。在切片中觀察此期細胞的染色體仍停留在核膜的內側,此時之核仁已消失(圖3)。至終變期(Diakinesis)時,同源染色體相互排斥之力量大增,尤其是在着絲點的部位,如此將交叉慢慢移向末端,此時各二價體(Bivalent)的形狀有“O”形、“f”形和Z形等(圖17),由於每一同源染色體的着絲點因染色體之伸長而向兩極,使交叉更移向末端(圖18),此即為染色體的前中期伸長(prometaphase stretch),此情

形在*Culiseta inornata* (Breland et al. 1964), *Aedes aegypti* (Mescher and Rai 1966)和其他昆蟲(Cooper 1951 and Hughes-Schrader 1950)亦有此現象。在切片中觀察此期細胞,其染色體移向細胞之赤道板而達中期 I (圖4),此時染色體的交叉有的已移到末端,有的則否,有時三個二價體之一已分開完成(圖19-20)。到後期 I 時每一二價體分開所需時間亦不相同,分開後的二體(Dyad)的四臂在着絲點之後方密集成束,三個二體到兩極後密集起來,其外圍以新的核膜而成次級精母細胞(Secondary spermatocyte)的核(圖23-25),其後此核變成液泡狀(Vacuolated)而膨大,染色質成網狀分散於核膜之內緣。

三、減數分裂 II (Meiotic division II)

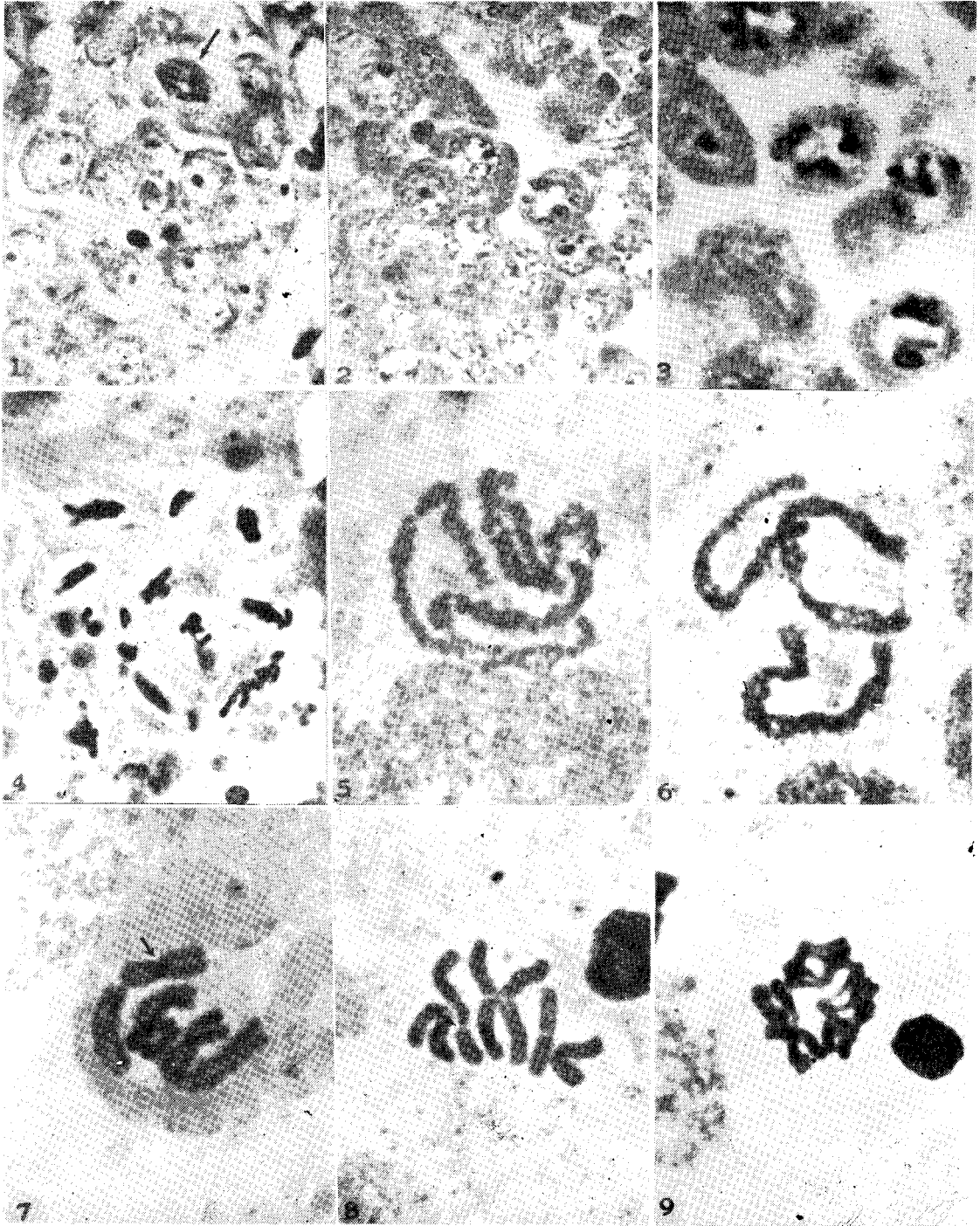
在前期 II 的早期,其細長染色體亦現出極性(圖26),接着染色體很快的縮短(圖27)而失去其極性,再移到赤道板而達中期 II,此時之染色體最為緊縮,每一二體中央具有一個不着色的着絲點(圖28)到後期 II 時各姊妹染色體分開所需時間亦不同(圖29和30)。染色體移到兩極後即密集在一起,其外再圍以新形成的核膜而形成精細胞(Spermatid)的核,此核亦先變成液泡狀,染色體呈不均勻的塊狀附於核膜之內緣(圖31,圖32上和圖35)。

四、精子形成

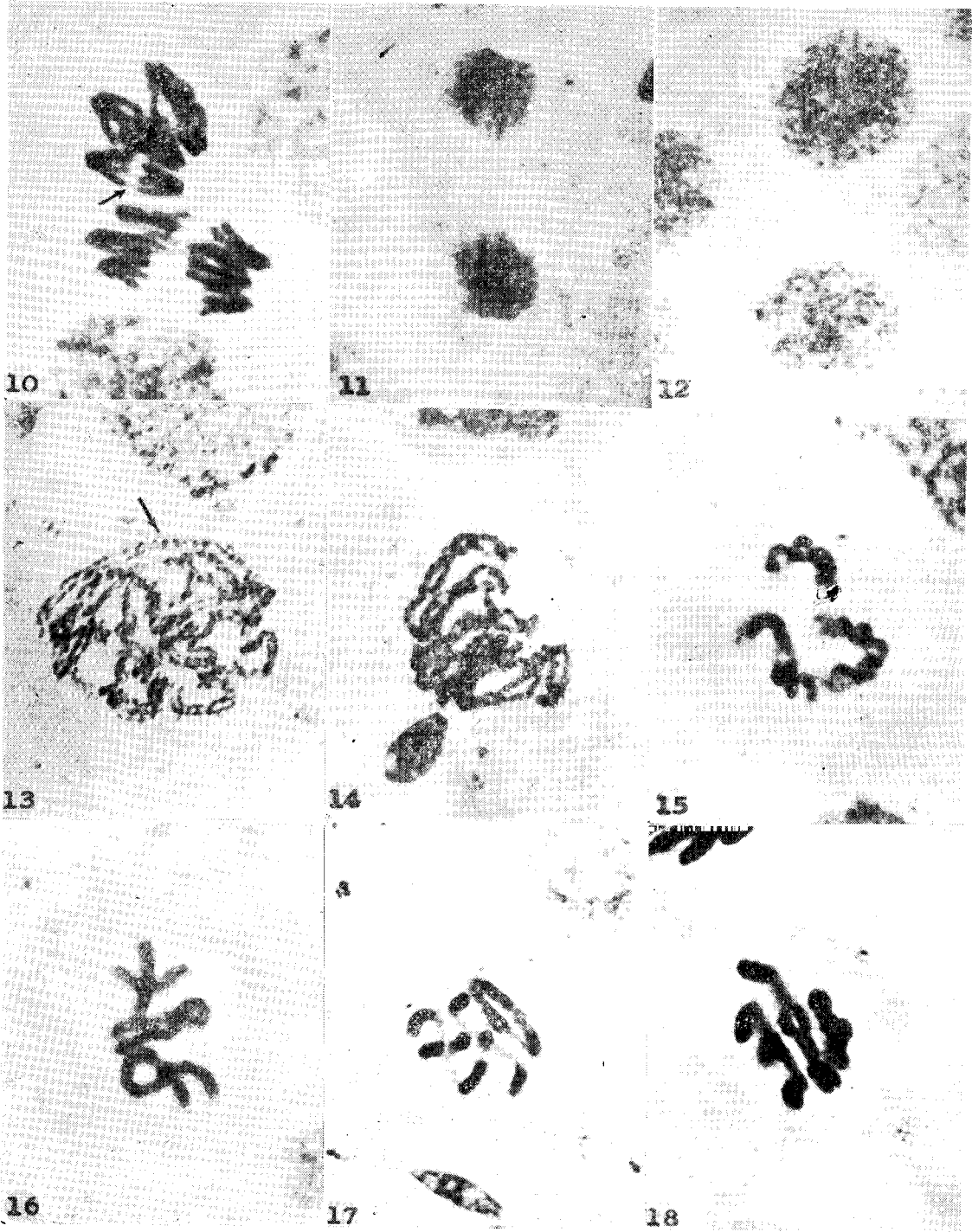
(Spermiogenesis or spermateleosis)

精細胞的圓形液泡狀核漸漸變長,成橄欖形(圖32下),再成披針形,此時核已具有尖的前端,其後端鈍而具凹窩,此凹窩為中心粒及中心粒附體(Centriole adjunct)之所在。由於染色質在核內的分佈不均使核染成帶狀或點狀斑紋(圖33、圖36和圖37),此核再脫水變細變長而成針狀的成熟精子的頭部(圖34—圖40)。在有些情形下,伸長的核由於受細胞膜的限制而彎曲或折成數折,此種情形在*Orthopodomyia alba*和其他昆蟲亦有之(Breland et al. 1968)。

粒線體於減數分裂末期 II 之末已開始聚集,到精細胞形成時,它們已在核之旁邊集成一緻密的粒線體團(Nebarkern)(圖35),此粒線體團繼續增大及向核之後端沿着尾的軸絲(Axial filament)



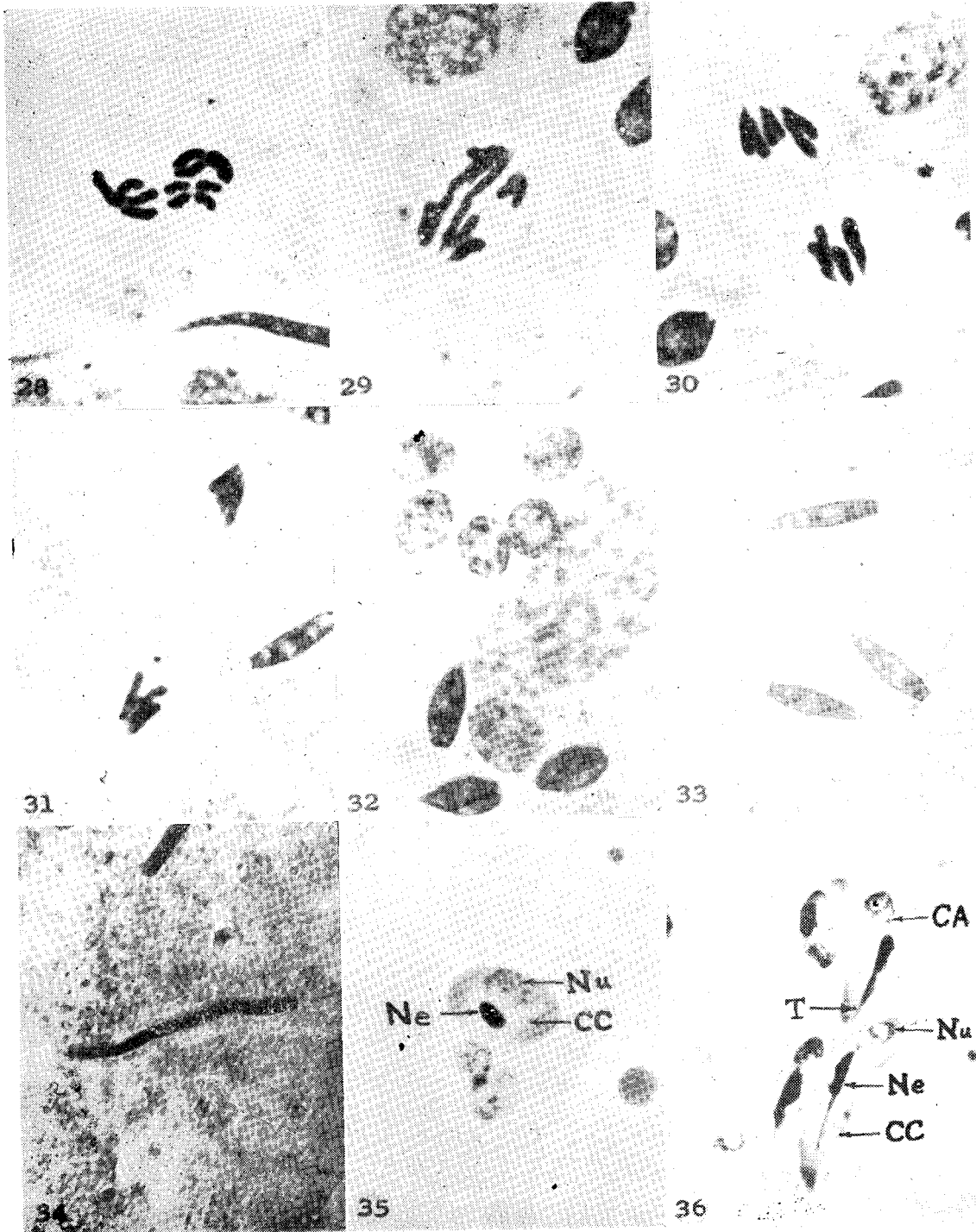
圖版一、圖1—4照自切片。1. 精巢尖端的小室，每一精原細胞均有一着色很深的核仁，指針處為有絲分裂後期（1010倍）。2. 粗絲期（1010倍）。3. 雙絲期：染色體位於核膜內緣（1590倍）。4. 減數分裂中期 I（1010倍）。圖5—9照自 Aceto--lacto-orcein 壓片（1590倍）。5—7 有絲分裂前期：同源染色體配對着，一指針指着交叉。8. 有絲分裂中期：指針指着副縲痕。9. 有絲分裂後期：姊妹染色體自着絲點開始分開。



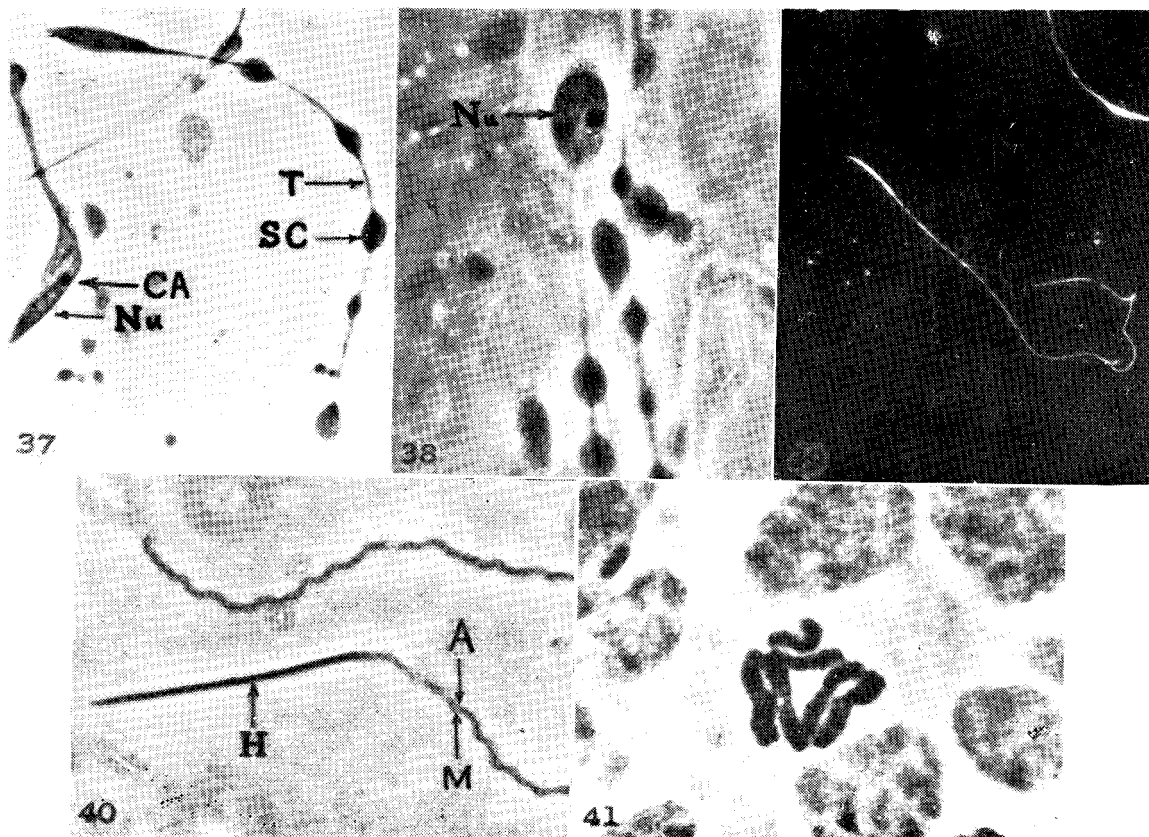
圖版二、圖照自 Aceto-lacto-orcein 壓片 (1590倍)。10. 有絲分裂後期各染色分體的臂成“V”形，指針處為較小的染色體先分離完成。11. 有絲分裂末期。12. 精原細胞的核。13. 粗絲期：指針指着一個染色粒。14. 粗絲期：各染色體臂指向一端。15—16. 雙絲期。17. 終變期：交叉尚未移向末端。18. 前中期染色體伸長。



圖版三、圖照自 Aceto-lacto-orcein 壓片 (1590 倍)。19. 中期 I : 交叉全已移到末端, 一最長的二價體最先分開 (指針)。20. 中期 I : 交叉未移到末端。21. 後期 I : 一二價體已完全分離。22—23. 後期 I : 染色體臂短而粗 (與圖 10 比較)。24. 末期 I。25. 次級精母細胞的核, 成液泡狀。26—27. 前期 II : 染色體臂現出極性。



圖版四、圖 28—34. 照自 Aceto-lacto-orcein 壓片 (1590倍)。28. 中期 II。29—30 後期 II：染色分體的分開需時不同。31. 末期 II。32—34. 精細胞的核由圓形變成針狀的精子頭部。圖 35—36. 照自生理食鹽水壓片 (1010倍)。35. 精細胞。36. 精細胞在改變之中，其核與圖 32 下方之核相同。(Ne：粒線體團。Nu：核。CC：細胞質。CA：中心粒和中心粒附體。T：精子之尾。)



圖版五、圖37—39。照自生理食鹽水壓片。37.精細胞核成披針形，與圖33.相同（1010倍）。38.精細胞的核在細胞內變曲着（1410倍）。39.成熟的精子：取自成蟲的輸精管，以暗視野照相（260.倍）。40.成熟的精子經 Aceto-orcein處理（1410倍）。41.雌蛹卵巢內細胞的染色體組型（1590倍）（照自Aceto-lacto-orcein 壓片）（Sc：將被遺棄的細胞質，H：精子之頭部。A：軸絲。M：粒線體絲。）

伸長而參與精子尾部之構造(圖36)。

尾部發生之早期,可見核之一端具一緻密小點,軸絲即由此小點伸出,此小點隨核的變長而漸漸增大,此為中心粒及中心粒附體之構造(圖37和圖38),往往精細胞隨着尾部之伸長而伸長,但有時尾之伸長太快而纏繞於細胞質內。殘存的細胞質往往成圓形附着在精子的尾部而後與尾部分離(圖37)。

成熟的精子長約370微米(圖39)。頭部前端未發現穿孔器(Acrosome),頭尾部界限不清,經Aceto-orcein處理後,知其頭長31微米,尾部由一小的軸絲及二較大的粒線體絲所構成(圖40)。

討 論

染色體在體細胞的配對(Somatic pairing)為雙翅目昆蟲之普遍現象,此種同源染色體的配對情形為巨型染色體的基礎。作者指出白腹叢蚊無論在有絲分裂或減數分裂,其染色體能用光學顯微鏡看清時,即已成對。又由於染色體始終配對的情形,使減數分裂之前期I無細絲期及偶絲期,此說法為近代昆蟲學家們(Akstein, Grell, Rishikesh, Rai & Breland)所同意。

蚊蟲的性別決定為一急需了解的問題,白腹叢蚊與其它蚊蟲一樣(瘧蚊除外),無可資識別的性染色體。白腹叢蚊之染色體最近已被Kanda(1968)和Baker and Aslamkhan(1969)所討論,但作者首次發現一個副縮痕(Secondary Constriction)在一條同源染色體上(圖8),此情形暗示經減數分裂後,將產生二種精子,即具有和不具有此副縮痕的染色體,此對染色體可能與性別之決定有關,因研究雌蛹卵巢細胞的染色體組型並未發現此副縮痕(圖41),關於此對染色體與性別有關之其他證據仍在找尋之中。

蚊蟲在細胞分裂前期具有極性:在*Aedes aegypti*(Breland and Gassner 1961),*Eretmapodites chrysogaster*和*Aedes mascarensis*(Rai 1966)三種蚊蟲的有絲分裂前期曾經發現,但在減數分裂前期II具極性者只有*Culiseta inornata*(Breland et al. 1964)和*Aedes aegypti*(Mescher and Rai 1964)二種。此研究揭示白腹叢蚊不論在有絲分裂的前期,減數分裂之前期I或前期II,其

染色體之臂均有極性現象,此現象可解釋為在二次細胞分裂之末期到此次細胞分裂之前期其首絲點及染色體的位置仍保持原位。

有絲分裂後期各染色體分開所需時間不同,因此染色體分離不同步完成,一般較短的染色體要比長者分開得早,此現象可解釋為染色體於無交叉情形下,染色體越長分離所需的時間也就越長(圖10)。但在減數分裂後期I則不然,其同源染色體分離所需的時間因二價體(Bivalent)所發生的交叉情形不同而有異;形成“O”形的二價體比“T”形或“Z”形者分離所需的時間較少,而此形成“O”形的可為三個二價體中的任何一個(圖17, 18, 19)。此情形與*Culiseta inornata*(Breland et al. 1964)和*Aedes aegypti*(Mescher and Rai 1966)都以最小的二價體先分開完成及*Anopheles stephensi*(Rishikesh 1959)以最小的最後分離而有所不同。由染色體組型知三對染色體之着絲點幾近染色體之中央,因此染色體之兩臂所形成交叉在或然率上應該相似,當各同源染色體的着絲點相互排成分離時,所形成的二價體之形狀應為“O”形較多,但事實上,此“O”形二價體的數量大大的少於“T”形的。由此知染色體的兩臂之分離亦不同步,暗示了某一臂必較早或較晚分離,此種現象可能受遺傳因子的影響。為何此種遺傳因子在“O”形二價體中消失其作用?此有待更進一步研究。染色體之行為在此時因受遺傳因子,交叉的數和位置,染色體的黏性和各種未知的力的影響,而不易解釋。

在減數分裂之後期II,三對二體之分開所需時間亦不同(圖29-30)。此亦大出Mescher and Rai(1966)之所料,此種分離的情形與*Anopheles stephensi*相似,但兩者本質不同。在*Anopheles stephensi*的後期II為性染色體行減數分裂(Reductional division),而白腹叢蚊的後期II為等數分裂(Equational division)。

仔細觀察精原細胞的分裂前期,其緊密配對的同源染色體間具有交叉(圖5-7),此與減數分裂的情形相似,但此種交叉是否可導致互換(Crossing over),目前未有證據加以確定,但果蠅在精原細胞的分裂,其交叉導致互換已有報告(Stern 1936, Cooper 1949)。由蚊蟲的體染色體配對與果蠅的情形相同看來,在蚊蟲應當也可產生互換。

染色體在體細胞的配對及壓片法弄混了各細胞原來在精巢的位置，使有絲分裂和減數分裂的某些時期無法分辨(Breland et al. 1964)，但在本研究中可清楚的分開此二分裂的各期，比較有絲分裂前期和減數分裂前期 I (圖5, 6, 7和圖13, 14), 前者成對的染色體股大而模糊，後者有清楚的染色體股及股上的染色粒(Chromomeres)，在有絲分裂之後期，姊妹染色體股並不像減數分裂 I 的同源染色體股，前者其染色體之四臂比後者細長而不相密集(圖10和22)。

在精子生成過程中，中心粒及中心粒附體之構造，軸絲之如何從中心粒伸出及其超顯微構造有待進一步研究。

摘 要

以白腹叢蚊蛹期的精巢用簡單的壓片法，補充以連續切片及在相位差顯微鏡下研究其精子發生的過程。在此研究所得關於蚊蟲的新資料有下列幾點：

1. 發現一個副縊痕在一較長的染色體上，並推測此具有副縊痕的較長的一對同源染色體與此蚊的性別決定有關。

2. 在減數分裂後期 I，各染色體分開的快慢不同在分開的次序上亦不一定。

3. 各種分裂的後期，各染色體分開所需時間均不相同。

4. 揭示此種蚊蟲在精子生成時，顯微鏡可見的各種細胞器的詳細變化情形。

5. 可清楚的區別有絲分裂與減數分裂的每一過程。

誌 謝

本研究承蕭之的教授的熱心指導，業師繆端生教授和李亮恭教授的改正手稿，諸亞儂主任的鼓勵與協助，陳賢仁先生的幫忙整理稿件，陳寶樹先生的概借資料，作者在此一一表示由衷的感激與謝意。

Spermatogenesis of *Armigeres subalbatus*

Kwo-yih Yeh

SUMMARY

1. Some details of spermatogenesis in *Armigeres subalbatus* were revealed from simple squashes of pupal testes, supplemented by observations on serial sections of the material.
2. The spermatogonial metaphase configuration consists of three pairs of metacentric chromosomes. A secondary constriction can be seen in only one of the homologous chromosomes which may have an effect on sex determination.
3. *Armigeres subalbatus* has no visible leptotene and zygotene stage at meiotic division because of somatic pairing of the chromosomes.
4. During mitotic prophase, meiotic pachytene, and meiotic prophase II, the arms of chromosomes are polarized.
5. During mitotic anaphase, meiotic anaphase I. and meiotic anaphase II, the separation of

the chromosomes is asynchronous.

6. In this study, the stages of meiosis and mitosis are readily distinguishable despite the somatic pairing of chromosomes.

7. Spermateleosis of this species was studied, using phase contrast microscopy. The change in microscopic structure from spermatids to spermatozoa was discussed.

參 考 文 獻

1. Akstein, E. 1962. The chromosomes of *Aedes aegypti*, and of some other species of mosquitoes. Bull. Res. Council. Israel II:147-55.
2. Berker, R. H., and M. Aslamkhan. 1969. Karyotypes of some Asian mosquitoes of the subfamily culicinae. (Diptera: Culicidae) J. Med. Ent. Vol. 6, No. 1:44-52.
3. Breland, O. P. 1961. Studies on the chromosomes of mosquitoes. Ann. Ent. Soc. Amer., 54, 360.
4. —, C. D. Eddleman, and J. J. Bieseke. 1968.

- Studies of insect spermatozoa. I. Entomol. News Vol. 79, No. 8.
5. —, and G. Gassner III. 1961. Note on the chromosome complement of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.), Texas J. Sci. 13:391-7.
 6. —, — 1964. Preliminary observations on the structure of the sperm tail in mosquitoes. Texas J. Sci. 16:254-56.
 7. —, —, and J. G. Tiemann. 1964. Studies of meiosis in the male of the mosquito *Culiseta inornata*. Ann. Entomol. Soc. Amer. 57:472-79.
 8. —, —, R. W. Riess, and J. J. Biesile. 1966. Certain aspects of the centriole adjunct, spermiogenesis, and the mature sperm of insects. Canadian J. Gen. and Cytol. 8:759-73.
 9. Callan, H. G., Montallenti. 1947. Chiasma interference in mosquitoes. J. Genetics 48:119-34.
 10. Cooper, K. W. 1949. The cytogenetics of meiosis in *Drosophila*. J. Morphol. 84:81-122.
 11. — 1951. Compound sex chromosomes with anaphasic precosity the male mecopteran, *Boreus brumalis* Fitch. J. Morphol. 89:37-58.
 12. Galigher, A. E., and E. N. Kozloff. 1964. Essentials of practical microtechnique. Les and Gebiger Co. Philadelphia. pp. 108.
 13. Grell, S. M. 1946. Cytological studies in *Culex* II. Diploid and meiotic division. Genetics. 31:77-91.
 14. Hsiao, S. C., K. Y. Yeh, P. S. Chen, and H. T. Ho. 1969. Karyotypes of Taiwan mosquitoes. Unpublished.
 15. Hughes-Schrader, S. 1950. The chromosomes of mantids (Orthoptera, Mantodeidae) in relation to taxonomy, Chromosoma 4:1-55.
 16. Kanda, T. 1964. Preparation of chromosomes of *Culex pipiens* complex. Jap. Jour. Sanit. Zool. 15(4): 227-32.
 17. — 1968. Studies on karyotypes of some Japanese mosquitoes. Jap. Jour. Exp. Med. Vol. 38, 1. pp. 37-46.
 18. Kitzmiller, J. B. 1967. Mosquito cytogenetics. Genetics of insect vectors of disease. Elsevier, Amsterdam J. W. Wright and R. Pal eds. pp. 133-50.
 19. Lien, J. C. 1962. Non-anopheline mosquitoes of Taiwan: Annotated catalog and Bibliography. Pacific Insects, Vol. 4, 3. pp. 615-49.
 20. Mc Clintock, B. 1929. A method for making aceto-carmine smears permanent. Stain Technol., 4, 53-56.
 21. Mescher, S. R. A. L. and K. S. Raii 1966. Spermatogenesis of *Aedes aegypti*. Mosq. News. Vol. 26, No. 1: 45-51
 22. Moffett, A. A. 1936. The origin and behavior of chiasmata XIII, diploid and tetraploid *Culex pipiens*. Cytologia 7: 184-97.
 23. Mukherjee, A. B., D. M. Rees, and A. B. Mukherjee. 1970. A comparative study of the mosquito karyotypes. Cytologia, Vol. 35. No. 1. pp. 57-62.
 24. Rai, K. S. 1963c. A comparative study of mosquito karyotypes. Ann. Ent. Soc. Amer., 56, 160.
 25. — 1966. Further observations on the somatic chromosome cytology of some mosquitoes (Deptera: Culicidae). Ann. Entomol. Soc. Am. Vol. 59 No. 2. pp. 242-246.
 26. Rishikesh, N. 1959. Chromosome behavior during spermatogenesis of *Anopheles stephensi sensu stricto*. Cytologia 24: 447-58.
 27. Sharma, A. K., and A. Sharma. 1965. Chromosome techniques. 1st. ed. Butterworth and Co. Ltd. London and Tonbridge. pp. 188.
 28. Stern, C. 1936. Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 21, 925-736.
 29. Stevens, N. M. 1910. The chromosomes in the germ-cells of *Culex*. J. Exp. Zool. 8:207-25.
 30. Taylor, M. 1914. The chromosome complex of *Culex pipiens*. Quart. J. Microscop. Sci. 60: 377-98.
 31. Whiting, P. W. 1917. The chromosome of the common house mosquito, *Culex pipiens* L., J. Morphol. 28: 523-78.