

담배나방(*Helicoverpa assulta*: 인시목 밤나방과)의 정자형성 과정과 염색체수

유종명¹, 정성은, 박희윤, 채순용¹, 김상석¹
한남대학교 이과대학 생물학과, 한국인삼연초연구원¹
(1996년 2월 8일 접수)

Spermatogenesis and Chromosome Number of the Tobacco Budworm *Helicoverpa assulta* Guenee (Lepidoptera: Noctuidae)

C.M. Yoo¹, S.E. Jeong, H.Y. Park, S.Y. Chae¹, and S.S. Kim¹
Dept. of biology, Han Nam University, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute¹
(Received Feb. 8, 1996)

ABSTRACT : The spermatogenesis and chromosome number were investigated in the pupal testes of *Helicoverpa assulta* Guenee by light microscopy. During the spermatogenesis, each bundle of 2^8 (256) sperms developed by 6 mitotic and 2 meiotic spermatogonial divisions. From the early stage of spermatogenesis, it was distinguishable between two kinds of sperm differentiation, eupyrene and apyrene spermatogenesis, which are characteristic in Lepidoptera, by the differences in nuclear shape and cell distribution in immature spermatocyst. Through the followed spermiogenesis, the spermatocysts were developed into two kinds of mature cyst, a streamline-shaped eupyrene cyst with nucleated sperms of thready head or a long spindle-shaped apyrene cyst with anucleated sperms of cylindrical head. As the results of chromosomal analysis at metaphase of the spermatogonial mitosis and spermatocytic meiosis, the chromosome number were $2n=62/n=31$, respectively, and no variation between individuals.

Key words : *Helicoverpa assulta* spermatogenesis, eupyrene cyst, apyrene cyst, chromosome.

* 연락처자 : 300-791, 대전광역시 대덕구 오정동 133번지, 한남대학교 이과대학 생물학과

* Corresponding Author : Dept. of biology, Han Nam University, 133 Ojung-Dong, Taejon 300-791, Korea

인시류(Lepidoptera) 곤충의 경우 어린 시기에 두 개의 정소가 각각 독자적으로 발생하다가 어느 시점에서 하나로 융합되어 정자형성과정인 진행되며(Chase and Gilliland, 1972; Reinecke *et al.*, 1983), 정자형성과정을 통해 정소에서는 각각의 생식세포가 6번의 체세포분열과 2번의 감수분열을 거쳐 256개의 정자가 한 단위로 들어 있게 되는 많은 cyst들이 형성된다(Lai-Fook, 1982 a; Moon *et al.*, 1988).

한편 인시류의 일부 종에서는 정소 내에서 서로 다른 두 가지의 정자형성과정인 진행되어 핵을 보유한 eupyrene sperm과 핵을 보유치 않는 apyrene sperm이 동시에 생산된다(Leopold, 1976; Lai-Fook, 1982 b). 이러한 eupyrene sperm은 장차 수정과정에서 직접 수정을 일으키는데 비해, apyrene sperm은 수정에 직접 관여하지 않는 정자로서(Lai-Fook, 1982 a) 그 생리적 기능은 아직 명확히 밝혀져 있지 않아 관심의 대상이 되어 있으며, 이들 정자의 형성과정에서의 차이 또한 구분이 명확해지는 중간단계 만이 주로 보고되어 있을 뿐 초기와 후기의 분화과정에 대한 연구는 미비한 실정이다(Numata and Hidaka, 1984; Osnai *et al.*, 1989; Bodnaryk, 1989).

곤충의 염색체에 관한 연구는 주로 정소를 대상으로 수행되어 오고 있는데(Crozif, 1969; Kerr, 1972; Emmel, 1987), 지금까지의 연구에서 염색체수의 종내 변이, fragment chromosome (Maeki, 1981; Kim *et al.*, 1987), supernumerary chromosome (Hewitt and John, 1968; Nur, 1969), B-chromosome (Lewis and Scudder, 1957; Imai, 1974; John and Charidge, 1974) 등이 나타남에 따라 곤충 종간 또는 종내의 염색체 변이가 매우 큰 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 담배나방에서 일어나는 두 가지 정자 분화과정을 추적하여 상세한 차이를 규명하고, 정원세포의 체세포분열과 정모세포의 감수분열 동안 나타나는 염색체를 관찰하여 핵형을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

담배나방(*Helicoverpa assulta* Guenee)을 인공사료를 먹이로 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$, 그리고 16L:8D의 광주기로 누대사육하면서 용화 1일 후에 정소를 적출하여 실험재료로 사용하였다.

정자형성과정을 조사하기 위해서는 조직학적 방법인 paraffin section method에 의해 정소를 $7\mu\text{m}$ 두께로 연속절편을 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다.

염색체 표본은 Rothfels와 Siminovitsh(1958)의 air drying방법을 일부 변형한 방법으로 제작 하였다. 즉, 용의 복부에 0.05% colchicine을 주입한 다음 3시간 후에 살아있는 정소를 적출하여 잘게 자른 다음 동장액이 들어있는 원심분리관에 세포를 회수하였다. 이 부유액을 800rpm에서 5분동안 원심분리 한 후 저장액을 가하여 37°C 항온기 내에서 15분동안 저장액처리를 하였다. 800rpm 으로 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거한 다음, 세포층에 고정액(absolute methanol : acetic acid = 3 : 1, V/V)을 가하여 4°C 에서 30분간 고정 시켰다. 피펫으로 세포를 다시 부유시킨 다음 600rpm 으로 5분 동안 원심분리하여 고정액을 제거하였다. 위와같은 방법을 새로운 고정액으로 2-3회 반복하여 순수한 세포를 회수한 다음, 세포의 양에 따라 소량의 고정액으로 농축된 세포 부유액을 만들었다. 이 부유액을 피펫으로 취하여 미리 세척해놓은 slide glass 위에 2-3방울 떨어뜨려 균일하게 퍼지게 한 다음 실온에서 공기건조 시켰다. 염색체가 부착되어있는 slide를 5% giemsa 염색액(Gurr R66)으로 15분간 염색한 다음 광학현미경으로 염색체를 분석하였다.

결과 및 고찰

정자형성 과정 : 곤충 인시류의 정자형성 과정은 1960년대에 들어서면서 연구가 시작되어 1970년대 이후에 활발히 진행되었다. 초기의 연구는 주로 정소의 형태나 조직을 중심으로 이루어졌으며, 이

를 통해 밤나방과에서 두 개로 존재하던 정소가 발생과정 중에 하나로 융합됨이 밝혀졌다(Chase and Gilliland, 1972; Reinecke *et al.*, 1983). 본 담배나방에서도 역시 정소는 유충시기 동안에 두 개로 존재하다가 전유기에서 하나로 융합되어 용기 이후에는 계속 단일 구조로만 관찰되었다(Fig. 1 A, B). 용화 1일후 정소의 절단면(Fig. 2 A, B) 상에서 정소는 9개의 interfollicular septa에 의해 10개의 분엽으로 나뉘어져 있으며 이들 분엽내에서 다양한 시기를 나타내는 정자형성을 관찰할 수 있는데, 각 분엽의 주변부에는 정자형성의 초기 상태가, 그리고 중앙부위로 오면서 점차 성숙되어 가는 상태가 관찰되며 중앙부위에는 정자형성이 완료되어 성숙된 정자들이 cyst 내에 다발을 이루어 존재한다. 이러한 성숙된 spermatocyst 내에 들어있는 정자들의 수는 10개의 cyst들을 대상으로 세어본 결과 평균 256.3개로 나타나 $2^8=256$ 의 근사치인 것으로 확인되었다(Fig. 3 A, B). 이는 하나의 정원세포가 8회 분열하여 성숙정자로 형성된다는 다른 인시류 곤충에서의 보고와 일치하는 결과이다(Lai-Fook, 1982 a; Moon *et al.*, 1988).

성숙한 담배나방 정소의 spermatocyst에 들어 있는 정자는 그 핵의 상태에 따라 명확히 두 가지로 구분되었으며, 이들 두 가지 정자의 운명은 시원생식세포에서 부터 결정될 것이나 본 연구에서는 정자형성 초기에서 부터 구분되었다. 앞선 연구들에서도 인시류의 정자는 서로 다른 두 가지 발생과정을 거쳐 수정능력이 있는 eupyrene sperm과 수정능력이 없는 apyrene sperm으로 분화됨이 보고되었으나(Leopold, 1976; Numata and Hidaka, 1980; Lai-Fook, 1982 a,b), 이들 연구 보고 들에서는 일련의 정자형성 과정 동안 나타나는 두 생식세포의 분화과정에 대한 자세한 언급이 이루어지지 않았고, 성숙된 eupyrene과 apyrene sperm의 형태구분이 불분명하였다. 본 연구에서도 인시류의 일종인 담배나방에서 이러한 두 종류의 정자가 존재함이 밝혀져 앞선 연구들과 일치하였으며(Leopold, 1976; Lai-Fook, 1982 b), 또한 초기 분화과정에서의 차이가 명확히 구분되었다. 즉, 초기에

한 종류의 cyst에 있는 세포는 핵이 구형으로 크며 핵질이 넓게 분산되어 있고 분열중인 세포에서는 일부 염색체가 관찰된다. 세포분열은 cyst의 주변부에서 이루어지기 때문에 cyst의 횡단면은 중앙이 비어있는 염주모양으로 관찰되며 이 cyst에는 eupyrene spermatocyte들이 존재하는 것으로 확인되었다(Fig. 4 A). 다른 한 종류의 cyst에 있는 세포핵은 모양이 불규칙하고 작으며 세포가 서로 밀착되어 있어 cyst는 덩어리 형태로써 관찰되며 apyrene spermatocyte들이 들어있는 것으로 확인되었다(Fig. 4 B). 이후 이들의 감수분열이 완료되어 spermatid로 되면 eupyrene spermatid의 핵은 오히려 용축되어 작은 구형의 핵질을 보유하나(Fig. 5 A, 6 A), apyrene spermatid는 핵이 커지고 한층 더 불규칙해지며 핵질에는 많은 소핵(micronuclei)이 나타난다(Fig. 5 B, 6 B). 신장된 초기 cyst에서 eupyrene sperm의 핵은 cyst의 한 쪽 방향에 축적되어 편중 분포하고(Fig. 7 A), apyrene sperm의 핵은 cyst의 전면에 분산되어 있다(Fig. 7 B). 핵이 신장하면서 sperm의 꼬리도 길어지며 eupyrene sperm은 핵을 가진 사상형의 head로, 그리고 apyrene sperm은 핵이 거의 소실된 원통형의 head로 발달되어 간다. 후기 eupyrene cyst는 유선형의 형태를 보이며, sperm 핵들은 더욱 길고 가늘어져 cyst의 전단부에 정렬되어 있는 것을 볼 수 있다(Fig. 8 A). 그러나 apyrene cyst는 sperm의 핵이 cyst의 전 면으로 더욱 분산되어 micronuclei 상태로 약간 나타날 뿐이며 이 시기에 거의 소실되고 방추형의 길쭉한 cyst를 형성한다(Fig. 8 B). 위와 같은 일련의 과정을 거치면서 eupyrene sperm의 경우 핵을 보유한(nucleated) 사상형의 sperm으로 되고, apyrene sperm은 핵이 없는(anucleated) 원통형의 head를 가지며 head의 전후 dense cap 사이에 핵이 있었던 흔적만 남아 있음을 확인하였다(Fig. 9 A, B).

염색체 수 : 정자형성 과정중 생식세포는 체세포 분열과 감수분열을 모두 거치게 되므로 주로 정소가 곤충 염색체의 연구 대상이 되었다. 연구방법은 대부분 정소를 고정하고 염색한 후 squash하는

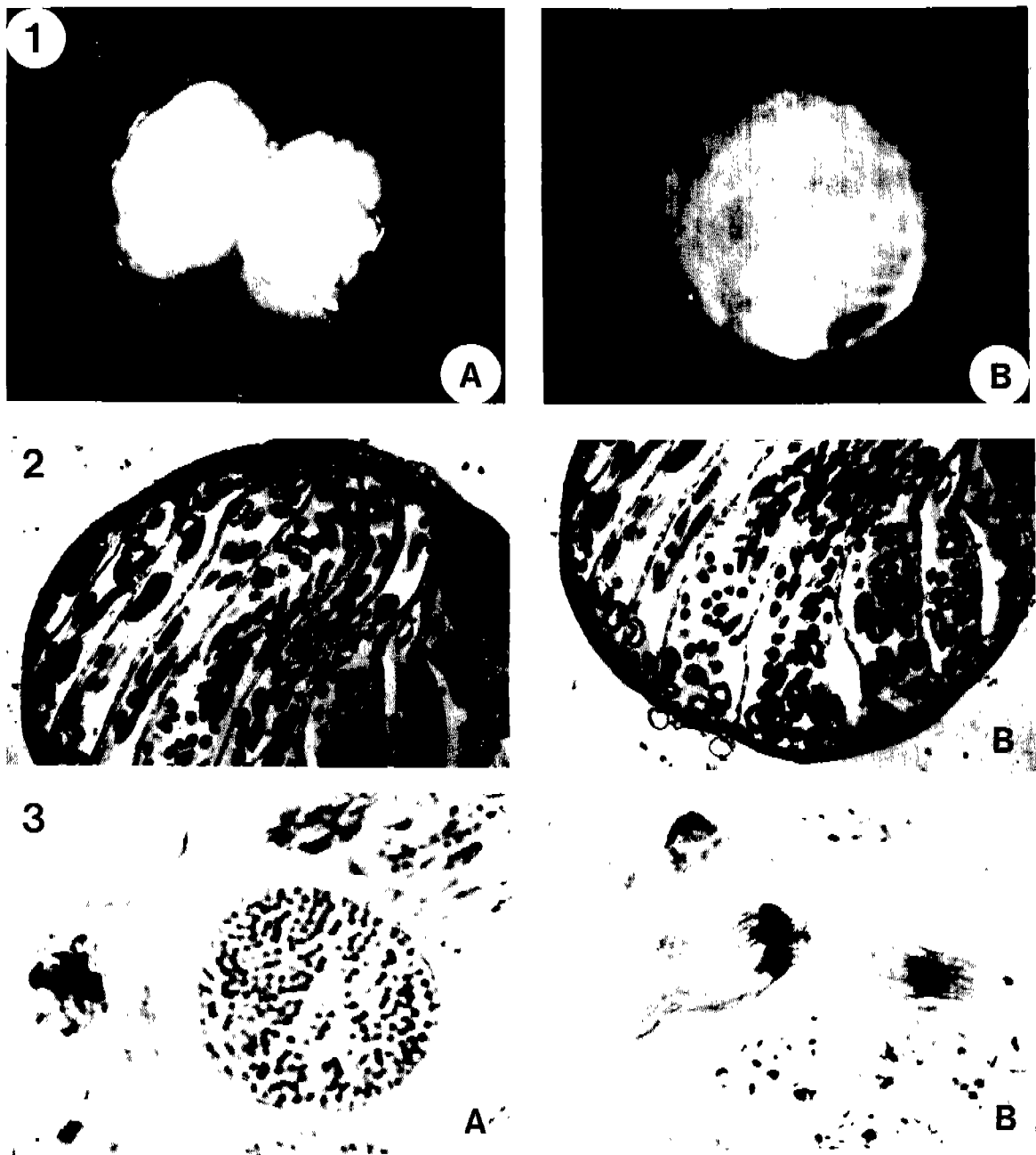


Fig. 1. Testes of the last instar larva(A) and prepupa(B). x50

Fig. 2. Longitudinal section of a testis of 1-day old pupa(A, B). x100

Fig. 3. A cross section(A) and a longitudinal section(B) a bundle of 256 sperms in the elongated spermatocyst of pupal testis. x700

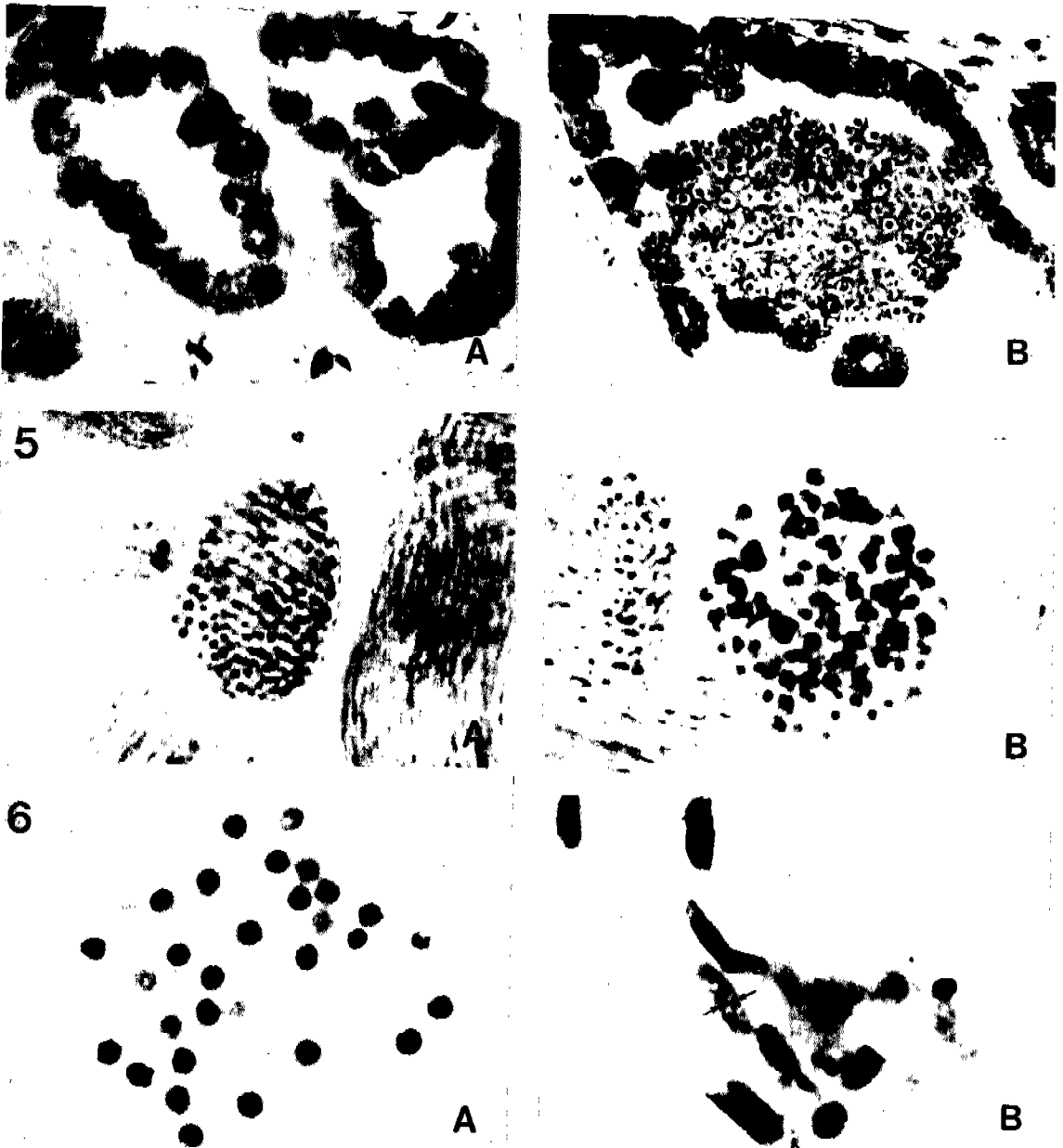


Fig. 4. Cysts with eupyrene(A) and apyrene(B) spermatocytes. x700

Fig. 5. Cysts with eupyrene(A) and apyrene(B) spermatids just after meiosis. x700

Fig. 6. Eupyrene(A) and apyrene(B) spermatozoa. The micronuclei in apyrene spermatozoa are indicated by arrows. x1500

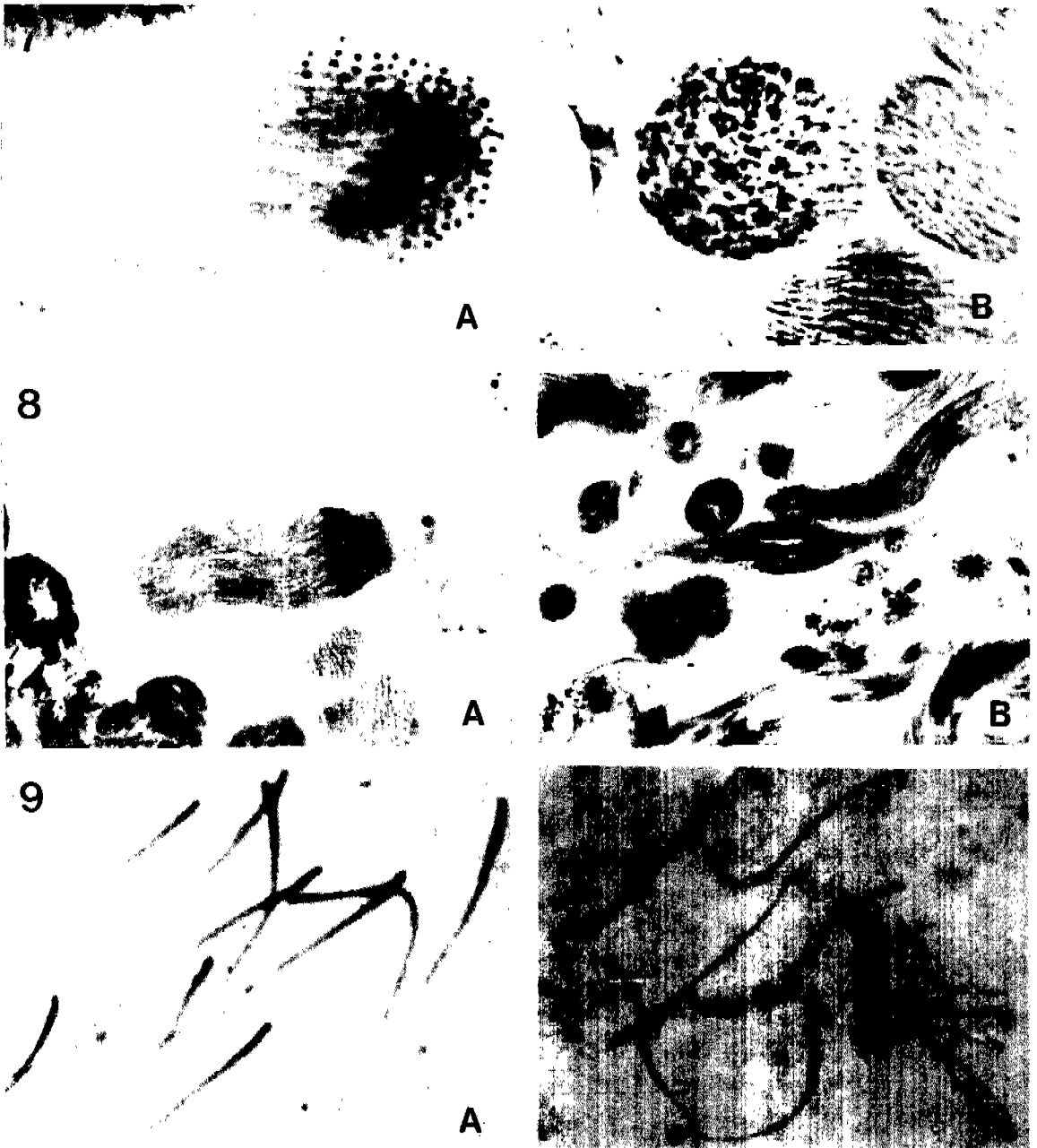


Fig. 7. Early stage of elongated cysts with eupyrene(A) and apyrene(B) spermatids. x700

Fig. 8. Late stage of elongated eupyrene(A) and apyrene(B) cysts. Anterior ends of eupyrene cyst with spermatozoa of elongated nuclei, and apyrene cyst with spermatozoa of micronuclei in broad central region. x700

Fig. 9. The nucleated eupyrene(A) and anucleated apyrene(B) sperms separated from mature testicular cyst. x1500

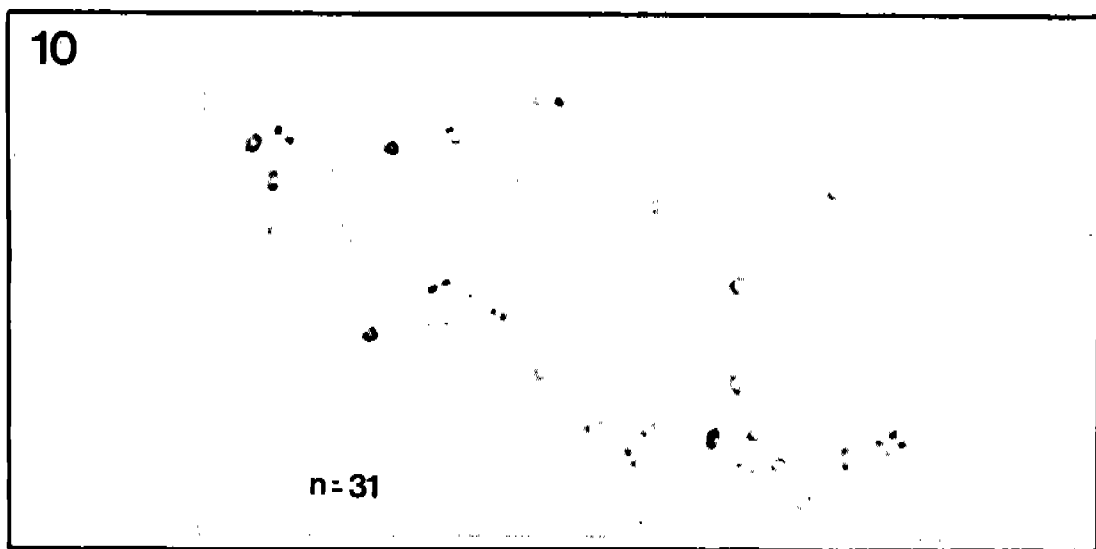


Fig. 10. First meiotic early metaphase chromosomes, 31 bivalents (paired with homologous chromosomes, $n=31$) are represented. $\times 2000$

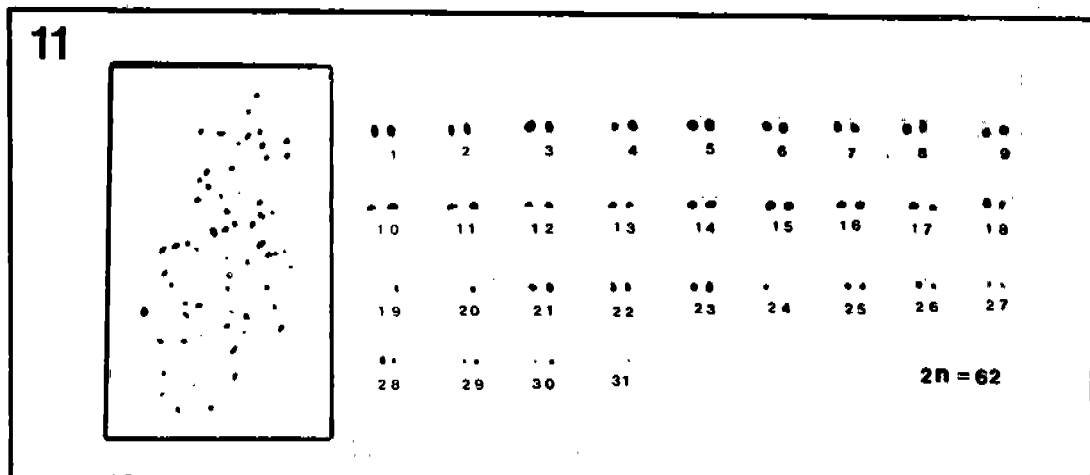


Fig. 11. Spermatogonial metaphase chromosomes and karyotype of *Helicoverpa assulta*, 62 diploid chromosomes ($2n=62$) are represented. $\times 1800$

방법으로 시행되어 왔으나, 본 연구에서는 air drying 방법을 이용하여 용화 후 1일된 곤충의 정소에서 적출한 생식세포를 대상으로 염색체 표본을 제작하였다. 우리나라에서 인시류의 염색체에 관한 연구는 Ha 등(1976)이 보고한 솔나방(n=30), Lee와 Kim(1976) 그리고 Park과 Kim(1977)의 배추흰나비(n=25, 26) 염색체 연구 등만이 보고되어 있을 뿐 많은 연구가 이루어지지 않은 상태이다. 일반적으로 인시류 곤충의 염색체는 수가 많고 크기가 작으며, 대부분이 dot형태로 전동원체의 구조로 되어있다(Emmel *et al.*, 1974; Maeki, 1981). 그러므로 핵형의 분석에 많은 어려움이 있어 현재까지도 각 종 수준의 정확한 핵형의 정립이 불분명한 상태이다. 본 연구에서 제 1감수분열을 거치는 동안 나타나는 정모세포의 중기초기의 염색체는 잘 분리되어있고 모두 bivalants 상태에 있으므로 정확한 갯수의 counting이 용이하였다. 담배나방의 반수 염색체는 n=31개로 확인 되었으며(Fig. 10), 모든 염색체가 bivalent 상태로 쌍을 이루고있는 것으로 관찰되어 본 담배나방도 다른 인시류의 성결정 기작과 마찬가지로 응성의 성염색체는 호모접합자인 것으로 생각된다. 또한 정원세포의 체세포분열 중기의 염색체를 분석한 결과 2n=62개로 반수 염색체수와 일치하며, 이중에서 상염색체는 60개이고 한 쌍의 성염색체가 존재하는데 모두 상동염색체로 구성되어 있는것으로 보아 성염색체는 ZZ형 응성 상동접합자로 추정된다(Fig. 11). 앞선 연구들에서 곤충의 염색체는 종내변이(supernumerary chromosome, fragment chromosome, B-chromosome 등)가 상당히 많음이 보고되고 있는데 반하여, 본 연구에서는 누대사육 중인 담배나방을 대상으로 조사한 결과 종내 개체간의 염색체 수의 변이는 관찰되지 않았다.

결 론

담배나방(*Helicoverpa assulta*) 용시기의 정소에서 정자형성과정과정과 염색체를 광학현미경을 이용

하여 관찰하였다.

정자형성과정과정에서 각 정원세포는 여섯 번의 체세포분열과 두 번의 감수분열을 거쳐 $2^8(256)$ 개의 정자가 들어있는 다발을 형성한다. 인시류에서 특징적으로 나타나는 두 종류의 eupyrene과 apyrene 정자형성과정은 세포 핵의 상태 및 미성숙 spermatocyst내 세포 배열상에 의해 정자형성 초기에서부터 구분이 가능하였다. 이후 spermiogenesis 과정을 거쳐 spermatocyst들은 핵을 보유하고 두부가 사상형인 정자들을 갖는 유전형의 eupyrene cyst 또는 핵을 보유치 않으면서 두부가 원통형인 정자들을 갖는 긴 방추형의 apyrene cyst로 각각 성숙되었다.

정원세포의 체세포분열과 정모세포의 감수분열 중기 때 나타나는 염색체를 분석한 결과, 염색체 수는 $2n=62/n=31$ 로 확인되었고, 누대사육중인 담배나방의 종내 개체간 염색체 수의 변이는 관찰되지 않았다.

감사의 말씀

이 논문은 1995년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

1. Bodnaryk, R.P. (1989) Dynamics of water and taurine in the pupal testis of the bertha armyworm, *Mamestra configurata* Wlk., during spermatogenesis. *Invert. Repro. and devel.* 15:193-200.
2. Chase, J.A. and F.R. Gilliland, Jr. (1972) Testicular development in the Tobacco Budworm. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 65:901-906.
3. Crozifr, R.H. (1969) Chromosome number polymorphism Australian ponerine ant. *Can. J. Genet. Cytol.* 11:333-339.
4. Emmel, T. C., T. S. Kilduff and N. McFarland

- (1974) The chromosome of a long isolated monotypic butterfly genus: *Telervo zoilus* in Australia. *T. Ent.(A)* 49:43-46.
5. Ha, C. J., W. K. Kim and C. W. Kim (1976) On the chromosomes of *Dendrolimus spectabilis* Butler in Korea. *Korean J. Entomol.* 6:16-18.
 6. Hewitt, G. M. & B. John (1968) Parallel polymorphism for supernumerary segments in *Chrothippus parallus* (Zettersted). *Chromosoma (Berl.)* 31:198-206.
 7. Imai, H. T. (1974) B-chromosomes in the Myrmicinae Ant, *Leptothorax spinosior*. *Chromosoma (Berl.)* 45:431-444.
 8. John, B. and M. Charidge (1974) Chromosome variation in British populations of *Oncopsis* (Hemiptera; Cicadellidae). *Chromosoma* 46:77-89.
 9. Kerr, W. E. (1972) Number of chromosomes in some species of bees. *J. of the Kansas Entomol. Soc.* 45:111-122.
 10. Kim, D. H., J. W. Lee and W. H. Park (1987) A cytotaxonomic study of six species of the Korean Orthoptera. *Korean J. Entomol.* 17: 215-223.
 11. Lai-Fook, J. V. (1982a) Testicular development and spermatogenesis in *Calpodex ethlius* Stoll (Hesperiidae, Lepidoptera). *Can. J. Zool.* 60:1161-1171.
 12. Lai-Fook, J. V. (1982b) Structural comparison between eupyrene and apyrene spermiogenesis in *Calpodex ethlius* (Hesperiidae, Lepidoptera). *Can. J. Zool.* 60:1216-1230.
 13. Lee, H. J. and C. H. Kim (1976) The chromosomes of *Pieris rapae* L. from Chonju. *Korean J. Entomol.* 6:19-21.
 14. Leopold, R. A. (1976) The role of male accessory glands in insect reproduction. *Ann. Rev. Enomolt.* 21:199-221.
 15. Lewis, K. R. and G. G. E. Scudder (1957) The chromosome of *Dicranocephalus agillis* (Hemiptera : Heteroptera). *Cytologia* 23:92-101.
 16. Maieki, K. (1981) The chromosome of the Lepidoptera. *Tyo. Toga* 32:13-28.
 17. Moon, M. J., B. H. Lee, C. H. Kim and W. K. Kim (1988) Studies on the testis of the Fall-web Worms, *Hyphantria cunea* Drury II. Fine structure of the mature sperm. *Korea J. Entomol.* 18:133-167.
 18. Numata, H. and Hidaka T. (1980) Development of male sex cells in the Swallowtail, *Papilio xuthus* L.(Lepidoptera: Papilionidae) in relation to pupal diapause. *Appl. Entomol. Zool.* 15:151-158.
 19. Nur, U. (1969) Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosome in grasshopper. *Chromosoma(Berl.)* 27:1-19.
 20. Osnai, M., H. Kasuga and T. Aigaki (1989) Isolation of eupyrene sperm bundles and apyrene spermatozoa from seminal fluid of the Silkmoth, *Bombyx Mori*. *J. Insect physiol.* 35: 401-408.
 21. Park, Y. C. and C. W. Kim (1977) Notes on the chromosome numbers in *Pieris rapae* L. from Tongyeong area and Islands of the Environs. *Korean J. Entomol.* 7:3-5.
 22. Reinecke, L. H., J. P. Reinecke and T. S. Adams (1983) Morphology of the male reproductive tract of mature larval, pupal and adult tobacco hornworms (Lepidoptera: Sphingidae), *Manducas sexta*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76:365-375.
 23. Rothfels, K. H. and L. Siminovitch (1958) An Air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain Tech.* 33:73-77.