

黄鳝体内新棘衣棘头虫染色体核型及 G-带分析

唐琳^{1, 2}, 王文彬^{1, 2}, 刘星辉¹, 江妹¹, 胡霞¹, 曾伯平^{1, 2*}

(1. 湖南文理学院 生命科学院, 湖南 常德 415000; 2. 动物学湖南省高校重点实验室, 湖南 常德 415000)

摘 要: 采用空气干燥和胰酶消化法, 对黄鳝体内新棘衣棘头虫 [*Pallisentis (Neosentis) celatus*] 的染色体核型和 G-带进行研究, 结果表明, 新棘衣棘头虫由 3 对常染色体和 1 对性染色体组成, 其中 X 染色体和 1 号、3 号都为中着丝粒染色体, 2 号为亚中着丝粒染色体, Y 为端着丝粒染色体, 核型公式为 $2n=5m+2sm+1t$; 性别决定模式为 XX-XY; 每对染色体都有特定的 G-带带型。

关 键 词: 新棘衣棘头虫; 染色体核型; G-带; 黄鳝

中图分类号: Q953 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0335-04

Analysis of karyotype and G-binding pattern of *Pallisentis (Neosentis) celatus*

TANG Lin^{1, 2}, WANG Wen-bin^{1, 2}, LIU Xing-hui¹, JIANG Mei¹, HU Xia¹, ZENG Bo-ping^{1, 2*}

(1. College of Life Science Hunan University of Arts and Science, Changde, Hunan 415000, China; 2. Key Laboratory of Zoology in Hunan Higher Education, Changde, Hunan 415000, China)

Abstract: Karyotype and G-binding of the *Pallisentis (Neosentis) celatus* in the *Monopterus albus* were identified for the first time by using air drying method and pancreatin digestion. Results showed that in *Pallisentis (Neosentis) celatus*, there are three pairs of metacentric chromosomes and a pair of sex chromosomes. Number 1, Number 3 and X chromosome. Number 2 are submetacentric. The Y is the only telocentric chromosome. The karyotype formula is $2n=5m+2sm+1t$. The sex determining mechanism is of the XX-XY type. Every pair of chromosomes had their particular G-banding pattern.

Key words: *Pallisentis (Neosentis) celatus*; chromosome karyotype; G-binding; *Monopterus albus*

吸虫、线虫和棘头虫是动物常见的寄生蠕虫。有关动物寄生虫生理、种群等方面的研究虽有不少报道^[1-5], 但由于寄生虫种类繁多, 宿主广泛, 因此, 关于动物寄生蠕虫遗传学及细胞学的研究还比较零散, 尤其在核型分析方面, 已分析的种类不到已知种类的 1%^[6]。有关鱼类棘头虫染色体的核型分析, 仅见对 *Corynosomoides hemibagri*^[7] 和

Acanthocephalus lucii^[8] 的报道; 有关鱼类寄生虫染色体带型方面的研究迄今未见报道。新棘衣棘头虫 (*Pallisentis (Neosentis) celatus*) 的成虫主要寄生于黄鳝肠道内^[2-4], 在洞庭湖区有较高的感染率和感染强度, 并可致病^[4], 在黄鳝种群内呈聚集分布^[5]。笔者采用空气干燥和胰酶消化法对黄鳝体内新棘衣棘头虫的染色体核型进行研究, 并参照人体寄生虫

收稿日期: 2010-03-03

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(08JJ3038); 湖南文理学院硕士启动基金项目(53280051); 湖南省“十一五”重点学科(动物学)建设项目(2006180)

作者简介: 唐琳(1973—), 女, 湖南新化人, 硕士, 讲师, 主要从事动物细胞生物学研究, hnxhtanglin@126.com; *通讯作者, zbp09@163.com

染色体分带技术对其G-带进行分析,旨在为鱼类棘头虫的细胞遗传学和分类学提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

黄鳝取自湖南常德市农贸市场,在实验室进行活体剖检取材,找出寄生于肠道内的新棘衣棘头虫成虫,用0.7%生理盐水洗净后,置于培养液(80%RPMI-1640 + 20%新鲜小牛血清 + 终质量浓度为0.2 μg/mL的秋水仙素)中培养。RPMI-1640、新生小牛血清均为GIBCO公司产品。秋水仙素购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 染色体标本的制备

将从黄鳝肠道中取出的棘头虫25℃培养过夜,培养之后,用剪刀将虫体剪碎,常规制片,自然干燥,共制作20片染色体标本。

1.2.2 染色体G-带标本的制备

将上述玻片室温放置30d后,置入80℃干燥箱中烘烤3h,冷却后放入37℃预温的0.25%胰酶溶液中(pH 7.0)处理30~60s。将Giemsa母液用磷酸缓冲液按1:10稀释后放入玻片,染色10~15min,冲洗后自然干燥。

1.2.3 染色体核型及G-带分析

为确保核型分析数据的可靠,挑选形态清晰、分散良好、收缩适中的染色体中期分裂相进行显微拍照,并统计染色体数目。选5~10个着丝粒清晰、分散好、背景清晰、染色体平直的中期分裂相拍照,用Lucia cytogenetic软件中的CGH analysis程序测量染色体长度,用Excel软件分析每条染色体的相对长度、臂比和着丝粒指数,三者数据相近的配成1对,按相对长度分4组编号。着丝粒位置按Levan等^[9]的方法确定。仿照1960年Denver会议对人类染色体相对长度、臂比和着丝粒指数3个参数的测量方法进行测量统计。用Lucia cytogenetic软件中的Karyo程序进行染色体核型和G-带分析,G-带分析参照Human G400[ISCN1995]。

2 结果与分析

2.1 新棘衣棘头虫染色体核型分析

2.1.1 染色体数目

从表1可知,染色体数为8的占观察细胞总数的48%,应为新棘衣棘头虫体细胞的染色体数目, $2n=8$;染色体数为4的占观察细胞总数的29%,应为新棘衣棘头虫性细胞的染色体数目, $n=4$ 。因为试验取材是整条成虫,自然有较多的生殖细胞减数分裂相。

表1 新棘衣棘头虫细胞染色体数目
Table 1 Chromosomes' number of *Pallisentis (Neosentis) celatus*

染色体数/条	观察细胞数/ 个	占观察细胞总数比率/%
3	3	3.0
4	29	29.0
6	6	6.0
8	48	48.0
9	6	6.0
16	8	8.0
合计	100	100

在显微镜下观察染色体标本时,发现细胞存在不同分裂期(封二图1-A-1~8),部分处于早中期的染色体核型(封二图1-B-1~2)。从图1-B可知,体细胞染色体中有3对为常染色体,1对为性染色体,雌虫为同配性别(XX),雄虫为异配性别(XY)。

2.1.2 染色体相对长度、着丝粒指数、臂比及核型

由表2可见,3对常染色体中,1号和3号为中部着丝粒染色体,2号为亚中部着丝粒染色体。性染色体中,X染色体是最大的中着丝粒染色体,Y染色体是唯一的端着丝粒染色体。黄鳝体内新棘衣棘头虫雌虫的核型为 $2n=8$,XX(封二图1-B-1);雄虫的核型为 $2n=8$,XY(封二图1-B-2)。这与已研究报道的*Corynosomoides hemibagri*^[2]染色体数目一致。

表2 新棘衣棘头虫染色体核型参数
Table 2 Measurements and classification of chromosomes of *Pallisentis (Neosentis) celatus*

染色体序号	相对长度	臂比指数	着丝点指数	类型
1	27.69 ± 6.13	1.24 ± 0.15	44.34 ± 2.64	m
2	21.33 ± 5.14	1.79 ± 0.35	36.16 ± 2.21	sm
3	14.81 ± 4.61	1.17 ± 0.22	44.72 ± 2.17	m
X	33.92 ± 6.35	1.29 ± 0.15	43.39 ± 3.02	m
Y	2.41 ± 0.86	∞	0	t

m 中着丝粒; sm 中着丝粒; t 端着丝粒。

2.2 G-带带型分析

经 G-带处理,新棘衣棘头虫染色体均显示出清晰的 G-带带纹(封二图 1-C-1~3)。在显微镜下观察 100 个中期分裂相细胞,并选择其中分散良好、带纹清晰的 10 个细胞进行显微摄影,用 Lucia

cytogenetic 软件中的 Karyo 程序进行染色体核型和 G-带分析,结果表明,新棘衣棘头虫的染色体组型为 $2n=5m+2sm+1t$, $NF=14$ 。各对染色体的 G-带特征可描述如表 3。

表 3 新棘衣棘头虫染色体 G-带特征

Table 3 The G-binding pattern's characters of chromosomes in *Pallisentis (Neosentis) celatus*

染色体号	臂	区数	条带数	典型特征
1	P	2	13	1.2 带为一较窄的深染带, 1.4 带为一宽的深染带, 2.2 带和 2.4 带为非常窄的深带, 末端均匀分布 2 条窄的深带
	q	3	10	靠近着丝粒的为较宽的浅带, 2.2 带和 2.4 带为均匀的、很窄的深带, 3 区带是宽度渐窄的深带, 3.3 带和 3.5 带为宽的负染带, 3.6 带和 3.7 带有时融合
2	P	2	10	靠近着丝粒的为较深的宽染带, 1.3 带为一很窄的深染带, 末端均匀分布 3 条较深的窄带
	q	3	15	1 区的 2 条带为一窄一宽的深带, 2 区均匀分布 3 条深的窄带, 3 区均匀分布 2 条很窄的深带, 有时末端会出现负染带
3	P	1	7	靠近着丝粒的为较宽的深染带, 1.4 带为一较宽的负染带, 末端均匀分布 2 条较深的窄带
	q	2	15	1 区均匀分布 4 条深染带, 2 区有 3 条深染带, 2.2 带较宽, 2.2 带和 2.4 带有时融合
X	P	1	7	1 区有 3 条较深的带, 其中 1.2 带和 1.4 带有时融合, 1.4 带为较宽的深带
	q	2	10	靠近着丝粒的为较宽的深带, 1.2 带为一较宽的负染带, 1.3 带为一较宽的深带, 末端均匀分布了 3 条较深的窄带
Y	q	1	2	1.1 带为一较窄的深染带, 末端有一较宽的负染带

3 结论与讨论

核型的同源性和异源性是确定物种间亲缘关系远近的主要依据。目前已报道的棘头虫染色体核型分析有 13 例,其中性别模式为 XX/XO 的有 8 种^[8]。本研究中黄鳝体内新棘衣棘头虫染色体组型为 $2n=5m+2sm+1t$, 核型为 8, XX(雌虫)或 XY(雄虫), 与已报道的寄生于河鲈的棘头虫 *Acanthocephalus lucii*^[8]相比, 雌虫染色体的数目是一致的, 都是 8 条染色体。在染色体组型上, 二者的常染色体都为中着丝粒或近中着丝粒染色体, 差异较大的是性染色体, *A. lucii* 的 X 染色体为亚端着丝粒染色体, 雄虫没有 Y 染色体; *P. (N.) celatus* 的 X 染色体为中着丝粒染色体, 雄虫有 1 条端着丝粒的 Y 染色体。此外, *A. lucii* 中近 85% 有小的中着丝粒 B 染色体, 而 *P. (N.) celatus* 没有发现 B 染色体。*A. lucii* 是第一种、也是目前唯一发现有 B 染色体的棘头虫。这种棘头虫 B 染色体的产生可能与其宿主所处的水体环境长期被重金属污染有关^[8-12]。

染色体分带技术是 20 世纪中后期兴起的一种

细胞遗传学技术,通过对染色体进行消化后染色可以得到明暗相间的染色体带纹,从而形成鲜明的染色体特征。笔者对 *P. (N.) celatus* 的染色体 G-带带型初步分析结果表明,每对染色体都有各自的 G-带特征谱,尤其是 X 染色体和 1 号常染色体,其带纹较长,带型清晰。要获得清晰的染色体 G-带,分散良好的中期分裂相是首要条件,胰酶处理浓度和时间是关键。

本研究染色体标本制备方法虽参照了鱼类寄生虫染色体制备的一般方法^[7]和日本血吸虫^[13]、牛肉绦虫^[14]、管圆线虫^[15]的染色体核型, G-带制备方法参照了日本血吸虫^[13]、蛙^[16]、山羊^[17]等的制备方法,但在具体制片时,最适用药浓度、处理方式及处理时间均进行了适当的调整与改进。在进行核型分析时,先用 Photoshop 软件对图像进行加工,使其更清晰,然后用 Lucia cytogenetic 软件中的 Karyo 程序进行染色体核型分析,而且运用 G-带分带技术,有效地减少了排列、配对、测量上可能带来的误差。采用终质量浓度 0.2 μg/mL 秋水仙素溶液处理,能得到较好的棘头虫分裂中期图像;用 0.25% 胰酶

消化老化后的染色体标本1 min左右,可得到清晰的染色体G-带。

湖南文理学院生命科学院湛巧玲、徐艳、卿志成、李柱等同学协助试验,谨此致谢!

参考文献:

- [1] 张剑英, 邱兆祉, 丁雪娟. 鱼类寄生虫与寄生虫病[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 560-570.
- [2] 汪溥钦. 新棘衣棘头虫的形态和生活史的研究[J]. 寄生虫学报, 1965, 2(1): 40-46.
- [3] 王智, 曾伯平, 王文彬. 黄鳝体内寄生虫的生态位研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(2): 204-206.
- [4] 王文彬, 曾伯平, 罗玉双, 等. 洞庭湖区黄鳝体内新棘衣棘头虫的流行病学调查[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(4): 403-405.
- [5] 王文彬, 曾伯平, 王智, 等. 黄鳝体内新棘衣棘头虫的种群生态研究[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(6): 650-653.
- [6] Spakulová M, Casanova J C. Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: A review[J]. Cytogenet Genome Res, 2004, 106(2/4): 222-229.
- [7] 丁雪娟. 鱼类寄生虫染色体研究近况[J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 1997(1): 83-87.
- [8] Spakulová M, Králová-Hromadová I, Dudínák V, et al. Karyotype of *Acanthocephalus lucii*: The first record of supernumerary chromosomes in thorny-headed worms [J]. Parasitol Res, 2002, 88(8): 778-780.
- [9] Levan A, Fredya K, Sandberd A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [10] Sures B. Fish acanthocephalans of the genus *Pomphorhynchus* sp. as globally applicable bioindicators for metal pollution in the aquatic environment[J]. Wien Klin Wochenschr, 2004, 116(14): 19-23.
- [11] Thielen F, Zimmermann S, Baska F, et al. The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary[J]. Environ Pollut, 2004, 129(3): 421-429.
- [12] Sures B, Thielen F, Baska F, et al. The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* as a sensitive accumulation indicator for the platinum group metals Pt, Pd, and Rh[J]. Environ Res, 2005, 98(1): 83-88.
- [13] 龚燕飞, 曾庆仁, 张祖萍, 等. 日本血吸虫染色体核型及其 G-带带型分析[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 6(3): 133-135.
- [14] 戎聚全, 杨承华, 熊克洲, 等. 牛肉绦虫染色体核型的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1991, 4(1): 40-41.
- [15] 沈浩贤, 丁步兰. 广州管圆线虫染色体核型分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 1996, 12(3): 58.
- [16] 钱水明, 余其兴. 金线蛙染色体 G 显带的方法学探索[J]. 遗传, 2002, 24(5): 555-558.
- [17] 赵淑娟, 庞有志, 邓雯, 等. 河南大尾寒羊染色体核型与 G-带分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(3): 39-43.

责任编辑: 王赛群
英文编辑: 罗文翠