

# 黄鳝体内寄生胃瘤线虫的染色体核型及 G-带分析

唐琳 王文彬\* 曾伯平 席在星 王钦

湖南文理学院生命科学院 湖南省普通高校动物学重点实验室 常德 415000

**摘要:**采用常规空气干燥法制片,对寄生于黄鳝(*Monopterus albus*)体腔内的胃瘤线虫(*Eustrongylides ignotus*)染色体核型进行分析。结果表明:胃瘤线虫体细胞有 12 条染色体,为二倍体,核型公式为  $2n = 12 = 10 m + 2 sm$ 。由 5 对常染色体和 1 对性染色体组成,性别决定模式为 XX-XY,其中 X、Y 和 1~4 号染色体都为中着丝粒染色体,5 号为亚中着丝粒染色体。每对染色体都有特定的 G-带带型。

**关键词:**胃瘤线虫;黄鳝;染色体;核型;G-带

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)04-68-06

## Analysis of Karyotype and G-Banding Pattern of the Parasitic Nematode *Eustrongylides ignotus* in the Ricefield Eel *Monopterus albus*

TANG Lin WANG Wen-Bin\* ZENG Bo-Ping XI Zai-Xing WANG Qin

Zoology Key Laboratory of Hunan Higher Education, College of Life Science, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China

**Abstract:** The karyotype of the larvae *Eustrongylides ignotus*, a parasitic nematode of *Monopterus albus*, collected from Changde City of Hunan Province was analyzed using the metaphase chromosome spread prepared from regenerative cells by an air-drying method. Results showed that the *E. ignotus* had a diploid chromosome number of 12 with a chromosome formula of  $2n = 12 = 10 m + 2 sm$ , and its sex determining mechanism was the XX-XY type. There were ten autosomal biarmed chromosomes and two X chromosomes in females or one X and one Y in males. Five pairs including chromosomes 1-4, X chromosome and Y chromosome were metacentric chromosomes, while the remaining chromosome 5 was submetacentric. Every pair of chromosomes had their characteristic G-banding pattern.

**Key words:** *Eustrongylides ignotus*; *Monopterus albus*; Chromosome; Karyotype; G-banding

有关鱼类寄生线虫的染色体核型分析并不多,仅见对鲑囊居线虫(*Cystidicola farionis*)、湖拟鲤驼形线虫(*Camallanus lacustris*)、巴贝卷旋线虫(*Spirotrichia babei*)和杜父鱼驼形线虫(*C. cotti*)的报道<sup>[1-2]</sup>。胃瘤线虫属(*Eustrongylides*)隶属于嘴刺目(Enoplida)膨结科(Dioctophmidae),其幼虫寄生于鱼类的体腔中,成虫寄生于水鸟的腺胃<sup>[3]</sup>。胃瘤线虫(*E. ignotus*)幼虫为黄鳝(*Monopterus albus*)体内的常见寄生线虫,Xiong等2009年用含有该种幼虫的黄鳝下脚料感染家鸭(*Anas platyrhynchos domestica*)成

功获得了成虫并做出鉴定<sup>[4]</sup>。此前,该线虫寄生于黄鳝腹腔首先由王溪云在江西鄱阳湖发现<sup>[5]</sup>;孙世春等在武汉市售黄鳝的肠系膜上检得<sup>[6]</sup>;后来,温安祥等对四川雅安等地<sup>[7-8]</sup>、王

**基金项目** 湖南省自然科学基金项目(No. 06JJ5036),湖南省教育厅科研项目(No. 09C697),湖南省高校科技创新团队支持计划和湖南省“十二五”重点建设学科(动物学)资助;

\* 通讯作者, E-mail: wangwb201102@163.com;

**第一作者介绍** 唐琳,女,讲师;研究方向:寄生虫细胞与分子生物学; E-mail: hnxhtanglin@126.com。

收稿日期:2012-02-28, 收回日期:2012-04-20

文彬等对洞庭湖区<sup>[9-10]</sup>的黄鳝寄生胃瘤线虫及种群生物学做过研究报道。胃瘤线虫具有宿主多样性和广布性,其幼虫是鱼类的重要病原生物。但目前大多聚焦于其流行病学方面的研究<sup>[11-13]</sup>,借助细胞生物学手段对其遗传学的研究,国内外还没有相关报道。本文对黄鳝体腔内胃瘤线虫(幼虫)的染色体核型及 G-带进行分析,以期为我国鱼类寄生胃瘤线虫的分类学研究进一步提供遗传学证据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 黄鳝取自湖南常德市农贸市场,取回后置于实验室中暂养 1~2 d,并进行日常管理,然后进行解剖取材,找出寄生在鱼体腔内的胃瘤线虫 4 期幼虫,并根据文献<sup>[4]</sup>初步分辨出雌雄。培养基 RPMI-1640、新生小牛血清均为 GIBCO 公司产品;秋水仙素购自 Sigma 公司;固定液为按 3:1 混合的甲醇和冰乙酸。

### 1.2 方法

**1.2.1 染色体标本制备** 将从黄鳝体腔内取出的胃瘤线虫置于培养液中(成分:80% RPMI-1640,20% 新鲜小牛血清,终浓度为 0.20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的秋水仙素),经 25 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜之后,将单条虫体用剪刀剪碎,常规制片,自然干燥,每条虫制成 2 片染色体标本并编号记录,共制作 50 片标本。

**1.2.2 计数与测量** 在显微镜下选取染色体分散良好的细胞 100 个,统计染色体数目。挑选 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、放大并测量,用 Lucia cytogenetic 软件中的 CGH analysis 程序测量染色体长度,并算出每条染色体的相对长度、臂比和着丝粒指数,三个数据均相近的配成一对,按相对长度分组编号。着丝粒位置按 Levan 等<sup>[14]</sup>的方法确定。

## 2 结果与分析

**2.1 染色体数目** 共观察计数黄鳝体内胃瘤线虫幼虫 100 个细胞中期分裂相,体细胞染色体数目为 12 的二倍体 ( $2n = 12, n = 6$ ) 占观察细胞总数的 79%。

**2.2 染色体核型** 胃瘤线虫细胞染色体的中期分裂相及核型模式见图 1、2,其染色体相对长度、臂比和着丝粒指数 3 个参数的测量统计见表 1。胃瘤线虫染色体核型公式为  $12 = 10 \text{ m} + 2 \text{ sm}$ 。在 5 对常染色体中,1~4 号为中部着丝粒染色体,5 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 染色体是最小的中着丝粒染色体。在体细胞的中期分裂相中,发现其雌虫有 2 条 X 染色体(图 1A),雄虫有 1 条明显的 X 染色体和 1 条 Y 染色体(图 1B)。

发现这种线虫幼虫体内有少量减数分裂时期的分裂相(图 3A~C),X 染色体有次缢痕(图 3A 细箭头所示),1 号染色体上有随体(图 3A 粗箭头所示)。

**2.3 染色体 G-带带型** 胃瘤线虫染色体 G-带带型见图 4 和 5。各号染色体的带型特征见表 2。

表 1 胃瘤线虫染色体核型参数 (Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ )

Table 1 The karyotype parameter of *Eustrongylides ignotus*

染色体序号 No. of chromosome	相对长度 (%) Relative length	臂比指数 Arm ratio	着丝点指数 Centromere index	染色体类型 Chromosome type
1	17.96 $\pm$ 1.15	1.17 $\pm$ 0.13	42 $\pm$ 2.21	m
2	14.60 $\pm$ 1.08	1.40 $\pm$ 0.30	34 $\pm$ 3.54	m
3	13.64 $\pm$ 0.83	1.08 $\pm$ 0.02	46 $\pm$ 1.98	m
4	11.64 $\pm$ 0.38	1.39 $\pm$ 0.19	36 $\pm$ 2.33	m
5	10.39 $\pm$ 1.24	2.12 $\pm$ 0.23	18 $\pm$ 2.81	sm
X	22.24 $\pm$ 0.37	1.27 $\pm$ 0.06	39 $\pm$ 2.11	m
Y	9.51 $\pm$ 0.42	1.08 $\pm$ 0.16	46 $\pm$ 2.73	m

m: 中着丝粒染色体; sm: 近中着丝粒染色体。m: Metacentric; sm: Submetacentric.



图 1 胃瘤线虫体细胞染色体中期分裂相(×1 000)

Fig. 1 The morphology of *Eustrongylides ignotus* metaphase chromosomes

A. 雌性; B. 雄性。A: Female; B: Male.

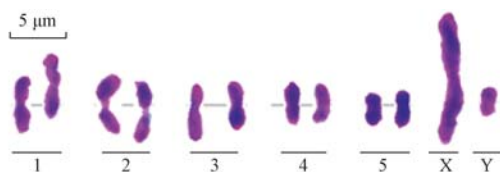


图 2 胃瘤线虫染色体组型图

Fig. 2 The karyotype of *Eustrongylides ignotus*



图 3 胃瘤线虫的减数分裂相

Fig. 3 The meiotic phase of the *Eustrongylides ignotus*

A, B. 减数分裂 II 中期; C. 减数分裂 II 末期。细箭头示次缢痕,粗箭头示随体。

A, B. Metaphase of meiosis II; C. Telophase of meiosis II. The thin arrow shows the secondary constriction of X chromosome and the thick one shows the satellite of the 1<sup>st</sup> chromosome.

### 3 讨论

本研究在借鉴管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*)<sup>[15]</sup> 和其他物种染色体制片技术<sup>[16-18]</sup> 的基础上稍作改进,成功地制备了黄鳝

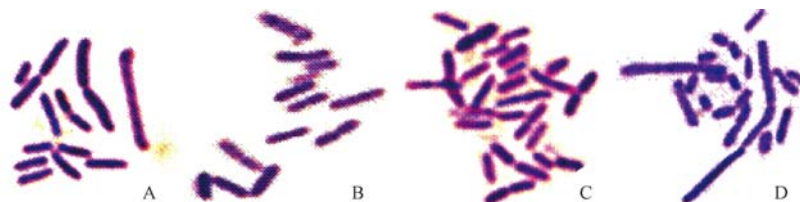


图 4 胃瘤线虫染色体 G-带图

Fig. 4 Chromosomes G-band pictures of *Eustrongylides ignotus*

A. 雌性; B. 雄性; C. 四倍体; D. 三倍体。A. Female; B. Male; C - D. Polyploid.

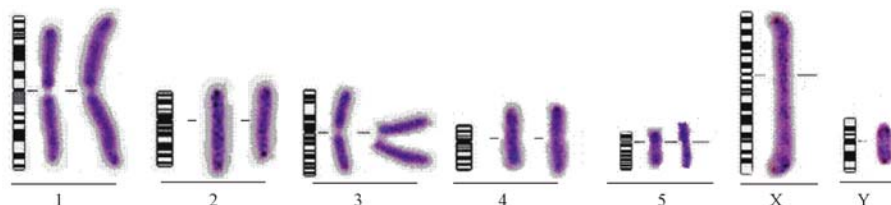


图 5 胃瘤线虫染色体 G-带带型图(雄性)

Fig. 5 Ideogram of G-band pattern of *Eustrongylides ignotus* chromosomes (male)

体内的胃瘤线虫染色体标本。进行核型分析时,先用 Photoshop 软件对图像进行加工使其更清晰,再用 Lucia cytogenetic 软件中的 karyo 程序进行染色体核型分析,有效地减少了排列、配对、测量上可能带来的误差。研究结果表明,黄鳝胃瘤线虫染色体组型为  $2n = 10m + 2sm$ , 中期染色体均有明显的着丝粒,且除第 5 号染色

体外,其他均为中着丝粒染色体。这与已报道的鱼类寄生线虫杜父鱼驼形线虫、巴贝卷旋线虫、鲑囊居线虫、湖拟鲤驼形线虫<sup>[1-2]</sup> 在染色体数目上一致,但染色体组型有明显差异,黄鳝胃瘤线虫中间着丝粒染色体所占比例高达 83.3%。在染色体形态上,黄鳝胃瘤线虫不同于小杆目的秀丽新小杆线虫 (*Caenorhabditis*

表 2 胃瘤线虫染色体 G-带带型特征

Table 2 The G-band pattern characters of chromosomes in *Eustrongylides ignotus*

染色体号 Serial number of chromosomes	臂 Arms	区数 Number of regions	条带数 Number of bands	典型特征 Typical characteristic
1	p	2	13	1.2 带和 1.4 带为 2 条较宽的深染带,且 1.4 带比 1.2 带宽,2 区有 4 条宽窄相近的深染带,2.7 带是一较宽的负染带
	q	2	12	靠近着丝粒的是一较宽的浅染带,1.3 带和 1.5 带是 2 条较窄的深染带,2 区的带是 3 条宽度渐窄的深带,在 2.2 带和 2.4 带之间是一较宽负染带
2	p	2	11	1.2 带和 1.4 带是深染带,且 1.2 带比 1.4 带宽 2 区均匀分布了 3 条深染带
	q	3	17	1.2、3 区带都均匀分布,且分别分布 3 条、3 条和 2 条宽度不等的深染带
3	p	2	8	靠近着丝粒的是一较宽的深染带,1.3 带是一相对窄些的深染带,1.4 带是一较宽的负染带,2 区有 2 条宽窄不等的深染带
	q	1	16	靠近着丝粒的是一窄的浅染带,1.3 带和 1.5 带、1.11 带和 1.13 带有时融合,共分布了 7 条较窄的深带
4	p	1	7	1.2 带是一很窄的深染带,1.4 到和 1.6 带是相对较宽的深带,两者有时融合
	q	1	15	除了 1.10 带很窄外,其他的都是较宽的深带
5	p	1	5	1.2 带是一较宽的深染带,1.4 带是一窄的深带
	q	2	13	1.2 带是一较窄的深染带,1.4 带、1.6 带和 1.8 带是 3 条较宽的深染带,2 区带是 2 条较窄的深染带
X	p	1	7	1.2 带和 1.6 带是 2 条很窄的深带,1.4 带是一较宽的深染带
	q	2	10	1 区靠近着丝粒的是一较窄的深带,1.3 带是一宽的深染带,2 区的 3 条深染带均匀分布
Y	p	1	5	靠近着丝粒的是一较宽的负染带,1.4 带是较宽的深染带
	q	1	5	靠近着丝粒的是一较宽的负染带,1.2 带是一较宽的浅染带

q. 长臂; p. 短臂; 典型特征描述:第一个数字代表区号,第二个数字代表该区中的条带号。

q. Long arm; p. Short arm. Typical characteristic describe; the first number represents the area code and the second one represents the serial number of band.

*elegans*),后者为全着丝粒染色体,其着丝粒为弥散性<sup>[19-20]</sup>,而与有固定着丝粒的肠道鼠鞭虫(*Trichuris muris*)<sup>[21]</sup>的更相似。此外,本研究所制备的染色体标本中,雌雄个体 X 染色体数目的明显差异和 Y 染色体的出现,表明黄鳝胃瘤线虫的性别决定模式为 XX-XY,雌虫为同配性别(XX),雄虫为异配性别(XY)。这与已有的研究资料<sup>[22-24]</sup>一致。

本研究还发现黄鳝胃瘤线虫幼虫有少量的减数分裂相和多倍体(图 4C, D)。多倍体的出现可能与染色体制片过程中秋水仙素的处理有关。但减数分裂相的出现有点令人意外。Xiong 等在对黄鳝胃瘤线虫的生活史进行研究

时,发现寄生于黄鳝体内的第 4 期幼虫雄虫感染家鸭 2~4 d 后发生第 4 次蜕皮,4 d 后发育成熟;雌虫感染后 2~4 d 发生第 4 次蜕皮,9~17 d 产卵;相对于第四期幼虫,雌虫成虫体积发生了 151% 的增长,雄虫成虫体积增长不明显<sup>[4]</sup>。由于寄生线虫大多在寄生后期幼虫最后一次蜕皮后才开始发育,如中华卵索线虫(*Ovomermis sinensis*)<sup>[25]</sup>。关于胃瘤线虫生活史的相关报道显示,胃瘤线虫幼虫在感染终末宿主后发育成成虫<sup>[4, 26]</sup>,但其生殖细胞的发育起始于哪个阶段,还没有相关报道。本研究取样本为黄鳝体内的胃瘤线虫幼虫,有减数分裂相的出现,提示可能其幼虫的生殖腺在中间宿

主体内已开始发育,趋于成熟,但有待进一步研究证实。

胃瘤线虫是常见的寄生性线虫,分布广泛,生活史复杂,宿主种类多,传染力强。相关资料显示,其分布在世界各地,包括南美的巴西<sup>[27]</sup>、北美的美国<sup>[28]</sup>、欧洲的英格兰<sup>[29]</sup>、亚洲的中国<sup>[30]</sup>和日本<sup>[31]</sup>等地。其中间宿主繁多,寡毛类动物可能是第一中间宿主<sup>[26]</sup>;第二中间宿主主要为食蚊鱼(*Gambusia affinis*)、黄鳝等小型鱼类,大嘴黑鲈鱼(*Micropterus salmoides*)、太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)等肉食性鱼因捕食小型鱼类感染胃瘤线虫幼虫而成为其转续宿主<sup>[28]</sup>;终末宿主主要为大白鹭(*Casmerodius albus*)等水鸟<sup>[32]</sup>。但有关胃瘤线虫分类方面的研究只有零星报道,目前还只有3个确定的有效种<sup>[4]</sup>。本研究首次成功制备黄鳝胃瘤线虫染色体标本,并进行染色体核型和G-带分析,可充实胃瘤线虫相关研究的基础资料,为胃瘤线虫的分类学研究提供遗传学证据,同时为进一步研究胃瘤线虫种群遗传学提供新的参考和开辟新的途径。

## 参 考 文 献

- [1] 丁雪娟. 鱼类寄生虫染色体研究近况. 华南师范大学学报:自然科学版, 1997, 29(1): 83-87.
- [2] 丁雪娟. 鱼类寄生虫的染色体研究 II. 两种寄生线虫的核型. 广东寄生虫学会年报, 1991, 12/13: 186-187.
- [3] 张剑英, 邱兆祉, 丁雪娟, 等. 鱼类寄生虫与寄生虫病. 北京: 科学出版社, 1999: 560-570.
- [4] Xiong F, Wang G T, Wu S G, et al. Development of *Eustrongylides ignotus* (Nematoda: Dioctophmida) in domestic ducks (*Anas platyrhynchos domestica* (L.)). *Journal Parasitology*, 2009, 95(5): 1035-1039.
- [5] 王溪云. 鄱阳湖鱼类寄生蠕虫名录. 江西科学, 1985, 3(1): 34-48.
- [6] 孙世春, 伍惠生. 武汉市售鱼类寄生线虫的研究. 海洋湖沼通报, 1994, (1): 83-89.
- [7] 温安祥, 杨光友, 张同富. 四川黄鳝寄生虫的初步调查. 四川动物, 2000, 19(1): 22-23.
- [8] 温安祥. 几种寄生虫在黄鳝体内寄生的研究. 四川农业大学学报, 2003, 21(1): 43-46.
- [9] 王文彬, 曾伯平, 韩庆, 等. 洞庭湖区黄鳝体内胃瘤线虫的感染研究. 水利渔业, 2003, 28(3): 62-63.
- [10] 王文彬, 王京仁, 曾伯平, 等. 黄鳝体内胃瘤线虫的种群生物学研究. 水生生物学报, 2004, 28(5): 535-539.
- [11] Spalding M G, Bancroft G T, Forrester D J. The epizootiology of eustrongylidosis in wading birds (Ciconiiformes) in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 1993, 29(2): 237-249.
- [12] Coyner D F, Spalding M G, Forrester D J. Epizootiology of *Eustrongylides ignotus* in Florida: transmission and development of larvae in intermediate hosts. *Journal of Parasitology*, 2003, 89(2): 290-298.
- [13] Kvach Y, Winkler H M. The colonization of the invasive round goby *Neogobius melanostomus* by parasites in new localities in the southwestern Baltic Sea. *Parasitology Research*, 2011, 109(3): 769-780.
- [14] Levan A, Fredya K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201-220.
- [15] 沈浩贤, 丁步兰. 广州管圆线虫染色体核型分析. 中国人兽共患病杂志, 1996, 12(3): 58.
- [16] 唐琳, 王文彬, 刘星辉, 等. 黄鳝体内新棘衣棘头虫染色体核型及G-带分析. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2010, 36(3): 335-338.
- [17] 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. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 6(3): 133-135.
- [18] 钱水明, 余其兴. 金线蛙染色体G显带的方法学探索. 遗传, 2002, 24(5): 555-558.
- [19] Dernburg A F. Here, there, and everywhere; kinetochore function on holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 153(6): F33-F38.
- [20] Maddox P S, Oegema K, Desai A, et al. "Holo"er than thou: chromosome segregation and kinetochore function in *C. elegans*. *Chromosome Research*, 2004, 12(6): 641-653.
- [21] Špakulová M, Králová I, Cutillas C. Studies on the karyotype and gametogenesis in *Trichuris muris*. *Journal of Helminthology*, 1994, 68(1): 67-72.
- [22] Špakulová M, Casanova J C. Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: A review. *Cytogenetic and Genome Research*, 2004, 106(2/4): 222-229.
- [23] Mutafova T, Dimitrova Y, Komandarev S. The karyotype of four *Trichinella* species. *Parasitology Research*, 1982, 67(1): 115-120.
- [24] Mutafova T. Meiosis and some aspects of cytological

- mechanisms of chromosomal sex determination in nematode species. *International Journal for Parasitology*, 1995, 25 (4): 453 - 462.
- [25] 李俊莉, 王国秀, 汪威, 等. 中华卵索线虫生殖系统发育过程中形态和主要化学物质含量的变化. *华中师范大学学报: 自然科学版*, 2006, 40(2): 265 - 268.
- [26] Measures L N. The development of *Eustrongylides tubifex* (Nematoda: Dioctophymatoidea) in oligochaetes. *Journal of Parasitology*, 1988, 74(2): 294 - 304.
- [27] Guidelli, G M, Isaac A, Takemoto R M, et al. Endoparasite infracommunities of *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Pisces: Pimelodidae) of the Baia River, Upper Parana River floodplain, Brazil: specific composition and ecological aspects. *Brazilian Journal of Biology*, 2003, 63(2): 161 - 168.
- [28] Coyner D F, Schaack S R, Spalding M G, et al. Altered predation susceptibility of mosquitofish infected with *Eustrongylides ignotus*. *Journal of Wildlife Diseases*, 2001, 37(3): 556 - 560.
- [29] Dorucu M, Crompton D W, Huntingford F A, et al. The ecology of endoparasitic helminth infections of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Scotland. *Folia Parasitologica (Praha)*, 1995, 42(1): 29 - 35.
- [30] Moravec F, Nie P, Wang G T. Some nematodes of fishes from central China, with the redescription of *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *fulvidraconis* (Camallanidae). *Folia Parasitologica*, 2003, 50(3): 220 - 230.
- [31] Asakawa M, Kimoto Y, Murata K. First record of *Eustrongylides tubifex* (Dioctophymatidae) from little grebe, *Tachybaptus ruficollis* in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1997, 59(10): 955 - 956.
- [32] Roffe T J. *Eustrongylides* sp. epizootic in young common egrets (*Casmerodius albus*). *Avian Diseases*, 1988, 32 (1): 143 - 147.