

河南太行山脉3产地淡水三角涡虫染色 体数目及核型多样性分析

程方方,董自梅,李小艳,陈广文,刘德增

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘要:利用空气干燥法对采自河南境内太行山脉十字岭、张沟、八里沟3产地淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)的染色体和核型进行了研究.结果表明:十字岭淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞中染色体数目以24条为主($2n=3x=24=24m$),占84.56%,少数为16条($2n=2x=16=16m$),占8.98%,染色体基数为8,为二倍体和三倍体的混合倍体;张沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞中染色体数目以25条为主($2n=3x+1=24+1SB=21m+3sm+1SB$),占80.84%,含有一条小B染色体,少数为24条($2n=3x=24=21m+3sm$),占15.99%,极少数为32条,占3.17%,染色体基数为8,为三倍体、四倍体和三倍性非整倍体的混合倍体;八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)的体细胞中染色体数目以24条($2n=3x=24=24m$)和32条($2n=4x=32=32m$)为主,分别占38.21%和39.77%,染色体基数为8,为三倍体和四倍体的混合倍体,该产地部分三倍体个体体细胞中染色体结构发生变异,个别染色体末端有随体,其核型呈现多型性.

关键词:淡水三角涡虫;太行山脉;核型;染色体

中图分类号:Q958.3

文献标志码:A

淡水涡虫隶属于扁形动物门(Platyhelminthes),涡虫纲(Turbellaria),是动物界最早出现两侧对称、三胚层、营自由爬行生活的动物类群,在动物系统演化中占有重要地位.淡水涡虫因其强大的再生能力成为研究再生、遗传和进化的良好材料.

染色体核型是生物类群的特征之一,染色体数目及结构变异是物种进化的重要原因之一.淡水涡虫染色体的研究为其分类、进化、生殖及基因组学研究提供了科学依据.关于涡虫染色体的研究,国外起步较早,日本和欧美的学者通过对涡虫染色体的研究,发现三角涡虫染色体基数包括 $x=4,7,8$ 和 9 四种类型^[1-7],且其染色体数目和核型存在多态性、多倍性、混合倍性、非整倍性及B染色体等^[2,8].我国研究较晚,近年来,我国学者陈广文^[9-13]、马金友^[14]、张栩^[15]、马克世^[16]、高艳^[17]等先后报道了我国部分产地淡水三角涡虫染色体核型,结果显示:我国三角涡虫染色体基数为 $x=8$,以二倍体($2n=2x=16$)和三倍体($2n=3x=24$)的混合倍体为主,另有三倍性非整倍体($2n=3x+1=24+1$)存在^[10].目前,关于我国淡水三角涡虫的染色体研究虽有报道,但关于不同地区和不同生态环境条件下淡水三角涡虫的种类、分布、染色体和核型等仍需要进一步深入研究.本文对采自河南境内太行山脉3产地淡水三角涡虫的染色体和核型进行了分析,以期为我国淡水三角涡虫的分类学及进化生物学研究提供基础资料.

收稿日期:2016-02-17

基金项目:国家自然科学基金(31570376;31471965;31170357);河南省基础与前沿技术研究基金(142300410160).

第1作者简介:程方方(1986—),女,河南周口人,河南师范大学博士研究生,主要从事中国淡水涡虫资源保护与利用, E-mail:chengff1688@139.com.

通信作者:陈广文,河南师范大学教授,博士,博士研究生导师, E-mail:chengw0183@sina.com.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)分别采自太行山脉辉县境内的十字岭(N: 35°37.688', E: 113°36.213', 海拔 1064 m)、张沟(N: 35°38.086', E: 113°36.926', 海拔 925 m)和八里沟景区(N: 35°35.542', E: 113°32.309', 海拔 488 m)3个产地。带回实验室后在培养箱 12 ℃条件下培养,每天换水 1 次,每周喂食鱼脾脏 1 次,实验前饥饿 1 周。

1.2 染色体制备方法

1.2.1 染色体制备

染色体制备参照 Chen 等^[13]的方法进行。

1.2.2 染色体计数

在显微镜下随机选取染色体分散良好的中期细胞 100 个以上,统计染色体数目。

1.2.3 核型分析

在所观察的细胞中,每个产地选出 5 个来自不同个体、着丝点清楚、分散良好、背景清晰、染色体比较平直的细胞进行拍照,然后对染色体进行测量,算出每一染色体的相对长度、臂比和着丝点指数,根据测量结果进行染色体分组和编号。着丝点位置按 Levan 等^[18]的方法确定。

2 结果

2.1 河南 3 产地淡水三角涡虫体细胞染色体数目统计

显微镜下,观察 3 产地淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞中期分裂相,并进行染色体数目统计,结果见表 1。

表 1 河南三产地淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞染色体数目统计表

产地	观察细胞总数	染色体数目百分比/%				
		16	24	25	32	其他
十字岭	145	8.98	84.56	0	0	6.46
张沟	133	0	15.99	80.84	3.17	0
八里沟	110	0	38.21	0	39.77	22.02

2.2 河南 3 产地淡水三角涡虫体细胞染色体核型分析

2.2.1 十字岭淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞染色体核型分析

十字岭淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞染色体核型参数见表 2,三倍体中期分裂相、核型图、核型模式图以及二倍体中期分裂相见图 1。核型分析结果如下:

十字岭淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞中期分裂相中,染色体数目以 24 条为主,占 84.56%,为三倍体 $2n=3x=24$,核型公式为 $2n=3x=24=24m$;少数为 16 条,占 8.98%,为二倍体 $2n=2x=16$,核型公式为 $2n=2x=16=16m$ 。8 组染色体均为中部着丝粒染色体,最大组与最小组的染色体相对长度比值小于 2,属 1A 核型。

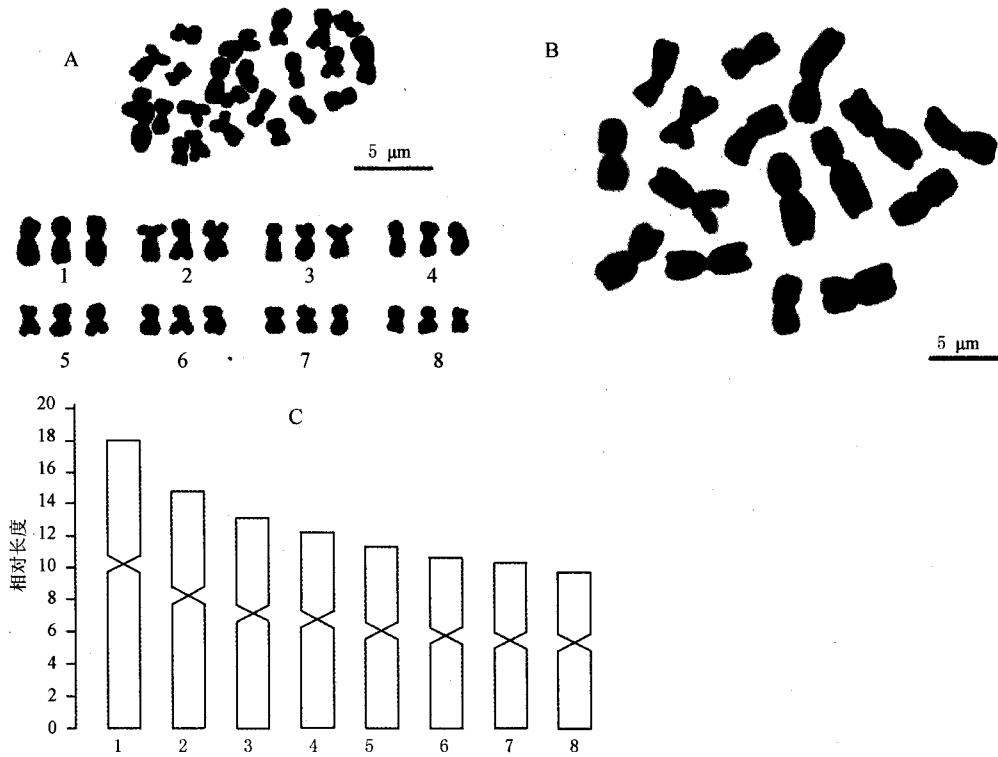
表 2 十字岭淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞核型参数

编号	相对长度	臂比	着丝粒指数	染色体类型
1	17.89±0.90	1.35±0.08	42.83±1.67	m
2	14.74±0.08	1.28±0.11	44.09±2.08	m
3	13.17±0.43	1.20±0.09	45.69±1.55	m
4	12.24±0.43	1.25±0.15	44.69±2.54	m
5	11.35±0.06	1.15±0.08	46.61±1.67	m
6	10.61±0.29	1.19±0.11	45.83±2.07	m
7	10.29±0.34	1.14±0.09	46.73±1.97	m
8	9.72±0.66	1.23±0.07	45.21±1.14	m

2.2.2 张沟淡水三角涡虫(*Dugesia sp*)体细胞染色体核型分析

张沟淡水三角涡虫(*Dugesia sp*)体细胞染色体核型参数见表3,三倍性非整倍体中期分裂相、核型图、核型模式图、三倍体和四倍体中期分裂相见图2.核型分析结果如下:

张沟淡水三角涡虫(*Dugesia sp*)体细胞中期分裂相中,染色体数目以25条为主,占80.84%,为三倍性非整倍体 $2n=3x+1=25$,存在一条小B染色体,第7组染色体为亚中部着丝粒染色体,其余各组均为中部着丝粒染色体,核型公式为 $2n=3x=24+1SB=21m+3sm+1SB$.少数中期分裂相中有24条染色体,占15.99%,为三倍体 $2n=3x=24$,核型公式为 $2n=3x=24=21m+3sm$,此种核型第4组染色体为亚中部着丝粒染色体.极少数中期分裂相中有32条染色体,为四倍体 $2n=4x=32$,占3.17%.9组染色体中,最大组与最小组的染色体相对长度比值大于4,臂比大于2的染色体所占比例为0.12,核型属于2C核型,呈现多型性.



A: 中期分裂相及核型图(3x); B: 中期分裂相(2x); C: 核型模式图(3x).

图1 十字岭淡水三角涡虫(*Dugesia sp*)体细胞染色体核型分析

表3 张沟淡水三角涡虫(*Dugesia sp*)体细胞核型参数

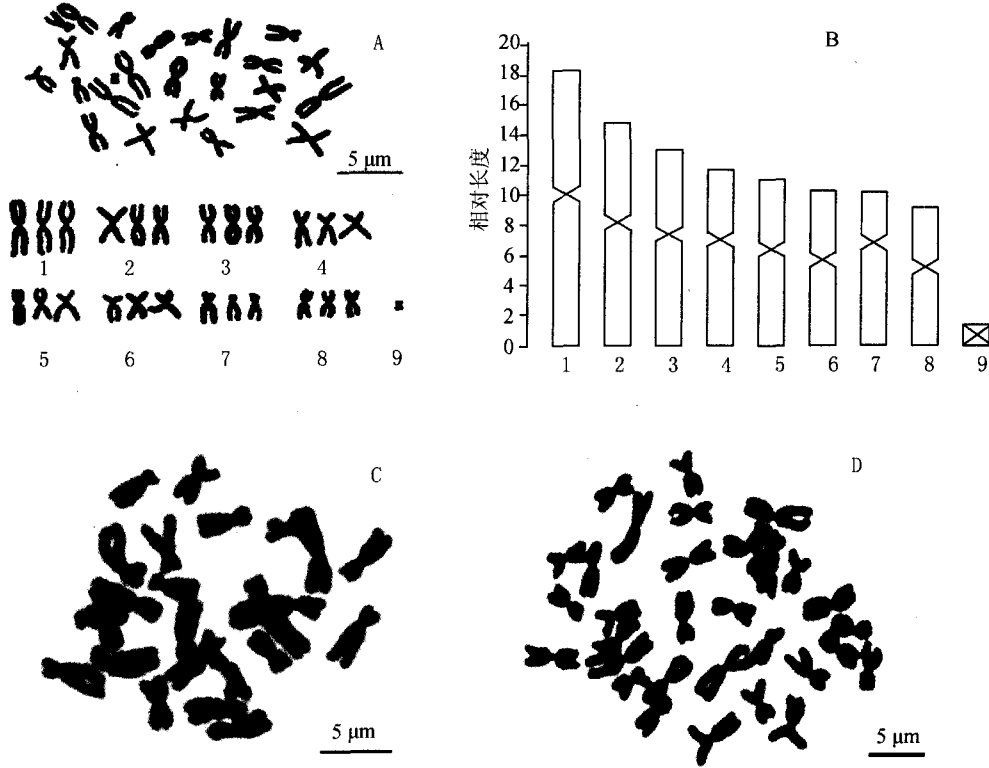
编号	相对长度	臂比	着丝粒指数	染色体类型
1	18.19±0.53	1.25±0.11	44.76±2.07	m
2	14.84±0.80	1.25±0.21	44.60±2.78	m
3	13.03±0.26	1.31±0.08	44.20±1.12	m
4	11.76±0.31	1.51±0.21	40.28±3.38	m
5	11.02±0.34	1.39±0.19	42.69±2.61	m
6	10.30±0.35	1.23±0.13	45.28±2.36	m
7	10.25±0.59	2.08±0.21	33.34±1.99	sm
8	9.26±0.21	1.29±0.08	44.31±1.61	m
9	1.35±0.14	1.25±0.08	44.95±1.54	m

2.2.3 八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia sp*)体细胞染色体核型分析

八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia sp*)体细胞染色体核型参数见表4,表5,中期分裂相、核型图、核型模式图见图3.核型分析结果如下:

八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia sp*)体细胞中期分裂相中,染色体数目以24条和32条为主,分别占

38.21%和39.77%,为三倍体和四倍体的混合倍体 $2n=3x=24$ 和 $2n=4x=32$,核型公式分别为 $2n=3x=24=24m$, $2n=4x=32=32m$. 8组染色体均为中部着丝粒染色体,最大组和最小组染色体相对长度的比值都小于2,属于1A核型.值得注意的是,该产地个别三倍体个体体细胞中期分裂相中,染色体末端有随体,其核型呈现多型性.



A: 中期分裂相及核型图 (3x+1); B: 核型模式图 (3x+1); C: 中期分裂相 (3x); D: 中期分裂相 (4x).

图2 张沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞染色体核型分析

表4 八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞核型参数(3x)

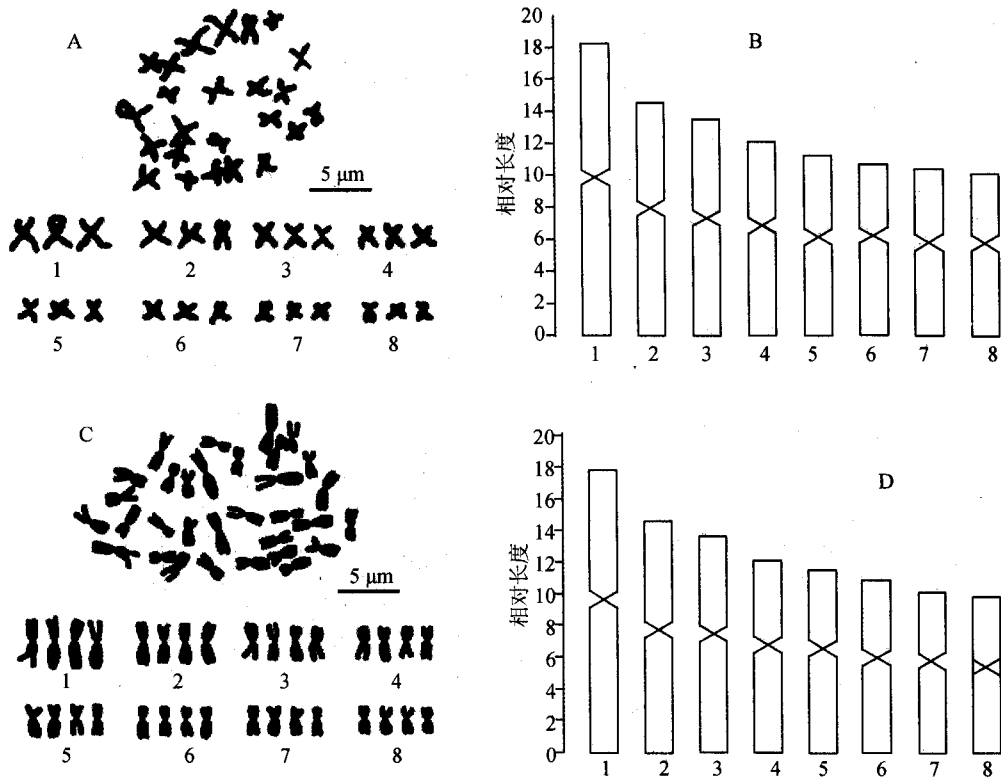
编号	相对长度	臂比	着丝粒指数	染色体类型
1	18.12±0.37	1.19±0.06	45.78±1.40	m
2	14.47±0.10	1.20±0.04	45.68±0.88	m
3	13.43±0.22	1.18±0.11	46.13±2.36	m
4	12.07±0.17	1.31±0.11	43.47±2.10	m
5	11.12±0.33	1.22±0.13	45.13±2.46	m
6	10.68±0.10	1.37±0.12	42.51±1.97	m
7	10.30±0.11	1.28±0.22	44.49±3.69	m
8	10.00±0.08	1.35±0.05	42.92±1.02	m

表5 八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞核型参数(4x)

编号	相对长度	臂比	着丝粒指数	染色体类型
1	17.77±0.07	1.17±0.08	46.16±1.60	m
2	14.54±0.40	1.11±0.07	47.53±1.46	m
3	13.51±0.22	1.23±0.10	45.07±1.88	m
4	12.09±0.16	1.28±0.11	44.24±2.02	m
5	11.47±0.19	1.31±0.11	43.54±2.12	m
6	10.82±0.15	1.22±0.02	45.19±0.28	m
7	10.09±0.10	1.33±0.09	43.16±1.69	m
8	9.71±0.64	1.24±0.14	44.83±2.91	m

3 讨 论

染色体是遗传物质的载体,生物界每一物种都有数目和形态结构相对稳定的染色体,并在世代相传中保持相对稳定.不同物种的染色体数目、大小、形态、核型、减数分裂行为及异染色质分布等亦有不同,因此染色体可以作为物种分类的辅助特征.同时,在生物进化过程中,染色体数目、形态、结构并非一成不变^[19].通过对染色体数目、形态和结构变化的分析,可以从细胞遗传学水平研究物种间的亲缘关系和进化规律.



A: 中期分裂相及核型图 (3x); B: 核型模式图 (3x); C: 中期分裂相及核型图 (4x); D: 核型模式图 (4x).
图3 八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)体细胞染色体核型分析

国内外关于淡水涡虫染色体的研究多为三角涡虫 (*Dugesia*) 和多目涡虫 (*Polycelis*). 日本和欧美学者通过对涡虫染色体的研究发现,三角涡虫 (*Dugesia*) 染色体基数包括 $x=4, 7, 8$ 和 9 四种类型^[1-7]. 从本文结果可以看出,河南 3 产地淡水三角涡虫染色体基数为 $x=8$, 与已报道的我国部分产地淡水三角涡虫染色体基数一致^[9-17]. 其中,十字岭淡水三角涡虫 (*Dugesia* sp) 体细胞染色体以三倍体为主,同时其体细胞中有一定数量的二倍体细胞,存在混倍体现象;张沟淡水三角涡虫 (*Dugesia* sp) 体细胞染色体以三倍性非整倍体为主,含有一条小 B 染色体,同时其体细胞中有一定数量的三倍体、四倍体细胞,存在非整倍性混倍体现象;八里沟淡水三角涡虫 (*Dugesia* sp) 体细胞染色体为三倍体和四倍体的混倍体. 淡水涡虫染色体所表现出的数目多态性、复杂倍性、混倍体现象以及复杂的核型等特点在整个动物界并不多见. 其中,四倍体个体产生的原因可能是由于二倍体个体受精卵有丝分裂过程中细胞分裂发生了异常,导致染色体分裂而细胞没有发生分裂所致,应属于同源多倍体. 三倍体个体产生的原因可能是由于四倍体个体与二倍体个体杂交所致. 混倍体多是在形成多倍体时产生的. 因此,关于二倍体 ($2x$) 和三倍体 ($3x$) 的混合倍体以及三倍体 ($3x$) 和四倍体 ($4x$) 的混合倍体可能是伴随着三倍体和四倍体的产生而形成的;也可能是细胞有丝分裂过程中,由于某些原因,染色体丢失所致^[1,20],其形成机制还有待于深入研究.

非整倍性染色体数目的产生源于生殖细胞减数分裂过程中的染色体不分离. 有研究表明,染色体着丝粒区动粒 (Kinetochore) 的缺失是非整倍体形成的潜在根源^[21]. 染色体断裂和重排等也能导致非整倍体的发

生^[22]. 研究非整倍体的类型、非整倍体发生的机制及其生物学特性,对基因图谱、基因的定位及多倍体育种等有重要的意义. 值得注意的是,张沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)的三倍性非整倍体体细胞的第7组染色体为亚中部着丝粒染色体,而其三倍体体细胞的第4组染色体为亚中部着丝粒染色体,推测此种现象的原因,可能是中部着丝粒染色体发生臂间倒位造成或其他原因引起. 此外,八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)的极个别三倍体细胞中染色体末端存在随体. 随体在种内是稳定的,而在种间有差异^[23]. 同一物种不同个体间随体的大小、数目和位置一般是相对恒定的,因此,随体可作为染色体形态识别、物种分类以及进化分析的重要特征. 为何八里沟淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)极个别三倍体细胞中染色体末端出现随体而不是所有三倍体细胞中染色体末端都有随体值得进一步研究.

物种会随着生存环境的改变产生一定的适应性变化,包括外部特征,内在结构和生理生化机制等. 涡虫所生活的地理位置、生态环境和人为因素等均可能成为其进化的诱因. 河南3产地淡水三角涡虫地理分布区的经纬度相近,但其染色体数目和核型差异较大,特别是十字岭和张沟的地理位置较近,仅海拔高度稍有区别,因此推测造成核型差异的原因可能是海拔高度和环境温度影响的结果. 前期研究发现,太行山区淡水三角涡虫和多目涡虫的分布与海拔密切相关,呈现出明显的垂直分布特点,二者垂直分布的分界线大约在1200 m左右,随着海拔高度的升高,低海拔分布的三角涡虫逐渐被高海拔分布的多目涡虫所取代. 涡虫染色体和核型存在多型性,其核型极易受环境因子和生殖周期的影响^[24,25]. 本文从细胞遗传学的角度进一步证实了三角涡虫体细胞染色体数目和核型的多型现象,为我国淡水涡虫分类学和进化生物学研究提供了细胞遗传学证据.

参 考 文 献

- [1] Benazzi M. Considerations on the neoblasts of planarians on the basis of certain karyological evidence[J]. *Chromisoma*, 1966, 19: 14-27.
- [2] Kawakatsu M, Oki I, Tamura S, et al. Studies on morphology, karyology and taxonomy of the Japanese freshwater planarian *Dugesia japonica* Ichikawa & Kawakatsu, with a description of a new subspecies, *Dugesia japonica* ryukyuensis subsp. nov.[J]. *Bull Fuji Women's College*, 1976, 14: 81-126.
- [3] Tamura S, Oki I, Kawakatsu M. A review of chromosomal variation in *Dugesia japonica* and *D. ryukyuensis* in the Far East[J]. *Hydrobiologia*, 1995, 30: 79-84.
- [4] Stocchino G A, Sluys R, Manconi R. A new species of *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida) from the Afromontane forest in South Africa, with an overview of freshwater planarians from the African continent[J]. *Zootaxa*, 2012, 3551: 43-58.
- [5] Stocchino G A, Manconi R, Corso G, et al. Karyology and karyometric analysis of an Afrotropical freshwater planarian (Platyhelminthes, Tricladida)[J]. *Italian Journal of Zoology*, 2004, 71: 89-93.
- [6] Harrath A H, Sluys R, Aldahmash W, et al. Reproductive strategies, karyology, parasites, and taxonomic status of *Dugesia* populations from Yemen (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae)[J]. *Zoological Science*, 2013, 30: 502-508.
- [7] Stocchino G A, Sluys R, Manconi R. A new and aberrant species of *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae) from Madagascar[J]. *ZooKeys*, 2014, 425: 71-88.
- [8] Beukeboom LW, Vrijenhoek RC. Evolutionary genetics and ecology of sperm dependent parthenogenesis[J]. *Evol Biol*, 1998, 11: 755-782.
- [9] 陈广文, 马克世, 刘德增. 中国淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)的染色体研究(Ⅱ)[J]. *动物学报*, 2005, 51: 276-280.
- [10] 陈广文, 董自梅, 田士瑞. 河北3产地日本三角涡虫的染色体变异与核型多样性分析[J]. *动物学杂志*, 2010, 45(6): 85-91.
- [11] 陈广文, 董自梅, 武丽敏. 河南两产地日本三角涡虫的染色体和核型多样性分析[J]. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 39(1): 146-149.
- [12] 陈广文, 田士瑞, 刘涛. 中国云南三产地淡水三角涡虫核型分析[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 333-339.
- [13] Chen G W, Wang Y L, Wang H K, et al. Chromosome and karyotype analysis of *Polycelis wutaishanica* (Turbellaria: Tricladida) from Shanxi Province, China[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2008, 33(3): 449-452.
- [14] 马金友, 吕九全, 陈广文. 中国淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)的染色体研究(Ⅰ)[J]. *遗传学报*, 2003, 30(11): 1045-1050.
- [15] 张 栩, 黄诗莹. 中国淡水三角涡虫染色体组型的研究[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(3): 393-396.
- [16] 马克世, 陈广文, 刘德增. 中国淡水三角涡虫(*Dugesia* sp)的染色体研究(Ⅲ)[J]. *四川动物*, 2008, 27(5): 751-753.
- [17] 高 艳, 高 媛, 张世聪. 中国淡水三角涡虫的核型分析[J]. *氨基酸和生物资源*, 2009, 31(1): 40-43.
- [18] Levan A, Fredya K, Sandberd A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201-220.

Morphology and Sexual Difference for Ossa Carpi in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) from the Taihang Mountains

ZHAO Xiaojin, DUO Tian, TIAN Huaxiang, HU Haiyang

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Sex dimorphism and morphological features of the carpus bones in rhesus macaques from the Taihang Mountains was studied in the present study. The specimens of carpus bones consisting of 35 adult individuals, including 12 males and 23 females, were measured. Four measurements were taken from the five osseous components (naviculare, lunatum, hamatum, caitatum and pisiforme). All the statistics were computed with SPSS for Windows (v. 20.0). The normality of each variable was studied and tested with Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors test, and an independent t-test was used to test for the difference between sexes. In the monkeys, the carpus is usually composed of 10 short bones, including 5 bones in proximal row and 5 bones in distal row. The data in both sexes was normally distributed. In males, numbers of measurements were higher than in females, and the difference between the average measures was significant. There were no significant differences between two sides. There are significant differences between the sexes; and there are no significant differences between the sides in carpus bones. Sex differences in the carpus bones of macaques may be relevant to habitats and the patterns of locomotion.

Keywords: *Macaca mulatta*; carpal; morphology; sex difference

(上接第 109 页)

- [19] 姚世鸿. 论染色体进化与生物进化的关系[J]. 生物学通报, 1991(1):7-9.
- [20] 张海霞. 中国淡水涡虫分类及核型研究(Ⅱ)[D]. 新乡:河南师范大学, 2015.
- [21] 何俊琳, 曹波, 王应雄. BGC823 和 A549 细胞染色体着丝粒变异[J]. 遗传, 2005, 72(6):877-881.
- [22] Ganem N J, Storchova Z, Pellman D, et al. Tetraploidy, aneuploidy and cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(2):157-162.
- [23] 田永生, 赵晓明. 党参染色体核型分析[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(2):55-56.
- [24] Teshirogi W, Ishida S, Hasebe K. Chromosomal polymorphisms of a freshwater planarian, *Polycelis auriculata* [J]. *Jap J Genetics*, 1981, 56:469-481.
- [25] 马金友, 陈广文, 刘德增. 中国淡水三角涡虫染色体变化与生殖的关系[J]. 动物学杂志, 2004, 39(5):25-29.

Diversity Analysis of Chromosome and Karyotype of Freshwater Planarians (*Dugesia* sp.) from Taihang Mountains, Henan Province, China

CHENG Fangfang, DONG Zimei, LI Xiaoyan, CHEN Guangwen, LIU Dezeng

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The chromosomes and karyotype of the freshwater planarians, *Dugesia* sp, collected from Shiziling, Zhanggou, Baligou in Taihang mountains, Henan province, were studied by air drying method. The results showed: (1) The karyotype of planarians collected from Shiziling belong to mixoploids, consisting of the triploid $2n=3x=24=24m$ and diploid $16 (2n=2x=16=16m)$, the percentage of triploid and diploid cells is 84.56% and 8.98%, respectively. (2) The karyotype of planarians collected from Zhanggou have the triploid aneuploidy chromosome number of 25 with the karyotype formula of $2n=3x+1=24+1SB=21m+3sm+1SB$, the triploid that of 24 with one of $2n=3x=24=21m+3sm$ and tetraploid $2n=4x=32$. The percentage of triploid aneuploidy, triploid and tetraploid cells is 80.84%, 15.99% and 3.17%, respectively. (3) The karyotype of planarians collected from Baligou is mixoploid composed of triploid and tetraploid, the karyotype formula is $2n=3x=24=24m$ and $2n=4x=32=32m$ and the individual chromosomes has satellite in triploid and its karyotype showed polymorphism, the percentage of triploid and tetraploid cells is 38.21% and 39.77%, respectively.

Keywords: dugesia; Taihang mountains; karyotype; chromosome