

线虫 *Distolabrellus veechi* 的生殖系统及配子发生*

郭书林** 王逸难 陈娴婷 郭跃 章龙

厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

摘要 以线虫 *Distolabrellus veechi* 的卵巢和精巢为材料, 用甲醇固定, DAPI 荧光染料对细胞核进行染色, 通过 Normaski 荧光显微镜对其生殖系统结构、性细胞染色体数目、体细胞染色体数目进行了观察。结果显示了该线虫雌虫和雄虫生殖细胞减数分裂 iv 前期的细胞核的变化特征; 减数分裂 iv 前期丝球期雌、雄生殖细胞的二价体数目均为 6; 卵细胞染色体数目为 6, 精细胞染色体数目为 5 或 6, 其性别决定机制为 XX/XO 型; 体细胞染色体数目为 11 (雄虫) 或 12 (雌虫) [动物学报 54 (3): 500–509, 2008]。

关键词 *Distolabrellus veechi* 线虫 生殖系统 配子发生 染色体

The reproductive system and gametogenesis in a nematode *Distolabrellus veechi**

GUO Shu-Lin**, WANG Yi-Nan, CHEN Xian-Ting, GUO Yue, ZHANG Long

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract In this study we analyzed oogenesis and spermatogenesis in the nematode *Distolabrellus veechi*. The *D. veechi* gem line can be divided into several regions based upon the state of the DNA in the nuclei visualized by DAPI *in situ* staining of dissected adult gonadal arms. We identified a mitotic zone, a transition zone between mitosis and meiosis, a pachytene zone and a diakinesis zone. In *D. veechi* males, the primary spermatocytes initially assemble on the rachis. Upon entering meiosis, the primary spermatocytes develop to the diplotene stage and bud away from the rachis. At diakinesis (which follows the diplotene stage) six spermatocyte bivalents become more apparent due to chromosomal condensation. The spermatocytes then undergo two maturation divisions and produce haploid spermatids, which are stored in the seminal vesicle. Five or six chromosomes can be seen in the spermatids. The male's somatic gonad consists of three tissues: two distal tip cells, the seminal vesicle and the vas deferens. In *D. veechi* females, oögonia (early oocytes) are produced from the rachis. The oocytes then undergo a growth phase and arrest at diakinesis; further development is halted until fertilization occurs. At this time, six bivalents can be seen. After penetration of the oocyte by a sperm, the oocyte advances to the metaphase stage and passes into the uterus. After two maturation divisions have been completed, two polar bodies are formed. Shortly afterwards, the sperm and egg pronuclei fuse to form the zygote nucleus, and cleavage division begin after some time. The somatic gonad of female *D. veechi* consists of one distal tip cell, the gonadal sheath, the spermatheca, the oviduct and the uterus. The results of this study also indicate that *D. veechi* show a 2N condition of 11 chromosomes for males, and 12 for females [Acta Zoologica Sinica 54 (3): 500–509, 2008].

Key words *Distolabrellus veechi*, Nematode, Reproductive system, Gametogenesis, Chromosome

线虫是世界上分布最广、种类最多、遗传变异最丰富的多细胞生物之一 (Blaxter et al., 1998; Platt et al., 1984)。海洋线虫学已经成为一门独立的科学, 而且它提出地球博物学的规律可能与海

洋深处的线虫有关 (Lambhead, 1993)。动物寄生线虫对人类的健康和社会有很大影响 (唐仲璋、唐崇惕, 1987)。土壤线虫在土壤生态系统中的有机降解、矿化和食物网中扮演重要角色 (Yeates and

2007-12-28 收稿, 2008-02-17 接受

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30670237) [This research was funded by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30670237)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: guoshulin_vip@yahoo.com.cn

© 2008 动物学报 Acta Zoologica Sinica

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

Bongers, 1999)。由于线虫种类丰富, 且很多种类的线虫易于人工培养, 所以是生物遗传变异研究领域的良好材料。线虫学中的一个重要新领域是用线虫作为基础生物学研究的模式生物, 尤其是在发育生物学、遗传学、细胞和分子生物学中广泛应用, 帮助揭露生殖和发育的普遍规律 (Chitwood and Chitwood, 1940)。

利用 *Caenorhabditis elegans*, 科学家们有史以来第一次阐明了一个多细胞动物的完整 DNA 序列, 也揭示了动物从一个单一受精卵发育到一个完全的个体的整个细胞发育过程 (Riddle et al., 1997)。科学家们在 *C. elegans* 上获得的知识为比较生物学的研究提供了范例, 近十年, 人们已对多个科的线虫胚胎、生殖腺、阴门和雄虫尾部的发育进行了研究和比较, 为生物遗传变异的研究提供了详细的资料 (Sommer, 2005)。*Distolabrellus veechi* 属小杆目小杆科线虫, 为土壤食细菌性线虫, 是单种属种类 (Anderson, 1983), 由此奠定了其在遗传变异领域中的独特研究地位。本文主要在细胞构成水平上对该线虫的生殖系统进行观察, 为遗传变异的研究提供基础资料。

Wei et al. (2003) 在生物防治线虫领域中, 将包括 *D. veechi* 在内的 6 种线虫定为对 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 晶体蛋白的浓度变化敏感的指示性线虫, 特定浓度的 Bt 毒素可导致 *D. veechi* 繁殖能力减弱。本文对该线虫正常情况下的雌、雄虫配子发生及染色体数目进行了观察, 可为 Bt 毒素致毒情况下该线虫繁殖能力减弱时配子发生的非正常化研究提供参照。

荧光显微观察法具有简洁、清晰、直观的优点, 在多种生物体中不断得到应用, 并取得了较好的结果, 如文蛤受精 (董迎辉等, 2007)、猪卵巢的染色质构型 (岳奎忠等, 2005) 等。在线虫中, 用 DAPI 染色方法对解剖得到的生殖腺观察已报道的有 *Pristionchus pacificus* (Rudel et al., 2005) 等。

1 材料和方法

1.1 *D. veechi* 生殖模式的确定

从纯培养的 *D. veechi* 的培养皿中, 取虫卵 30 粒, 每粒虫卵置于一个有 *Escherichia coli* OP50 的培养皿中, 共 30 皿。36 h 后, 观察每皿中虫卵的孵化情况, 统计虫卵的孵化率, 孵化率= 已孵出虫体数/总虫卵数%。72 h 后, 观察每皿中线虫的性别分化情况, 统计雌、雄虫数量。继续对单独培养的

线虫 (雌虫或雄虫) 的繁殖能力进行观察, 直至虫体自然死亡。

另挑取 10 粒虫卵, 将其置于一个培养皿中, 设 3 个重复, 72 h 后观察每皿中线虫的雌、雄虫数量, 并对雌、雄虫混合培养的线虫繁殖能力进行观察。

1.2 线虫生殖腺的解剖和荧光染色

该线虫雌虫生长至最大时平均体长约 2 mm、平均最大体宽约 124 μm , 雄虫平均体长约 1.4 mm、平均最大体宽约 108 μm 。于 10 \times 4.5 倍实体显微镜下进行解剖。用 5 号昆虫针挑取成熟虫体于载玻片上的 PBS 缓冲液中, 用 24 号解剖刀于雌虫阴门处或雄虫泄殖腔处将虫体截断, 虫体内的生殖腺在体腔液的压力下, 涌出虫体, 暴露于体外。

选择未经损伤且完整性高的生殖腺于 2% 多聚甲醛 PBS 缓冲液中固定 1 h, 离心, 移除固定液, 随即用甲醇萃取 5 min。结束后, 用 PBS 继续水合 15 min, 离心, 移除旧的 PBS, 滴加含有 DAPI (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 PBS, 10 min 后, 将生殖腺置于载玻片上的 5% 琼脂糖垫上, 并加入抗荧光淬灭剂, 封片后用 Nomarski 荧光显微镜观察, 数码相机拍照并绘制模式图。

1.3 受精后卵子成熟过程的观察

将怀卵雌虫挑取至载玻片上的琼脂糖垫上, 于解剖镜下用解剖刀划破虫体子宫, 子宫中虫卵溢出, 散落于琼脂糖垫上, 加盖玻片封片后于干涉显微镜下对已有精子进入的有活性的卵细胞进行持续观察。用荧光染色法显示卵子成熟阶段的极体产生过程和卵细胞的染色体数目。

2 结果

2.1 *D. veechi* 生殖模式的确定

30 粒独立培养的线虫卵在 36 h 后全部孵化出幼虫, 孵化率为 100%。其中发育成雌虫 13 条, 发育成雄虫 17 条。对此 30 条线虫独立培养至其自然死亡, 无一例虫体繁殖后代。

在 10 颗虫卵混合培养的实验中, 实验重复 3 次, 每次孵化出的线虫雌、雄性比分别为 5: 5、6: 4、4: 6。继续观察, 可见雌雄虫交配行为。雌虫产卵孵化出的幼虫可正常发育至成虫, 并且在雌雄成虫交配后由雌虫繁殖后代。

此实验中, 该线虫雌性成虫只有经雄虫授精才能繁殖后代, 证明该线虫的生殖模式为异体受精生殖模式。

2.2 *D. veechi* 雌虫生殖系统的结构

雌虫生殖系统为单臂子宫, 成虫生长至最大时, 生殖腺长约 1194 (954– 1231) μm , 前端回折, 子宫约占体长的 1/2, 子宫内含大量卵胎 (图版 iv: 1)。解剖后, 图版 iv: 1 方框中所示生殖腺部分暴露于虫体外, 其回折部分在虫体外得到伸展拉直。从生殖腺顶端至子宫方向, 不同位置的生殖细胞所表现的形态差异, 显示了生殖细胞在减数分裂 iv 前期的连续变化过程 (图版 iv: 2)。生殖腺经 DAPI 处理后, 在荧光显微镜下可观察到生殖腺细胞核发出明亮蓝光, 细胞膜与细胞质均不发光, 与暗色背景融为一体 (图版 iv: 3)。

2.2.1 *D. veechi* 雌虫的生殖导管结构

雌虫的生殖腺外鞘为 18 对细胞构成的单层膜结构, 比较 6 条生殖腺的外鞘膜细胞核排布, 各细胞的相对位置是恒定的 (图版 iv: 3)。生殖导管的最顶端为一个较大的顶端细胞, 与生殖腺外鞘相连 (图版 iv: 4)。受精囊由 6 对细胞构成, 分别通过一对细胞与生殖腺外鞘和子宫相连, 受精囊腔内含有大量精子 (图版 iv: 5)。

2.2.2 *D. veechi* 雌虫的生殖腺

荧光显微镜下, 从生殖腺顶端至末端方向, 生殖细胞核形态呈现规律性变化, 每类形态的细胞核占据生殖腺的一段区域, 由此可将生殖腺分为五个部分, 依次为有丝分裂区、过渡区 (含凝线期和偶线期细胞)、粗线区 (含粗线期细胞)、双线区 (含双线期细胞) 和丝球区 (含丝球期细胞) (图版 iv: 3)。卵原细胞有丝分裂区的细胞较小, 细胞核几乎占满整个细胞, 多数细胞核中心较黯淡, 周围较明亮, 呈环状; 明亮环区代表染色质浓缩, 细胞处于有丝分裂前期 (图版 iv: 6); 其间个别细胞的细胞核明亮集中, 表示染色体紧密排列于细胞中部, 代表进入有丝分裂中期的卵原细胞 (图版 iv: 6)。过渡区内的若干生殖细胞开始进入减数分裂阶段, 荧光显微镜下的细胞核呈明亮弯月状, 代表染色体细线交织在一起, 偏向核的一方, 此为生殖细胞进入减数分裂 iv 前期的凝线期的特征 (图版 iv: 7)。随后, 卵母细胞核染色体缩短, 细胞进入粗线期, 荧光显微镜下的粗线区内细胞核呈明亮的分散棒状 (图版 iv: 8)。粗线期之后, 进入双线期的卵母细胞从生殖轴上脱落, 由合胞体结构变成单个细胞结构 (图版 iv: 9)。双线区内的卵母细胞增大, 并呈单行排列 (图版 iv: 1), 其核内联会的同源染色体相互排斥, 只在交叉点上还保持联系, 随着时间的

推移, 交叉位置向端部移动, 在荧光显微镜下呈现明亮的 V 形, 或杆形 (图版 iv: 2)。靠近受精囊的卵母细胞进一步成熟, 进入丝球期, 丝球期的卵母细胞核内的二价体显著变短, 在核内均匀散开, 在荧光显微镜下, 可以分辨六个明亮二价体由同源染色体构成, 呈 8 形, 由于染色体很小, 在光学显微镜下已看不到交叉 (图版 iv: 3)。此时生殖细胞发生过程暂停, 于受精囊受精后进入子宫, 在子宫中完成减数分裂。

2.3 卵母细胞的成熟和受精

精子在受精囊中进入丝球期的卵母细胞 (图版 iv: 4), 刺激卵母细胞在子宫中继续进行减数分裂。受精后的丝球期卵母细胞的染色体向卵膜移动, 受精后同源染色体分开, 产生第一个极体 (图版 iv: 5)。随后, 留在卵膜处的姐妹染色单体分离, 产生第二个极体, 完成减数分裂的单倍性卵细胞含六条染色体 (图版 iv: 6)。卵母细胞完成减数分裂后, 精核与卵核体积迅速膨大, 膨大的卵核与精核互相靠近, 接触后融合, 合子形成后 4 h, 开始第一次卵裂, 胚胎中染色体由纺锤丝牵扯排列于赤道板上 (图版 iv: 7), 随后, 染色单体分别向细胞两极移动 (图版 iv: 8)。在早期胚胎中可以观察到常染色体数目为 12 条 (图版 iv: 9) 或 11 条 (图版 iv: 10)。选取有代表性的含 12 条染色体的胚胎有丝分裂前中期分裂相制成染色体组型图 (图版 iv: 11)。

2.4 *D. veechi* 雄虫生殖系统的结构和配子发生

解剖后, 图版 iv: 12 方框中所示生殖腺部分暴露于虫体外, 其回折部分在虫体外展开, 从左至右为生殖腺顶端向末端延伸 (图版 iv: 13)。从左至右, 生殖腺内生殖细胞逐渐成熟, 其细胞核形态变化可以在荧光显微镜下进行分辨, 由此可将雄虫的生殖腺分为 4 个区 (图版 iv: 1)。与雌虫生殖腺顶端区域内的细胞核荧光效果相似, 雄虫生殖腺顶端区域内的细胞核荧光效果为较亮的圆环状, 代表有丝分裂阶段的精原细胞; 调节显微镜焦平面至生殖腺顶端区域的中部层面, 可观察到生殖腺中部黯淡无光, 为不含细胞核的生殖轴结构, 生殖细胞生长在生殖轴上, 明亮的细胞核围绕生殖轴排列 (图版 iv: 2); 与雌虫生殖导管仅含有一个顶端细胞不同, 雄虫生殖导管含有两个顶端细胞, 顶端细胞个体较雌虫的小 (图版 iv: 2)。初始进入减数分裂的精母细胞核在荧光显微镜下呈明亮弯月状 (图版 iv: 3), 随后细胞核变成明亮分散的短棒状 (图版

④ 4), 依照上述雌虫生殖细胞核的不同特征代表不同时期生殖细胞的原理, 图版 ④ 3 和图版 ④ 6 分别显示了处于细线期 (或双线期), 及粗线期的精母细胞。粗线期后, 精母细胞从生殖轴上脱落, 并逐渐增大 (图版 ④ 5), 染色体逐渐缩短, 至丝球期的精母细胞核内, 可看见六个明亮圆点状的二价体 (图版 ④ 6)。减数分裂后形成的精细胞储存于储精囊中, 等待受精 (图版 ④ 1)。精细胞核很小, 核内染色体较聚集, 通过调节显微镜焦平面可观察到精细胞核内的染色体数目为 5 条 (图版 ④ 7) 或 6 条 (图版 ④ 8)。

3 讨论

线虫种间的主要形态差异之一为生殖腺臂的数目差异 (Chiwood and Chiwood, 1974)。小杆目线虫生殖腺臂呈现单臂或双臂的差异 (Lorenzen, 1981), 如 *C. elegans* 生殖腺为对称的双臂类型, 本文所研究的 *D. veechi* 生殖腺为子宫前倾的单臂类型。科学家们已建立部分线虫的谱系发生模型, 这有助于遗传变异的定位和阐释 (Baldwin et al., 1997; Blaxter et al., 1998)。科学家们更结合谱系关系对生物的同源特征进行比较, 以检测生物同源特征的祖征或衍征 (Sudhaus and Fitch, 2001)。线虫的生殖腺祖征是双臂还是单臂类型尚无定论 (Lorenzen, 1981)。Felix and Sternberg (1996) 认为单臂生殖腺的演化是多次独立的过程, 且某分类阶元下单臂生殖腺的线虫种类多寡亦是分类中的一大特色, 如 Panagrolaimidae 和 Cephalobidae 全科线虫均为单臂生殖腺, *Mesorhabditis* 属均是单臂生殖腺。本文所研究的 *D. veechi* 为单种属, 从 Meldal et al. (2007) 的谱系发生模型来看, *Mesorhabditis* 为 *Distolabrellus* 的演化分枝。

线虫动物门的生殖系统除存在显著的形态差异外, 其配子发生速度, 及不同时期生殖细胞在总生殖细胞中所占比例也有较大的种间差异。如本文所研究的线虫 *D. veechi* 雌虫生殖腺较长, 生殖轴上的生殖细胞排列密集。成熟并生长至最大体长的该线虫雌虫生殖腺中常同时含有 8 个左右的丝球期卵母细胞, 该期卵母细胞随即被排入受精囊中, 即可受精并形成胚胎; 而线虫 *P. pacificus* 生殖腺中同时常仅含有一个丝球期卵母细胞 (Rudel et al., 2005), 其配子发生速度较 *D. veechi* 慢。

不同种类线虫的染色体数目不同, 研究者对 *Haemonchus contortus* (Leroy et al., 2003)、*C.*

elegans (Stein et al., 2003)、*P. pacificus* (Sommer and Sternberg, 1996)、分子分类中第五类群的线虫 (Blaxter, 2000)、*Meloidogyne hapla* (Triantaphyllou, 1984)、*Brugia malayi* (Ghedini et al., 2004)、*Trichinella spiralis* (Hammond and Bianco, 1992; Mutafova et al., 1982)、以及其它种类 (Leroy et al., 2003) 的基因组大小和染色体数目进行了估计, 绝大多数线虫的染色体单倍体数目为 $n = 4 - 12$ (Walton, 1959)。小杆目线虫的染色体单倍体数目通常为 5 或 6 (Blaxter, 2000)。*C. elegans* 和 *C. briggsae* 的染色体单倍体数目均为 6 (Stein et al., 2003)。我们在观察 *D. veechi* 的配子发生时, 可以在荧光染色的丝球期生殖细胞核中发现 6 个发出荧光的二价体, 由此可得出 *D. veechi* 的染色体单倍体数目为 6, 符合小杆目线虫染色体单倍体数目通常为 5 或 6 的一般规律。

线虫中, 含两个 X 性染色体的合子发育为雌虫, 含单个 X 性染色体的合子发育为雄虫的 XX/XO 型性别决定模式普遍存在 (Walton, 1940), 仅有少数线虫如 *B. malayi* (Underwood and Bianco, 1999)、*Onchocerca volvulus* (Hirai et al., 1987)、*Baylisascaris transfuga* (Mutafova, 1995)、*Contraecium incurvum* (White, 1973) 和 *Trichuris muris* (Špakulov et al., 1994) 含有 Y 染色体。在我们的观察过程中, *D. veechi* 的雌虫卵细胞含有 6 条染色体; 雄虫精母细胞经减数分裂产生的精细胞含有 5 条或 6 条染色体, 根据雄虫可以产生含 5 条或 6 条染色体的配子体判断, 该线虫雄虫体细胞染色体数目为 11, 由此推测该线虫含有 5 对常染色体和一个性染色体, 性别决定方式为 XX/XO 型。该线虫早期胚胎所含染色体数目为 12 条或 11 条, 进一步证明了上述推测。

多数线虫的染色体, 如小杆目的 *C. elegans* 和 *C. briggsae* 染色体着丝点为弥散性 (Demburg, 2001; Maddox et al., 2004), 亦即全着丝粒染色体。已确认为固定着丝粒染色体的线虫有 *T. spiralis* 等一些旋毛虫 (Mutafova et al., 1982)。仅有少数研究者认为蛔虫为固定着丝粒 (Procutner and Hirai, 1986), 多数作者表示蛔虫染色体较小, 究竟为何种着丝粒至今尚无定论 (Rory, 2005)。至于小杆目线虫 *Neoplectana glasen*、*N. carpocapsae*、*N. bibionis* 的核型研究认为其为固定着丝点, 其依据为减数分裂中期 iv 的中部着丝粒染色体二价体往往呈 O 型, 端着丝粒染色体二价体呈杆状 (王国汉等, 1989)。

本研究中, *D. veechi* 亦有 V 型和杆状二价体, 此为减数分裂前期 IV 的同源染色体分离端化过程的结果, 不足以成为判定核型的证据。线虫染色体较小, 对于其染色体核型的判定需使用特定染料或电镜观察做进一步研究。

参考文献 (References)

- Anderson RV, 1983. Description of *Distolabrellus veechi* n. gen., n. sp. (Nematoda: Rhabditidae). *J. Nematol.* 15: 70–75.
- Baldwin JG, Frisse LM, Vida JT, Eddleman CD, Thomas WK, 1997. An evolutionary framework for the study of developmental evolution in a set of nematodes related to *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8: 249–259.
- Blaxter ML, De Ley P, Barey JR, Liu LX, Schedleman P, Wierstratete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM et al., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71–75.
- Blaxter M, 2000. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *Int. J. Parasitol.* 30: 347–355.
- Chitwood BC, Chitwood MB, 1940. Gametogenesis. In: *An Introduction to Nematology*. New York: Babylon, G. B. Walton, A. C., 205–215.
- Chitwood BC, Chitwood MB, 1974. *Introduction to Nematology*. Baltimore: University Park Press.
- Dernburg AF, 2001. Here, there, and everywhere: kinetochore function on holocentric chromosomes. *J. Cell Biol.* 153: F33–F38.
- Dong YH, Lin ZH, Chai XL, Lu RM, Xiao GQ, 2007. Cytological observation on fertilization and early embryonic development in the clam *Metrix meretrix*. *Acta Zool. Sinica* 53 (4): 700–709 (In Chinese).
- Flix MA, Stemberg PW, 1996. Symmetry breakage in the development of one-armed gonads in nematodes. *Development* 122: 2129–2142.
- Ghedini E, Wang S, Foster JM, Slatko BE, 2004. First sequenced genome of a parasitic nematode. *Trends Parasitol.* 20: 151–153.
- Hammond MP, Bianco AE, 1992. Genes and genomes of parasitic nematodes. *Parasitol. Today* 8: 299–305.
- Hirai H, Tada I, Takahashi H, Nwoke BE, Ufomadu GO, 1987. Chromosomes of *Onchocerca volvulus* (Spirurida: Onchocercidae): a comparative study between Nigeria and Guatemala. *J. Helminthol.* 61: 43–46.
- Lambhead PJD, 1993. Recent developments in marine benthic biodiversity. *Oceanis* 19: 5–24.
- Leroy S, Duperray C, Morand S, 2003. Flow cytometry for parasite nematode genome size measurement. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128: 91–93.
- Lorenzen S, 1981. Entwurf eines phylogenetischen Systems defreilebenden Nematoden. In: *Effentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven*, 472.
- Maddox PS, Oegema K, Desai A, Cheeseman M, 2004. “Holo” er than thou: chromosome segregation and kinetochore function in *C. elegans*. *Chromosome Res.* 12: 641–653.
- Meldal BHM, Debenham N, De Ley P, Vanfleteren JR, Vierstraete AR, Bert W, Borgonie G, Moens T, Tyler PA, Austen M, Blaxter ML, Rogers AD, Lambhead PJD, 2007. An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 622–636.
- Mutafova T, Dimitrova Y, Komandarev S, 1982. The karyotype of four *Trichinella* species. *Z. Parasitenkd.* 67: 115–120.
- Mutafova T, 1995. Meiosis and some aspects of cytological mechanisms of chromosomal sex determination in nematode species. *Int. J. Parasitol.* 25: 453–462.
- Platt HM, Shaw KM, Lambhead PJD, 1984. Nematode species abundance patterns and their use in the detection of environmental perturbations. *Hydrobiologia* 118: 59–66.
- Procunier WS, Hirai H, 1986. The chromosomes of *Onchocerca volvulus*. *Parasitol. Today*, 2: 307–309.
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR, 1997. *C. elegans* ②. New York: Cold Spring Harbor.
- Rory P, 2005. The chromosome of the Filariidae. *Filaria J.* 4: 10.
- Rudel D, Riebesell M, Sommer RJ, 2005. Gonadogenesis in *Pristionchus pacificus* and organ evolution: development, adult morphology and cell-cell interactions in the hermaphrodite gonad. *Dev. Biol.* 277: 200–221.
- Sommer RJ, Stemberg PW, 1996. Apoptosis and change of competence limit the size of the vulva equivalence group in *Pristionchus pacificus*: a genetic analysis. *Curr. Biol.* 6 (1): 52–59.
- Sommer RJ, 2005. Evolution of development in nematodes related to *C. elegans*. *Worm Book* (December 14, 2005).
- Špakub M, Kriv I, Cutillas C, 1994. Studies on the karyotype and gametogenesis in *Trichuris muris*. *J. Helminthol.* 68: 67–72.
- Stein LD, Bao Z, Blasiar D, Blumenthal T, Brent MR, Chen N, Chinwalla A, Clarke L, Clee C, Coghlan A, et al., 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biol.* 1: 166–192.
- Sudhaus W, Fitch D, 2001. Comparative studies on the phylogeny and systematics of the Rhabditidae (Nematoda). *J. Nematol.* 33: 1–70.
- Tang CZ, Tang CT, 1987. *Nematode Diseases in Human and Animals*. Beijing: Science Press (In Chinese).
- Triantaphyllou AC, 1984. Polyploidy in meiotic parthenogenetic populations of *Meloidogyne hapla* and a mechanism of conversion to diploidy. *Rev. Nematol.* 7: 65–72.
- Underwood AP, Bianco AE, 1999. Identification of a molecular marker for the Y chromosome of *Brugia malayi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99: 1–10.
- Walton AC, 1940. “Gametogenesis” in Chitwood and Chitwood’s “An Introduction to Nematology” Set. ②, Part 1: 205–215.
- Walton AC, 1959. Some parasites and their chromosomes. *J. Parasitol.* 45: 1–20.
- Wang GH, Luo JL, Wang ZX, 1989. Comparative studies on the karyotypes of three species of nematodes in the genus Neopilectana. *Zool. Res.* 10 (1): 71–77 (In Chinese).
- Wei JZ, Hale K, Cata L, Platzer E, Wong C, Fang SC, Aroian RV, 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *PNAS* 100: 2760–2765.
- White MJD, 1973. *Animal Cytology and Evolution*, 3rd edn. New York: Cambridge University Press.
- Yeates GW, Bongers T, 1999. Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 113–135.
- Yue KZ, Chen X, Sun XS, 2005. Effects of ovary storage temperature on chromatin configuration and in vitro maturation of porcine oocytes. *Acta Zool. Sinica* 51 (5): 919–923 (In Chinese).
- 董迎辉, 林志华, 紫雪良, 陆荣茂, 肖国强, 2007. 文蛤受精及早期胚胎发育的细胞学观察. *动物学报* 53 (4): 700–709.
- 唐仲璋, 唐崇惕, 1987. *人畜线虫学*. 北京: 科学出版社.
- 王国汉, 罗俊烈, 王正询, 1989. 新线虫属三个种的核型比较研究. *动物学研究* 10 (1): 71–77.
- 岳奎忠, 陈新, 孙兴参, 2005. 猪卵巢体外保存温度对卵母细胞染色质构型和成熟能力的影响. *动物学报* 51 (5): 919–923.

图 版 说 明

图版 iv

1. *D. veechi* 雌虫生殖腺示意图, 解剖后得到方框所示部分。
2. 干涉显微镜下解剖出的 *D. veechi* 雌虫生殖腺, 从左至右为生殖腺由顶端向末端延伸, 黑色三角形指示受精囊 $\times 400$ 。
3. 荧光显微镜下解剖出的 *D. veechi* 雌虫生殖腺, 可分为有丝分裂区、细线期和偶线期区 (过渡区)、粗线期区、双线期区、丝球期区, 白色三角形指示生殖腺外鞘膜细胞核 $\times 400$ 。
4. 黑色三角形指示生殖腺顶端的单个顶端细胞 $\times 1000$ 。
5. 白色三角形指示受精囊由 6 对细胞构成, 箭指示受精囊腔内所含精子。受精囊前后两端分别由一对细胞与生殖腺外鞘和子宫相连, 箭头指示子宫 $\times 1000$ 。
6. 有丝分裂区细胞核呈中间黯淡, 周围明亮的环状; 白色三角形指示有丝分裂中期的细胞核, 其细胞核明亮而集中。
7. 细线期细胞染色体偏向核的一边, 细胞核呈弯月状, 黑箭指示处于细线期的细胞核 $\times 1000$ 。
8. 粗线期细胞染色体缩短, 细胞核呈分散细杆状 $\times 1000$ 。
9. 双线期卵母细胞从生殖轴上脱落并增大, 白色三角形指示正从生殖轴上脱落的一个卵母细胞 $\times 1000$ 。

图版 ㉓

1. 卵母细胞经双线期进入丝球期, 卵母细胞排列成单行, 细胞内的染色体更加浓缩, 可见六个二价体 $\times 1000$ 。
2. 双线期细胞核内, 同源染色体分离的交叉点端化后所形成的 V 形或杆形二价体, 可见 3 个 V 形二价体和 3 个杆形二价体 $\times 1000$ 。
3. 丝球期细胞核内, 染色体极度浓缩, 依然可以识别呈 8 字形的同源染色体对 $\times 1000$ 。
4. 受精, 白箭示卵原核, 黑箭示精原核 $\times 1000$ 。
5. 白箭示卵原核移向细胞膜, 白色三角形示由卵原核产生的第一个极体, 极体排出卵母细胞 $\times 1000$ 。
6. 完成减数分裂的卵细胞含六条染色体, 白箭示卵细胞核, 两个白色箭头分别示一个极体 $\times 1000$ 。
7. 受精后产生的合子核排列在赤道板上, 进入第一次卵裂中期 $\times 1000$ 。
8. 姐妹染色单体分开 $\times 1000$ 。
9. 单细胞胚胎, 含 6 对染色体 $\times 1000$ 。
10. 二细胞胚胎染色体, 含 11 条染色体 $\times 1000$ 。
11. 有丝分裂前中期的 6 对染色体组型图 $\times 1000$ 。
12. 雄虫生殖腺示意图, 解剖后得到方框内所示生殖腺 $\times 1000$ 。
13. 干涉显微镜下的雄虫生殖腺 $\times 400$ 。

图版 ㉔

1. 荧光显微镜下的雄虫生殖腺, 可分为有丝分裂区, 细线期区, 粗线期区, 双线期和丝球期区 (生长区), 最后部分为储存精细胞的储精囊 $\times 400$ 。
2. 生殖腺顶端, 两个白箭分别指示一个顶端细胞, 白色三角形指示生殖轴, 明亮环状的有丝分裂期精原细胞核围绕生殖轴排列 $\times 1000$ 。
3. 白箭指示细线期精母细胞染色体偏向核的一边, 呈弯月状 $\times 1000$ 。
4. 粗线期的细胞核成分散细杆状 $\times 1000$ 。
5. 黑色三角形指示生长区的双线期精母细胞从生殖轴上脱落, 并逐渐增大至丝球期, 完成减数分裂, 形成精细胞储存于储精囊中 $\times 1000$ 。
6. 白箭示丝球期精母细胞的六个二价体, 白色三角形指示精细胞核 $\times 1000$ 。
7. 含 5 条染色体的精细胞 $\times 1000$ 。
8. 含 6 条染色体的精细胞 $\times 1000$ 。

Explanation of Plates

Plate iv

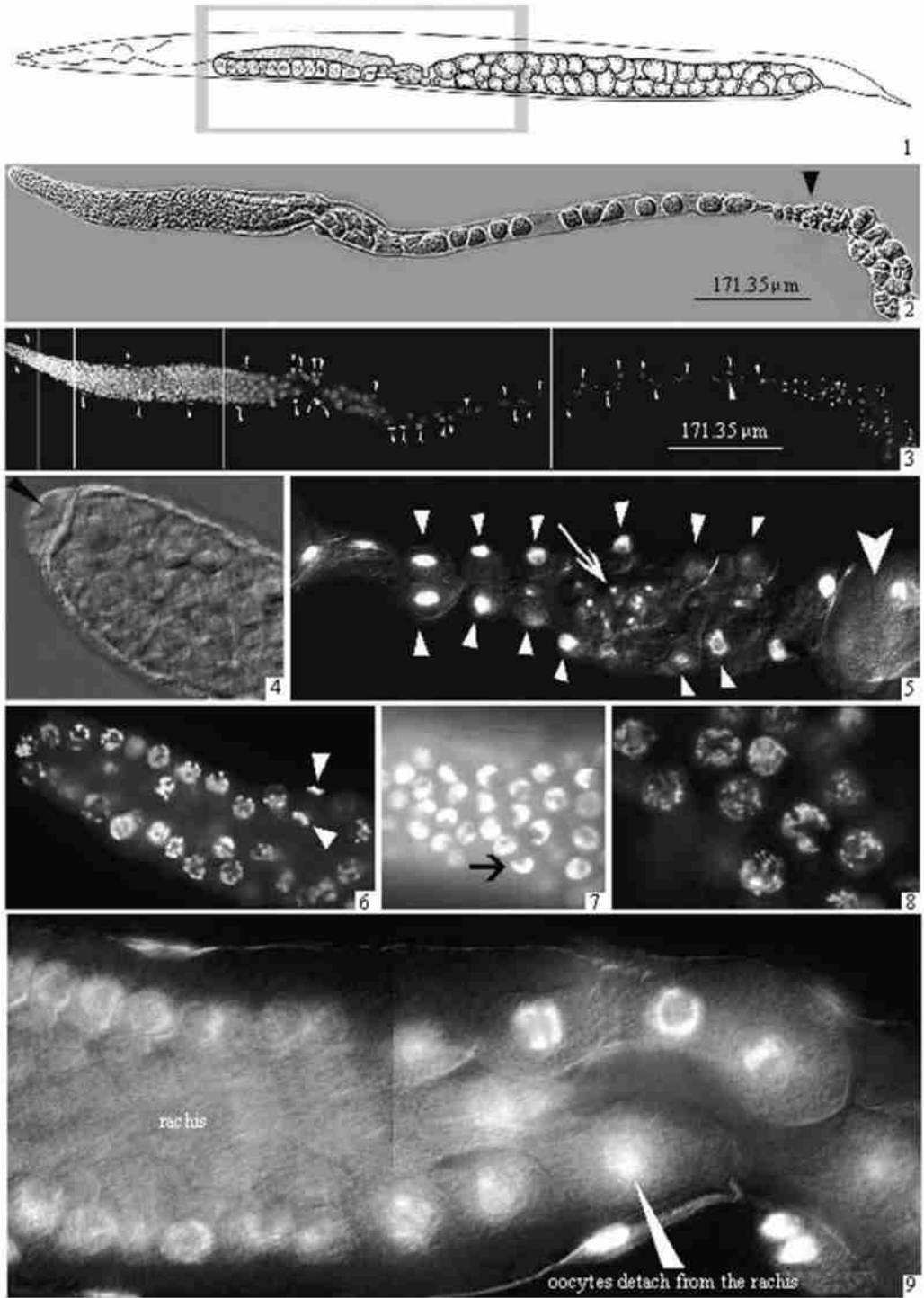
1. Sketch map of the female reproductive system in *D. veechi*.
2. Interference microscopy of the *D. veechi* female germ line which exhibits distal to proximal polarity. Black triangle indicates the spermatheca $\times 400$.
3. The germ line can be divided into regions based upon the state of DNA in the nuclei visualized by DAPI in situ staining of dissected adult gonadal arm: a mitotic zone, a transition zone between mitosis and meiosis, a pachytene zone, and a diplotene and diakinesis zone (growth zone). White triangles indicate nucleus of gonadal sheath $\times 400$.
4. Black triangle indicates the single distal tip cell at the tip of the gonad $\times 1000$.
5. Spermatheca is composed of 12 cells which are indicated by white triangles organized into two regional groups with sperms in the lumen. Arrow indicates sperms in the spermatheca. The spermatheca is connected with gonadal sheath and uterus by two cells respectively. Arrowhead indicates uterus $\times 1000$.
6. In the mitotic zone, most nuclei have a hazy fluorescence in the center and brighter circumferential staining. White triangle indicates M-phase nuclei which can be distinguished from the rest of the cell cycle $\times 1000$.
7. Nuclei of germ cells entering leptotene are condensed and crescent-shaped. Black arrow indicates one nuclei in leptotene $\times 1000$.
8. Pachytene nuclei are characterized by a distinctive "bowl of spaghetti" morphology $\times 1000$.
9. Cells in diplotene detached from the rachis and gradually grew. White triangle indicates an oocyte detaching from the rachis $\times 1000$.

Plate ㊦

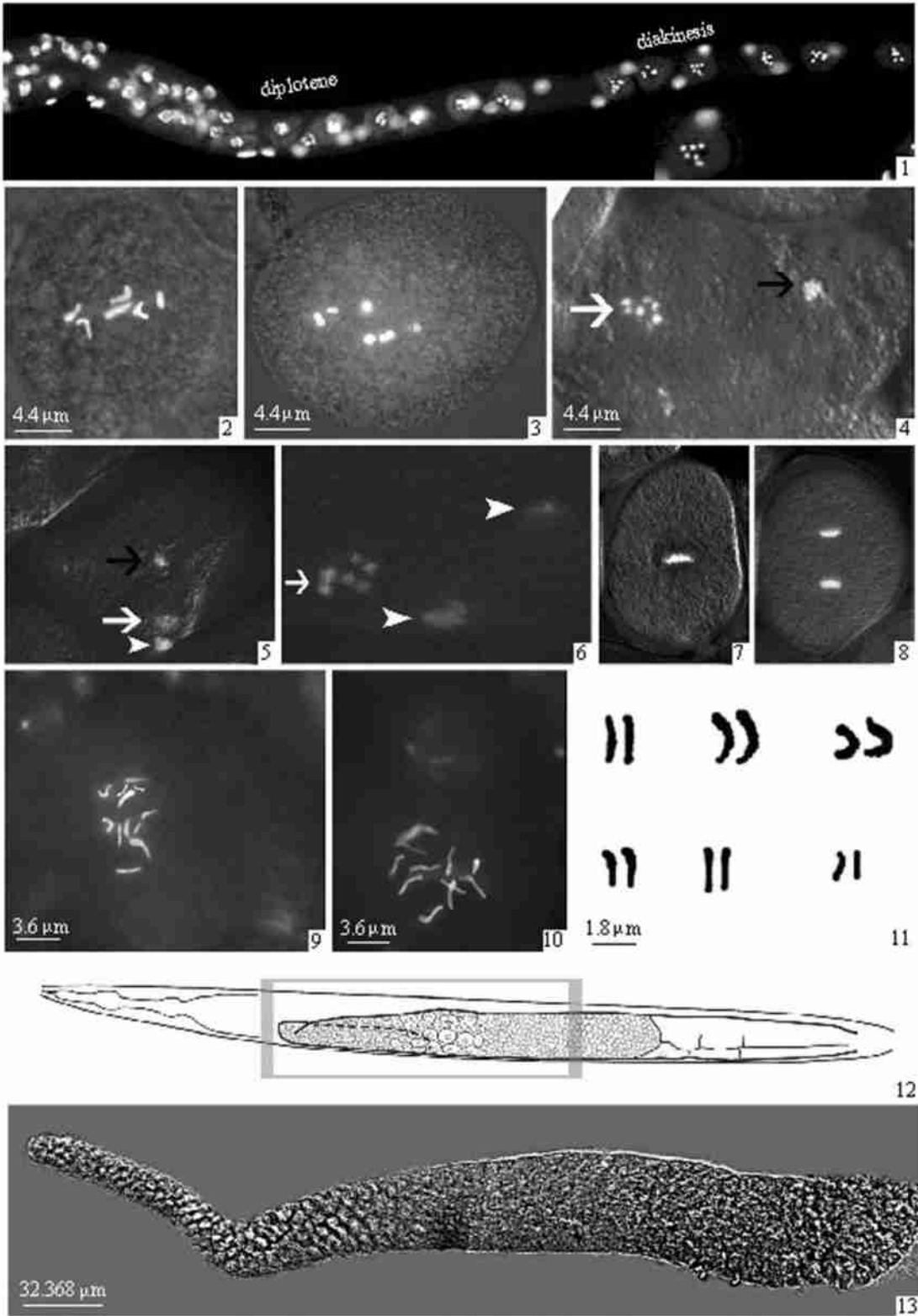
1. After moving through the diplotene, germ cells progress into diakinesis and become organized in single file. Six bivalents become more apparent $\times 1000$.
2. As the result of terminalization, three bivalents show V-shape and others show bacilliform shape in diplotene cells $\times 1000$.
3. Chromosomes are even more condensed and formed 8-shaped bivalents in diakinesis stage $\times 1000$.
4. After fertilization. White arrow indicates female pronuclear, black arrow indicates male pronuclear $\times 1000$.
5. White arrow indicates female pronuclear moved to the cell membrane. White triangles indicates the first polar body which located at the out side of the oocyte $\times 1000$.
6. Haploid female pronuclear contains six chromosomes indicated by white arrow. Two white arrowheads indicate one polar body respectively $\times 1000$.
7. M-phase of the first embryonic cleavage $\times 1000$.
8. Separating of chromatids $\times 1000$.
9. One cell stage embryo with 12 chromosomes $\times 1000$.
10. Two cells stage embryo with 11 chromosomes $\times 1000$.
11. Karyotype of mitotic prometaphase with six pairs of chromosomes $\times 1000$.
12. Sketch map of the male reproductive system in *D. veechi*. The gonadal arms indicated by the quadrate frame will squeeze outside of the carcass after dissection $\times 1000$.
13. Interference microscopy of the *D. veechi* male germ line which exhibits distal to proximal polarity $\times 400$.

Plate ㊧

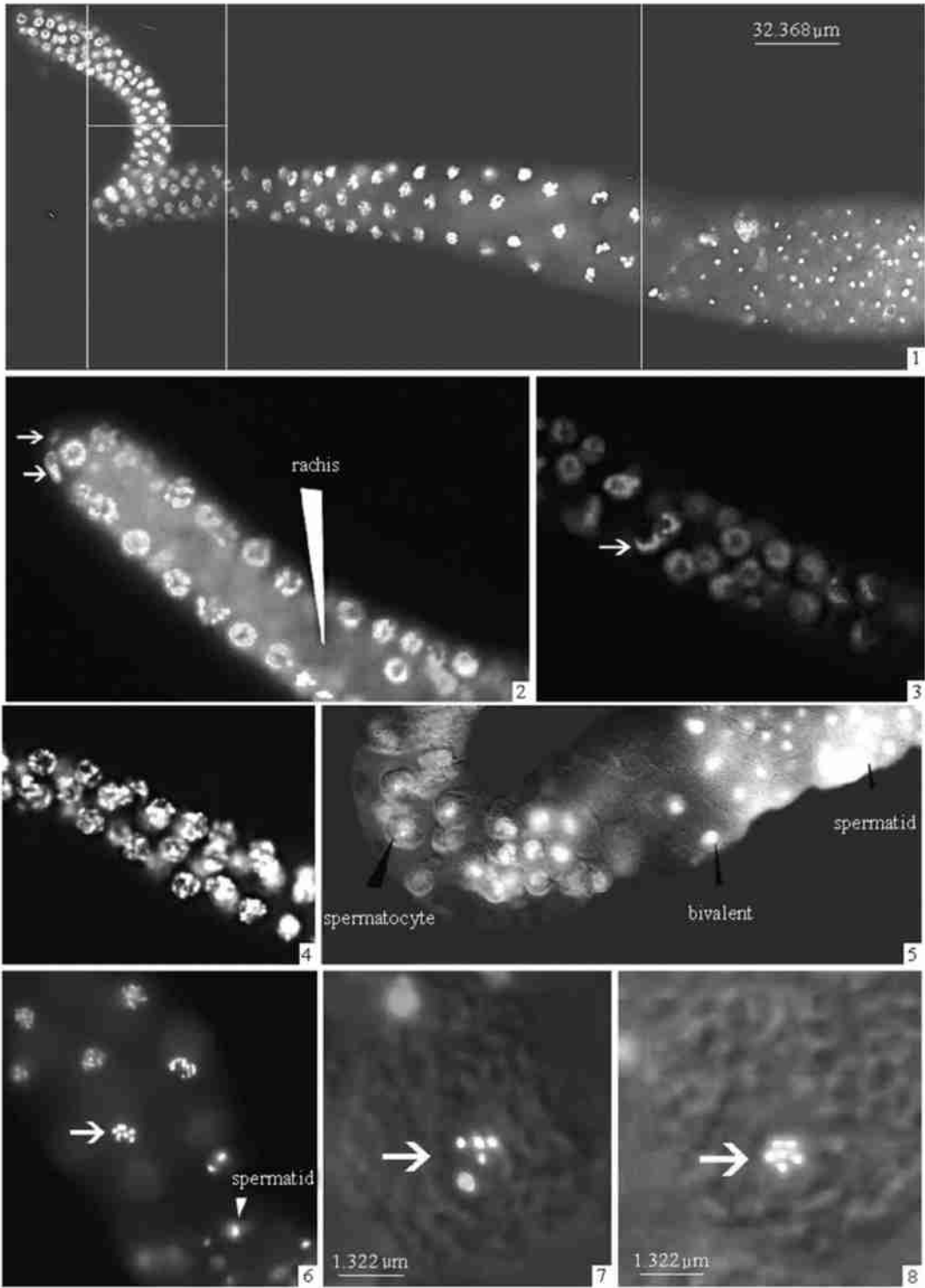
1. The male germ line can be divided into regions based upon the state of DNA in the nuclei visualized by DAPI in situ staining of dissected adult gonadal arms: a mitotic zone, a leptotene and zygotene zone between mitosis and meiosis, a pachytene zone, a diplotene and diakinesis zone (growth zone), and the last was deference with a large number of sperms in it $\times 400$.
2. Two white arrows indicate a polar body respectively. White triangle indicate the rachis. Germ cells have incomplete borders and are connected to one another via the rachis $\times 1000$.
3. Nuclei of germ cells entering leptotene are condensed and crescent-shaped. White arrow indicates one nuclei in leptotene $\times 1000$.
4. Pachytene nuclei are characterized by a distinctive "bowl of spaghetti" morphology $\times 1000$.
5. After pachytene, the spermatocytes detached from the rachis and complete meiosis generating haploid spermatids which stored in the seminal vesicle $\times 1000$.
6. White arrow indicates six bivalents of a spermatocyte in diakinesis. White triangle indicates a spermatid nucleolus $\times 1000$.
7. Spermatid with 5 chromosomes $\times 1000$.
8. Spermatid with 6 chromosomes $\times 1000$.



图版说明见文末 (Explanation at the end of the text)



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)