

四川六种蛙染色体组型的比较研究

陈文元 王子淑 王喜忠 杨玉华 孙启玲*

(四川大学生物系细胞研究室)

大多数两栖类物种的染色体较长大,数目较少,是细胞遗传学,细胞工程学,发育生物学等研究的好材料。两栖类在进化地位上介于水生脊椎动物和陆生脊椎动物之间,因此,进行两栖类染色体的比较研究,对于探讨和认识动物的系统演化具有一定的意义。

有关无尾两栖类染色体组型的研究,国外已有不少报道 (Benirschke et al., 1973; Bogart, 1968; Guillemmin, 1967; Haertel, 1974; Schmid, 1978a, 1978b), 国内吴政安 (1978, 1981; 吴政安等, 1980, 1981) 李树深等 (1981) 作了几种蛙的染色体组型研究。

近来,我们利用四川采集的六种蛙进行了染色体组型的比较研究。其中除日本林蛙外,其它五种蛙迄今尚未见有报道。Seto (1965) 曾作过日本林蛙的染色体组型研究,但中国产的日本林蛙尚无报道。

材料与方 法

实验动物取自四川的峨眉山、乐山及成都市近郊龙泉驿、狮子山等地,共六种,棘腹蛙 *Rana boulengeri* Günther (4 ♀, 4 ♂); 日本林蛙 *R. japonica japonica* Günther (5 ♀, 3 ♂); 沼蛙 *R. guentheri* Boulenger (4 ♀, 2 ♂); 弹琴蛙 *R. adenopleura* Boulenger (4 ♀, 7 ♂); 绿臭蛙 *R. marqaratae* Lin (3 ♀, 3 ♂); 饰纹姬蛙 *Microhyla ornata* (2 ♀, 1 ♂)。

染色体标本制备按 Schmid (1978a) 的方法略加改变。有丝分裂染色体直接来自骨髓细胞的制片。

染色体标本制片用 Giemsa 磷酸缓冲液 (2:10 pH6.8), 染色15—20分钟, 自来水细流冲洗数秒, 空气干燥。在显微镜下选择伸展好, 重叠少, 数目全的中期分裂相进行拍照。各种蛙分析的细胞数: 棘腹蛙65个, 日本林蛙135个, 沼蛙65个, 弹琴蛙76个, 绿臭蛙89个, 饰纹姬蛙29个。每种蛙选择8—10个细胞放大和测量, 统计、分组、编号, 进行核型分析。相对长度以每条染色体的长度占单倍染色体总长的百分值表示。臂比指数

* 本室张亦、张兵参加此项工作。

本文1981年12月20日收到。

以长臂/短臂的比值表示。按Levan (1964) 的计算标准确定染色体着丝粒的位置。臂比指数1.0—1.7为中部着丝粒染色体 (m), 1.7—3.0为亚中部着丝粒染色体 (sm), 3.0—7.0为亚端着丝粒染色体 (st), 指数>7.0为端着丝粒染色体。

Ag—As染色技术, 按照Bloom等 (1976) 的Ag—I染色法。

结 果

(一) 蛙属各个种的染色体组型

迄今在蛙属已查明染色体数目的约有30余种 (倉本满等, 1970)。其中, 大多数种类的二倍染色体数目为 $2n=26$, 一般由5对大型染色体和8对小型染色体组成, 这似乎已成为蛙属的基本染色体组型。本文试验所用蛙属五个种的染色体组型, 亦是如此 (表1和2; 图1 a和b)。

(1) 按相对长度可把它们分为三组

I组 即第1对染色体, 是这些组型中最长的中部着丝粒染色体。

II组 包括第2—5对染色体。

这四对大型染色体在五种蛙中差异不大, 均为中和亚中着丝粒染色体。

III组 包括第6—13对染色体。

除第7、11、12号染色体的着丝粒位置在日本林蛙、棘腹蛙、绿臭蛙之间略有差异外, 其它各对染色体五种蛙均相似, 为中部和亚中部着丝粒染色体。

各种蛙的染色体类型可简式为日本林蛙 $7m+5sm+1st$; 棘腹蛙 $10m+3sm$; 绿臭蛙 $8m+5sm$; 弹琴蛙 $8m+5sm$; 沼蛙 $9m+4sm$ 。

弹琴蛙第8、9、10、11、12; 绿臭蛙第7、9、12、13; 沼蛙第11、12号染色体短臂有时可见随体。

(2) 次缢痕 (图2)

由于五种蛙的染色体组型相似, 而染色体次缢痕的数目、大小、位置随蛙种不同均有较大变化, 因此, 将次缢痕作为细胞分类学区分种之间和亚种之间的重要标准是十分有意义的, 下面以字母A—O代表各个种次缢痕的位置, 字母A—L (O, 即often) 代表经常、反复出现次缢痕的位置, A—O (V, 即Variable) 表示此位置次缢痕变化的频率较大。各种蛙次缢痕的位置和变化情况列于后:

日本林蛙为F (V); 棘腹蛙为C (O); 绿臭蛙为A (V)、B (V)、C (V)、D (V)、E (V)、G (V)、H (V)、J (V)、L (O)、M (V)、O (V); 弹琴蛙为D (V)、E (V)、G (V)、H (O)、I (V)、J (V)、L (V)、N (V); 沼蛙为B (O)、F (O)、K (O)。可见沼蛙经常、反复出现次缢痕的位置较多, 而弹琴蛙、绿臭蛙位置变化不定的次缢痕多, 变化频率大。

(3) 蛙属中五种蛙染色体单倍体的绝对长度比较 (图4)

除棘腹蛙数值较低外, 其余各种蛙之间绝对长度差异不大。

(4) 蛙属26条染色体的设想模式组型图 (图2)。

从形态学的观点看, 蛙属不同种之间的组型是十分相似的。为了便于讨论, 据

表1 相对长度 (± S、D) 和臂比指数 (± S、D)

染色体组数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
日本林蛙	15.5±0.59	12.9±0.45	11.8±0.45	11.0±0.38	9.8±0.89	6.0±0.22	5.4±0.27	5.3±0.21	5.0±0.15	4.6±0.13	4.5±0.16	4.3±0.18	4.0±0.19
棘腹蛙	15.9±0.45	12.7±0.43	11.3±0.63	10.6±0.45	9.6±0.64	6.0±0.36	5.6±0.13	5.5±0.14	5.0±0.15	4.8±0.20	4.7±0.23	4.4±0.30	4.0±0.36
绿臭蛙	15.0±0.85	12.2±0.37	11.1±0.64	10.9±0.46	10.0±0.66	6.3±0.39	6.0±0.28	5.8±0.31	5.6±0.23	4.8±0.47	4.6±0.36	4.3±0.34	3.7±0.35
弹琴蛙	15.0±0.94	12.4±0.79	11.1±0.63	10.9±0.45	9.2±0.71	6.1±0.24	5.9±0.22	5.7±0.31	5.4±0.31	5.1±0.27	4.9±0.28	4.6±0.39	4.1±0.41
沼蛙	14.8±1.23	12.1±0.39	11.3±0.16	10.5±0.25	9.5±0.66	6.3±0.25	5.8±0.25	5.4±0.31	5.2±0.24	5.1±0.24	4.8±0.21	4.6±0.16	4.4±0.24
饰纹姬蛙	14.7±0.28	12.4±0.66	11.6±0.44	11.1±0.39	9.3±0.36	8.4±0.33	6.3±0.28	5.9±0.17	5.8±0.23	5.5±0.29	5.3±0.39	4.6±0.29	
日本林蛙	1.2±0.11	1.7±0.16	2.1±0.32	1.5±0.20	1.3±0.09	1.5±0.15	3.0±0.74	1.4±0.22	2.1±0.42	1.3±0.21	1.7±0.29	1.8±0.39	1.4±0.26
棘腹蛙	1.2±0.09	2.0±0.05	2.0±0.30	1.6±0.25	1.4±0.13	1.4±0.20	1.5±0.18	1.2±0.08	1.9±0.41	1.2±0.15	1.3±0.30	1.3±0.31	1.2±0.14
绿臭蛙	1.3±0.14	1.8±0.42	2.0±0.36	1.4±0.27	1.2±0.12	1.2±0.14	2.5±0.44	1.2±0.10	2.3±0.32	1.3±0.20	1.4±0.21	1.8±0.27	1.5±0.27
弹琴蛙	1.2±0.13	1.6±0.34	1.9±0.41	1.5±0.30	1.5±0.53	1.2±0.33	2.9±0.47	1.2±0.15	2.3±0.44	1.2±0.18	1.7±0.37	1.8±0.47	1.3±0.20
沼蛙	1.3±0.16	1.7±0.17	2.0±0.14	1.3±0.16	1.3±0.16	1.2±0.11	1.3±0.20	1.3±0.24	2.9±0.47	1.4±0.42	1.3±0.15	1.8±0.23	1.4±0.15
饰纹姬蛙	1.2±0.04	1.3±0.16	2.7±0.36	1.4±0.13	1.3±0.15	1.2±0.06	1.6±0.27	1.5±0.30	1.6±0.21	1.3±0.09	1.4±0.33	1.2±0.05	

表2 染色体类型

种名	染色体号数												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
日本林蛙	m	S m	S m	m	m	m	S t	m	S m	m	S m	S m	m
棘腹蛙	m	S m	S m	m	m	m	m	m	S m	m	m	m	m
绿臭蛙	m	S m	S m	m	m	m	S m	m	S m	m	m	S m	m
弹琴蛙	m	m	S m	m	m	m	S m	m	S m	m	S m	S m	m
沼蛙	m	S m	S m	m	m	m	m	m	S m	m	m	S m	m
饰纹姬蛙	m	m	S m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

Tymowska(1977)的方法绘制了一个兼有五种蛙共同特征的26条染色体的设想模式图。

(二) 饰纹姬蛙的染色体组型〔表1和2; 图1b, 3、4〕

饰纹姬蛙的染色体组型与蛙属五个种有显著不同, $2n=24$, 由6对大型染色体和6对小型染色体所组成, 尽管饰纹姬蛙比蛙属的五个种少两条染色体, 但由于它多一对大型染色体, 所以染色体单倍体的绝对长度仍与蛙属的日本林蛙、绿臭蛙、弹琴蛙、沼蛙差不多。

蛙属五个种和饰纹姬蛙, 两性间核型比较未见形态差异, 雌雄个体之间, 亦均未发现异型染色体存在。

讨 论

(一) 本文所分析的蛙属五个种的染色体数目、大小和形态都非常一致, 核型极为相似。从形态看、各物种的染色体次缢痕在形态、数目和分布位置上也多属于易变不定的〔图2、4〕。在某些无尾两栖类的物种中, 可观察到染色体着丝粒的合并和分裂, 这被认为是一种最主要的物种进化的机制, 而在蛙属物种的演化中, 这种染色体重组并不明显。很可能在蛙属中以基因突变形式的演化速度远大于染色体重组形式的演化速度, 而基因突变形式的演化又难于用相对长度和臂比指数等形态特征的参数来发现。因此, 在研究蛙属物种的核型演化中, 必须考虑次缢痕的数目、形态和位置等特征。

Tymowska(1977)认为不同爪蟾种的染色体的总长度略有差异, 是由于异染色质含量不同。在本文所研究的蛙属五个种中亦存在这种差异。

(二) 次缢痕与核仁组织者区(NORs)

在染色体组型分析及研究中, 次缢痕和核仁组织者区受到了普遍地重视。Bogart(1968)主张将次缢痕作为染色体的有效形态学特征。Haertel等(1974)认为次缢痕与核仁组织者区有等同的意义。Schmid(1978a,b)认为NOR的数目和位置在不同种、属之间具有显著差异。据我们实验观察, 次缢痕的出现一般有两种情况: 一是在某些染色体上次缢痕出现的位置固定不变, 并常常是NOR的位置; 另一种情况是某些染色体上次缢痕的出现或位置随个体差异及培养细胞的组织来源不同而变化, 甚至受制片及培养条

件的影响,这种情况出现次缢痕的位置往往不是NOR的位置,如像弹琴蛙、绿臭蛙出现这种变化不定的次缢痕就比较多。本实验所研究的沼蛙有三对染色体具次缢痕,但一般只有第7对染色体的长臂上的次缢痕区才是NOR的位置[图5]。

据Seto(1965),日本林蛙次缢痕出现在第7对染色体的长臂上,而我们实验观察结果,只有少数个体第7对染色体长臂上具次缢痕,而多数个体次缢痕不明显。用Ag-As技术染色表明,NOR位于第11对染色体的长臂末端[图5],而不是在第7对染色体长臂上。Schmid(1978b)和李树深(1981)等人的研究指出,蛙属绝大多数物种在第10对染色体长臂上显现次缢痕(此号染色体我们定为11对),Schmid认为这是它们长期演化中保存下来的,具有较大的保守性,因此有一定的标志意义。本实验所得结果不完全如此,在蛙属五个种中,除绿臭蛙第11对染色体长臂比较恒定地显现次缢痕外,其它四种蛙的次缢痕在此位置上均不显现,弹琴蛙在第11对染色体长臂上偶有显现,但不恒定。如果按Tymowska(1977)的意见,认为具有相同NOR者为近缘种,而具有独特NOR者,它们之间就少有直接关系。那么,我们所研究的蛙属五个种中,它们之间基本上不具有直接的亲缘关系。

综上所述,本文认为NOR一般出现在某些染色体固定不变显现次缢痕的位置上,反过来,固定不变显现次缢痕的位置又不一定都是NOR的位置。考虑到染色体多态性,正常情况下也有可能容易导致易变的次缢痕出现,因此次缢痕与NOR之间并非严格地一对一的对应关系,也是理所当然的。尽管如此,由于多数情况下,次缢痕与NOR之间,基本上存在着非严格地对应关系,因此在一定程度上,仍然可以将它们作为细胞分类学一个有用的形态学标记。

(三)关于林蛙群的问题。林蛙群在欧亚大陆是广泛分布的。刘承钊和胡淑琴(1961)指出,我国的林蛙类群比较复杂,在我国无尾两栖类的分类中是尚待解决的问题。Guillemin(1967)报道欧洲林蛙 $2n=26$,并发现异染色质性的1—4超数染色体。Schmid(1978b)亦发现林蛙有1个超数染色体,其长臂为结构异染色质,第10对染色体长臂有次缢痕。李树深等人报道昭觉林蛙 $2n=26$, $9m+3Sm+1st$, $10ph$,未发现有超数染色体。Seto(1965)曾报道过日本林蛙为 $2n=26$, $4m+8Sm+1st$, $7qh$ 。本文实验结果是 $2n=26$, $7m+5Sm+1st$, $7qh$ (多数个体不明显),所得结果与Seto的略有差异。根据各作者得到的结果说明欧洲林蛙、昭觉林蛙和日本林蛙是有不同的。从形态上昭觉林蛙的成蛙与日本林蛙不易区别,而两种蝌蚪的差异极为显著。昭觉林蛙下唇齿为四排,日本林蛙的则为三排,刘承钊和胡淑琴(1961)将昭觉林蛙作为日本林蛙的一个亚种。根据李树深、Seto和我们得到的结果可以认为,从细胞学的水平亦是可把两种蛙区分开的。

根据Seto(1965)报告日本林蛙第7号长臂具次缢痕,而我们研究的日本林蛙多数个体第7号长臂次缢痕不明显,用Ag-As技术染色证明NOR在第11号染色体的长臂末端[图5]。可否认为欧洲产的日本林蛙和我国南方产的日本林蛙由于环境改变,在长期的遗传进化中,第7号染色体长臂次缢痕的位置发生断裂与第11号染色体的长臂发生相互易位,而将第7号染色体长臂上的NOR易位到了第11号染色体的长臂末端,以致我们所见多数个体的第7号染色体的次缢痕不显著。

参 考 文 献

- 刘承制 胡淑琴 1961 中国无尾两栖类。科学出版社。
 吴政安 1978 动物学报, 24(2):117—126。
 吴政安 1981 遗传学报, 8(2):138—144。
 吴政安 杨慧一 1980 动物学报, 26(1):18—23。
 吴政安 杨慧一 1981 动物学报, 27(1):106。
 李树深等 1981 动物学研究, 2(1):17—24。
 倉本清、手島玲子 1970 *Bulletin of Fukuoka University of Education* 20. Part 111, 99—104。
 Benirschke, K. and T. S. Hsu 1973 *Chromosome Atlas: Fish, Amphibians, Reptiles and Birds*. Vol. 2
 Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York。
 Bogart, J. P. 1968 *Evolution* (Lawrence Kans), 22:42—45。
 Bloom, S. E. and C. Goodpasture 1976 *Hum. Genet.*, 34:199—206。
 Guillemin, C. 1967 *Chromosoma* (Berl), 21(2):189—197。
 Hsertel, J. P. 1974 *Copeia*, 1:109—114。
 Levan, A. et al. 1964 *Hereditas*, 52:201—220。
 Schmid, M. 1978a *Chromosoma*, 66(4):361—388。
 Schmid, M. 1978b *Chromosoma*, 68(2):131—148。
 Seto, T. 1965 *Cytologia*, 30(4):437—446。
 Tymowska, J. 1977 *Cytogenet. Cell Genet.*, 18:165—181。

A COMPARATIVE STUDY OF THE KARYOTYPES FROM SIX SPECIES OF FROGS IN SICHUAN

Chen Wenyuan Wang Zisu Wang Xizhong Yang Yuhua Sun Qiling

(Department of Biology, University of Sichuan, Chengdu)

A comparative study of the karyotypes was undertaken in six Amphibian species—*Rana Boulengeri* Gunther, *R. japonica japonica* Gunther, *R. guentheri* Boulenger, *R. adenopleura* Boulenger, *R. margaratae* Lin and *Microhyla ornata* based on current technique with adult bone marrow cells. Five species of Genus *Rana* presented in this paper possess 26 chromosomes, including 5 pairs of large chromosomes and 8 pairs of small chromosomes, whereas the diploid chromosome number of *Microhyla ornata* is 24 ($2n=24$) including 6 pairs of large chromosomes and 6 pairs of small ones. The chromosomes had been measured and arranged into 3 groups according to their size and centromere positions. The number, morphology and localization of secondary constrictions varies remarkably among these species analyzed in this paper. By comparing the chromosomes bearing secondary constriction, an attempt was made to establish the cytotaxonomic relationships. The secondary constriction shows polymorphism both within a certain species and between different species. The nucleolar organizer regions (NORs) often appear in the standard secondary constrictions, with the exception of a few NORs. The total absolute length of the chromosome complements shows slight variation among the different *Rana* species. It is probably due to a variable amount of heterochromatin.

Comparison of the karyotypes in both sexes demonstrated no significant morphological difference, no heteromorphic pair have been detected either in males or in females.

陈文元等：四川六种蛙染色体组型的比较研究

Chen Wenyuan et al.: A Comparative Study of the Karyotypes from Six Species of Frogs in Sichuan

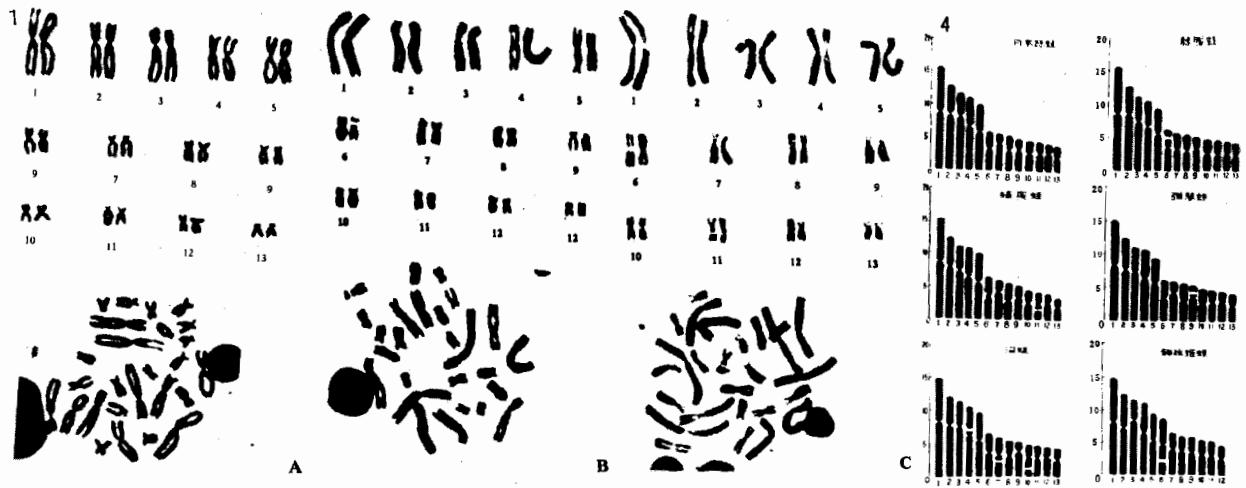


图1.日本林蛙(A)、棘腹蛙(B)、绿臭蛙(C)、弹琴蛙(D)、沼蛙(E)、饰纹姬蛙(F)的核型。

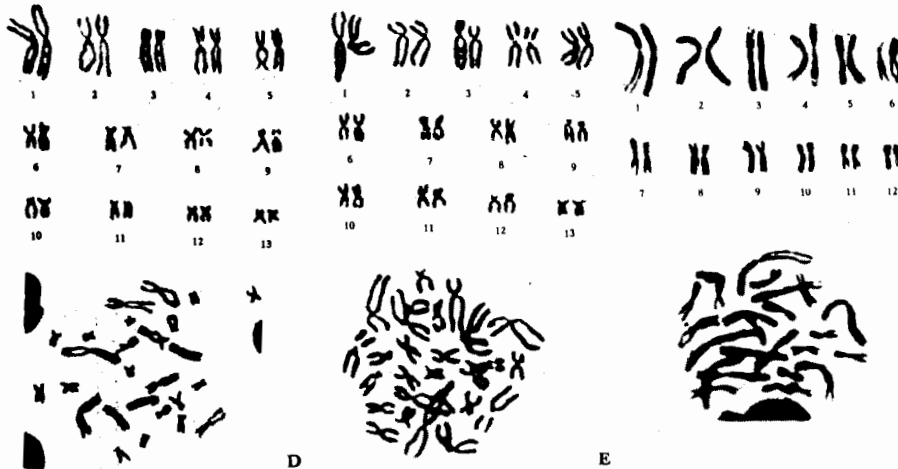


图2.按蛙属五种蛙染色体的相对长度和臂比指数绘制的共有的26条染色体的设想模式组型图。

A—O 示次缢痕的位置。

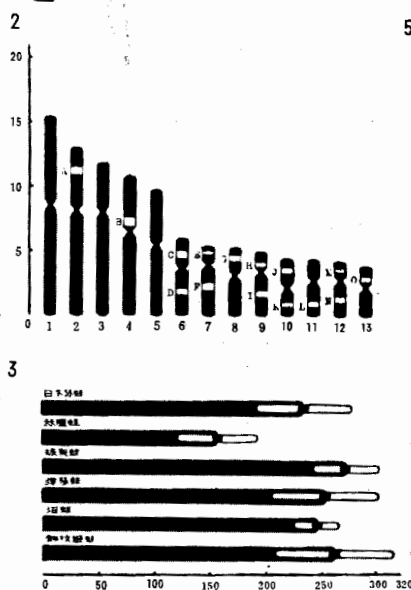


图3.日本林蛙(平均值 = 237.33 ± 44.05), 棘腹蛙(平均值 = 156.48 ± 36.08), 绿臭蛙(平均值 = 272.76 ± 29.26), 弹琴蛙(平均值 = 253.83 ± 48.53), 沼蛙(平均值 = 245.56 ± 21.18), 饰纹姬蛙(平均值 = 259.14 ± 54.69) 单倍体绝对长度之比较。□·○示标准差(S、D)。

图4.日本林蛙、棘腹蛙、绿臭蛙、弹琴蛙、沼蛙、饰纹姬蛙的染色体的模式组型。

图5.日本林蛙和沼蛙的核型, 表示核仁组织者区(NOR)的位置