

## 四种无尾两栖类 染色体组型的比较研究

李树深 王应祥 李崇云 王蕊芳 刘光佐

(中国科学院昆明动物研究所)

### 摘 要

本文报道了四种无尾两栖类——*Rana pleuraden* Boulenger, *R. catesbeiana* (Shaw), *R. japonica chaochiaoensis* Liu和*Hyla annectans* (Jerdon)的染色体组型。采用秋水仙素—低渗—空气干燥法制作染色体标本。用骨髓及肠管作实验材料。蛙属(*Rana*)的三个种,  $2n=26$ , 由5对大型染色体、8对小型染色体组成, 都是中部或亚中部着丝点染色体, 而无端部或亚端部着丝点染色体。他们共有一对亚中部着丝点染色体, 即第三对染色体。以上两点表明其染色体演化上的同源性。但是, 三者之间亦有明显的差异。滇蛙的次缢痕仅出现在第十对染色体的长臂上; 而牛蛙, 除此之外, 在第七、八两对染色体的短臂上有之; 而昭觉林蛙则有三个以上的次缢痕, 而且长臂次缢痕不在第十对, 而在第七、第八对染色体上, 且有三对随体, 第十对染色体的次缢痕是在短臂上。

华西雨蛙的 $2n=24$ , 亦可分成二群: 5对大型染色体为一群, 7对小型染色体为另一群, 次缢痕出现在第九对染色体的长臂上。

动物染色体组型的比较研究, 对于探讨动物的分类及其演化有一定意义。研究各种动物的染色体数目、组型、带型及其相互之间的关系, 是细胞学和分类学相互渗透形成的边缘学科——细胞分类学的基本内容, 而染色体组型的研究是细胞分类学最基础的工作之一。有关无尾两栖类染色体组型和带型的研究, 国外已有不少报道(Morescalichi, 1973; Schmid, 1978; Scheel, 1973)。但国内仅报道过金线蛙和中华大蟾蜍两种(吴政安, 1978)。为此, 我们报道另外四种无尾两栖类的染色体组型。

## 材料及方法

实验材料为四种蛙类即滇蛙 *Rana pleuraden* Boulenger 2♂♂, 2♀♀; 牛蛙 *R. catesbeiana* (Shaw) 1♂, 2♀♀; 昭觉林蛙 *R. japonica chaochiaoensis* Liu 2♂♂, 4♀♀以及华西雨蛙 *Hyla annectans* (Jerdon) 1♂, 1♀。动物捕自昆明西郊。

染色体标本的制片系采用广泛应用的空气干燥法。取材前3—8小时, 按体重10—15微克/克的剂量腹腔注射秋水仙素溶液。所用材料是骨髓和肠组织。肠组织需用剪刀剪成碎块。材料直接投入0.4% KCl 溶液中低渗20—30分钟, 然后离心(800—1000转/分), 弃其上清液。再用甲醇与醋酸3:1比例的固定液固定15分钟, 重复固2—3次。最后用1/10 Giemsa液染色30—40分钟。

染色体标本制成后, 在油镜下计数50个以上的中期分裂细胞, 得出该物种的二倍体数目。然后选择10个优良的中期分裂相进行拍照、放大和测量, 并进行臂比指数、相对长度的测算, 按染色体的相对长度分组排队。着丝点位置的确定按Haertel et al. (1974) 的标准计算, 即: 臂比指数1.0—1.7为中部着丝点, 1.7—3.0为亚中部着丝点, 3.0—7.0和大于7.0分别为亚端和端着丝点。

## 结果与讨论

蛙属的三个种, 其 $2n = 26$ , 其中5对为大型染色体, 8对为小型染色体, 按相对长度计, 可把它们分为三个组(表1、2、3, 图版1.2.3.5.);

I组: 即第一对染色体, 是这些组型中最长的中部着丝点染色体。牛蛙的该对染色体的相对长度为 $141.79 \pm 3.53$ , 滇蛙为 $154.69 \pm 2.23$ , 昭觉林蛙为 $145.68 \pm 1.45$ 。

II组: 包括第2—5对染色体, 它们之间的相对长度相差无几。第3对染色体都是亚中部着丝点, 而其余均为中部着丝点染色体。第2对染色体显著地比第4、5对为大, 因此, 可以区别。第5对染色体是本组中最小的一对染色体, 亦可识别。

在5对大型染色体中, 上述三种蛙中, 只有昭觉林蛙的第5对染色体的短臂上出现次缢痕, 出现率为33.33%。

III组: 包括第6—13对染色体。鉴于这些染色体在三种蛙中有较大的差异, 故我们将分别叙述。

牛蛙: 第6对染色体较其他几对为大, 且为中部着丝点染色体, 可以识别。第7对的短臂具有次缢痕。第8对为亚中部着丝点染色体。第10对长臂有次缢痕。第13对是本组中最小的染色体。因此, 都尚可分辨。仅第11、12对不易区别, 但第11对一般比第12对稍大些, 勉强可以识别。第9对染色体比第11—13对为大, 又无次缢痕, 且是中部着丝点染色体, 因此, 可以与第8和第10对染色体加以区别。

滇蛙: 第7对为亚中部着丝点染色体, 可与第6对区别。第9和第11对亦为亚中部着丝点染色体, 但相对长度比第7对为小。第8对为中部着丝点, 可与毗邻的染色体分开。第10对染色体长臂有次缢痕, 极易辨认。第11对为亚中部着丝点染色体, 可与第12

对区分。第13对是本组中相对长度最小的，且为中部着丝点染色体。没有发现随体。

昭觉林蛙：第6对染色体明显地比其他小型染色体为大，且短臂出现次缢痕，故不难识别。第7对为中部着丝点染色体，短臂上有次缢痕。第8对为亚中部着丝点染色体，且在长臂出现次缢痕，有时带有一对随体。因此，二者可以区别。第10、11对染色体则在短臂出现次缢痕，间或亦有随体发现，相对长度相差不大，两者不易区别。第13对染色体最小，亦不难辨别。第9对染色体显著比第11、12、13对为大。

上述三种蛙在染色体组型上虽有某些不同之处，但并不十分显著。但从着丝点的位置及次缢痕的出现与否仍然可以加以区别。牛蛙的亚中部着丝点染色体对数较少，第7对染色体短臂出现次缢痕。滇蛙的第7对染色体为亚中部着丝点，次缢痕特别地少，仅在第10对染色体的长臂上出现。昭觉林蛙的次缢痕出现频次特别高，是它的显著特征（表1、2），且第10对染色体的次缢痕不在长臂，而在短臂上。

其次我们再来叙述华西雨蛙的组型，它的 $2n=24$ ，大型染色体有5对，小型染色体有7对，故极易和蛙属分开。它除了第4、5、6对为亚中部着丝点染色体外，其余概为中部着丝点染色体（图版4、5）。现分组于后：

I组：仅第1对染色体，它是该种中所有染色体中个体最大者。

II组：第2—5对染色体属之。其中第2、3对为中部着丝点染色体，第4、5对为亚中部着丝点染色体，二者足以区别。在第2、3两对对，第3对比第2对小；在第4、5两对对，第4对比第5对稍大，且臂比值是本组中最大的，故可辨认。

III组：第6—12对小型染色体属之，第6对为亚中部或亚端部着丝点染色体，足与其他诸对染色体区别。除第12对为最小的一对染色体外，第7—11诸对染色体仅在长度上有某些差别，实难以区别。某些细胞中期相中第9对长臂上有次缢痕，可以辨认。

上述四种无尾类中，同源染色体对不一定同时出现次缢痕，往往只在其中的一个染色体上。四种无尾类均未发现异型的性染色体。

除澳洲和南美部分地区外，蛙科(Ranidae)在世界各地都有分布，其大多数种类

表1 四种蛙的染色体数目分布

种名	观察细胞数	染色体数目							
		19	20	21	22	23	24	25	26
滇蛙	48		1		1	1	3		42
牛蛙	50		1	1			1		47
昭觉林蛙	57	2			1	1	1	1	51
华西雨蛙	55	1	2	2	17	2	31		

表2 四种蛙的染色体形态鉴别

形态 种名	染色体编号	
	亚中着丝点染色体编号	次缢痕染色体编号
滇蛙	3. 7. 9.	10 Q (38.46) *
牛蛙	3. 8.	7 P (100.00); 8 P (7.14); 10 Q (85.71)
昭觉林蛙	3. 8. 13.	5 P (33.33); 6 P (33.33); 7 P (40.00); 8 Q (10.00); 10 P (45.00)
华西雨蛙	4. 5. 6.	9 Q (50.00)

\* 括号内的百分数为观察细胞总数中次缢痕在该号染色体上的出现率。

表3 四种无尾两栖类染色体形态测量

染色体编号	牛蛙		昭觉林蛙		滇蛙		华西雨蛙	
	臂比指数	相对长度	臂比指数	相对长度	臂比指数	相对长度	臂比指数	相对长度
1	1.16 ± 0.03	141.79 ± 3.53	1.24 ± 0.06	145.68 ± 1.45	1.20 ± 0.02	154.69 ± 2.23	1.35 ± 0.04	154.95 ± 2.34
2	1.48 ± 0.06	122.35 ± 2.61	1.61 ± 0.05	123.59 ± 2.31	1.64 ± 0.08	123.75 ± 2.69	1.37 ± 0.04	124.97 ± 1.73
3	2.20 ± 0.07	109.69 ± 1.31	1.90 ± 0.04	113.24 ± 1.38	2.21 ± 0.10	111.54 ± 2.54	1.37 ± 0.06	111.29 ± 2.31
4	1.21 ± 0.03	103.92 ± 1.49	1.36 ± 0.07	104.27 ± 2.04	1.44 ± 0.12	104.94 ± 1.17	2.63 ± 0.09	106.69 ± 1.44
5	1.37 ± 0.03	91.49 ± 1.73	1.37 ± 0.05	96.92 ± 1.39	1.54 ± 0.06	92.71 ± 1.09	1.97 ± 0.07	97.11 ± 1.45
6	1.13 ± 0.03	67.78 ± 1.42	1.22 ± 0.05	74.82 ± 2.10	1.24 ± 0.04	60.98 ± 1.07	2.69 ± 0.20	78.90 ± 1.54
7	1.21 ± 0.03	63.73 ± 0.81	1.61 ± 0.13	56.50 ± 0.69	2.79 ± 0.12	57.49 ± 0.95	1.32 ± 0.07	67.10 ± 2.12
8	2.51 ± 0.09	54.78 ± 1.15	3.93 ± 0.21	54.52 ± 0.38	1.29 ± 0.06	55.39 ± 0.84	1.35 ± 0.06	60.97 ± 1.44
9	1.32 ± 0.06	53.93 ± 1.02	1.76 ± 0.15	53.16 ± 0.70	2.00 ± 0.11	52.59 ± 0.65	1.27 ± 0.04	56.83 ± 1.28
10	1.44 ± 0.07	52.15 ± 0.94	1.55 ± 0.11	51.53 ± 0.61	1.35 ± 0.12	50.51 ± 0.89	1.42 ± 0.06	51.73 ± 1.14
11	1.33 ± 0.07	49.04 ± 0.88	1.60 ± 0.13	46.60 ± 1.31	1.97 ± 0.15	49.52 ± 0.91	1.33 ± 0.08	47.85 ± 1.18
12	1.48 ± 0.05	43.87 ± 1.02	1.69 ± 0.11	43.02 ± 1.13	1.61 ± 0.08	45.89 ± 1.33	1.05 ± 0.03	39.63 ± 1.76
13	1.33 ± 0.06	42.25 ± 0.78	2.25 ± 0.16	38.69 ± 1.29	1.55 ± 0.04	40.30 ± 1.33		

的染色体组型基本相似,  $2n=26$ 。我们上述三种蛙属无尾类的亦若如此。就此而论, 蛙科的演化在染色体重组方面并不显著。不少资料说明两栖类的演化主要是在染色体的基因突变方面, 它的演化速度远比染色体重组的演化速度快。因此目前不少学者正致力于两栖类蛋白质演化的研究, 还有的为使演化研究走向定量阶段, 正进行蛋白钟 (Protein clock) 的研究。当然, 亦有例外的情况, 如分布在非洲的 *Ptycadena species* 其  $2n=24$ , 还有 *Arthroleptis peocilonotus* 的  $2n=14$ , 在此, 可能是染色体重组

在起作用,确切地说是罗伯逊易位 (Robertson translocation) 在起着作用 (Scheel, 1973)。另外,蛙属的染色体多为中部和亚中部着丝点染色体 (Leven et al. 1964),但是,某些北美种类,如 *R. cascadae*, *R. muscosa* 有端部着丝点染色体 (Haertel et al. 1974)。

牛蛙原产于北美,五十年代从古巴移入我国。曾有一些学者 (Wolf, 1964, Benirschke, 1973; Schmid, 1978<sub>b</sub>),对北美产的牛蛙作过详细的核型和带型分析,其组型和我们所作的完全一样,可见它虽然从北美移到东亚,染色体组型并无发生变化,足见其保守性。

林蛙群在欧亚大陆是广泛分布的。日本林蛙在我国分布于南方,有两个亚种的分化,昭觉林蛙是我国西南地区的亚种。欧洲林蛙的染色体曾有研究。Guillemin (1967) 报道,  $2n=26$ , 并发现异染色质性的 1—4 超数染色体。Schmid (1978<sub>b</sub>) 亦发现林蛙有一个超数染色体,其长臂为结构异染色质。第 10 对染色体长臂有次缢痕。而昭觉林蛙并不见超数染色体,同时,它的次缢痕也较多,且出现随体。而第 10 对染色体不见长臂次缢痕,而是在短臂上,这是一个有趣的现象。据 Schmid (1978<sub>b</sub>), 第 10 对染色体长臂上的次缢痕在蛙属中有某种标志性质的。昭觉林蛙的这种情况可能是臂间倒位引起的。可见昭觉林蛙与欧洲林蛙在染色体组型上是有足够的差异的。

滇蛙是云贵高原的特有种,其组型和它的近缘种黑斑蛙 *R. nigromaculata* Hallowell (Benirschke, 1973) 和金线蛙 *R. plancyi* Lataste (吴政安, 1978) 基本相似。但黑斑蛙有两个次缢痕,而金线蛙的次缢痕却在第 9 对染色体的长臂上。据 Schmid (1978<sub>b</sub>) 的意见,蛙属的长臂次缢痕都出现在第 10 对染色体上,是它们长期演化中保存下来的,具有较大的保守性,有一定的标志意义。他所研究的几种蛙属无尾类都毫无例外地在第 10 对染色体的长臂上出现次缢痕,而我们实验中的三种蛙属无尾类除昭觉林蛙外,亦有同样的情况。因此,金线蛙的长臂次缢痕出现在第 9 对染色体是值得注意的,它可能是前述两对染色体相互易位形成的,亦可能是由于它们在染色体长度和着丝点位置等形态上比较相似不易区别所致。

雨蛙除了非洲外,几乎全世界都有分布。华西雨蛙主要分布在我国西南地区,它的染色体组型与美洲的雨蛙相比,基本相似,但亦有某些差异,虽然其  $2n=24$ , 第 4、5、6 对染色体为亚中部着丝点,但次缢痕在第 9 对染色体的长臂上。而美洲几种雨蛙的次缢痕,如 *H. cinerea* 是在第 7 对染色体的长臂,*H. chrysiscelis* 是在第 6 对短臂 (Benirschke et al. 1973),而 *H. septentrionalis* 则是在第 10 对长臂上 (Schmid, 1978a; Benirschke, 1973)。据此,可能各染色体对间的相互易位是雨蛙中染色体演化的机制之一。

次缢痕作为染色体的有效的形态学特征的价值是有不同意见的。Wassermann et Bogart (1968) 和 Robinson et Stephenson (1967) 等持赞同的态度。但是,次缢痕在同一物种里,不同组织或相同组织的细胞间是有差异的。这在我们的实验中也有类似的情况。同时,还有人认为次缢痕的出现与否是与标本制作过程中的某些技术措施有关系,例如冷处理可以提高出现率等等。尽管如此,次缢痕仍然可以在某些种的某些染色体的固定位置上不变地出现。同时,只要我们观察必需的细胞数,保持实验条件的基本一

致,采用相同的组织材料,次缢痕仍不失为一个有用的细胞分类学性状。

次缢痕被认为与核仁组织者区(NOR)有相等的意义(Haertel et al, 1974),还有人认为,NOR数目少者较原始,多者特化(Schmid, 1978a)。据此,上述三种蛙属无尾类中应以滇蛙较原始,而昭觉林蛙较特化,牛蛙介乎二者之间。

染色体的着丝点位置和相对长度,虽然可因各种原因而变化,如秋水仙素处理的不同情况,制片技术及染色体长短臂的收缩程度的差异等影响其数据的精确性,表现出相对长度的相互重叠。着丝点位置在不同细胞之间亦有差异。但是,只要我们在基本相同条件下进行实验,观察必要的细胞数目,正像我们上面所说那样,它们仍然是染色体组型比较的有意义的指标。

### 参 考 文 献

- 刘成钊、胡淑琴 1961 中国无尾两栖类。科学出版社。
- 吴政安 1978 两栖类离体培养细胞的染色体研究。动物学报 24(2):117—126。
- Benirschke, K. et T. S. Hsu 1973 Chromosome Atlas, Fish, Amphibians, Reptiles and Birds, vol. 2 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Guillemin, C. 1967 Caryotypes des *Rana temporaria* (L.) et de *Rana dalmatina* (Bonaparte). *Chromosoma* 21, 189—197.
- Haertel, J. P et al. 1974 A comparative study of the chromosome from five species of the Genus *Rana* (Amphibia, Salientia). *Copeia* 1, 109—114.
- Scheel, J. J. 1973 The chromosomes of some African Anuran species, in "Genetics and Mutagenesis of fish". Etd. By J. H. Schroder, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 113—116.
- Schmid, M. 1978a Chromosome Banding in Amphibia. I, Constitutive Heterchromatin and Nucleolus Organizer Region in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66(4): 361—388.
- ....., 1978b Chromosome Banding in Amphibia. II, Constitutive Herterchromatin and Nucleolus Organizer Region in Ranidae, Microhylidae and Rhacohporidae. *Chromosoma* 68(2): 131—148.
- Ullerich, F. H. 1967 Weitere untersuchunger uber chromosomen verhaltnisse und DNS-Gehale bei anuren (Amphibia). *Chromosoma* 21(4): 345—368.

## A comparative investigation of the karyotypes from Four Amphibian species

Li Shu-shen    Wang Yin-xiang    Li Chong-yun

Wang Rui-fang    Liu Guang-zuo

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica.)

The karyotypes of four Amphibian species—*Rana pleuraden* Boulenger, *R. catesbeiana* (Shaw), *R. japonica chaochiaensis* Liu, and *Hyla annectans* (Jerdon) were determined from metaphase of bone marrow or epithelium cells from gut tissue prepared by the colchicine-hypotonic-air drying technique. The morphological criteria—relative length, arm-ratio and presence of secondary constriction permit the identification of each of the component parts. Three species of Genus *Rana*, like most other members of the Genus, have 26 chromosomes which divide into a group of five large pairs and a group of eight small pairs. Relative chromosomal lengths are similar in all three species. But the 10th chromosome of *R. pleuraden* have a secondary constriction in the long arm, while that of *R. japonica chaochiaensis* are more than three. *R. catesbeiana* has only three. All the three species of Genus *Rana* have a large submetacentric chromosome, i. e. the 3rd chromosome. The above mentioned facts enable us to explain the homogeneity of their evolution. The chromosomes of all the three species of genus *Rana* are meta- or submetacentric ones, without telo- or subtelo-centric ones. Like other species of tree frog, *Hyla annectans* has 24 chromosomes which divide into a group of 5 large pairs and a group of 7 small pairs, a secondary constriction located in the long arm of the 9th chromosome.

There is no evidence of an heteromorphic sex pair of chromosomes in these four species.

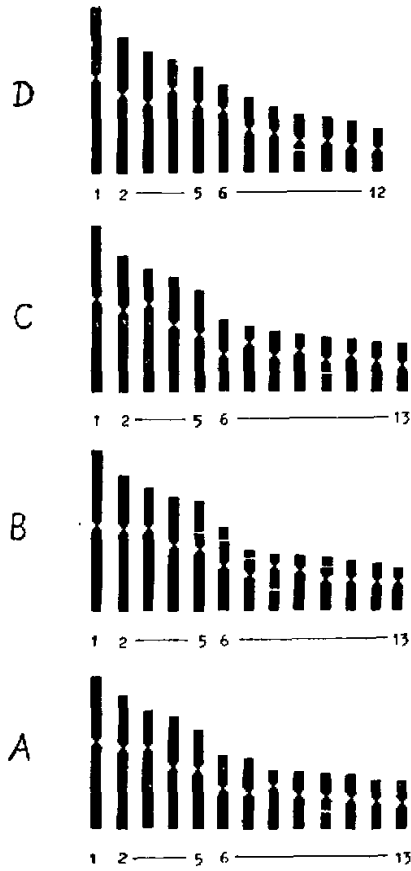
图版1.昭觉林蛙(♀)的染色体组型

昭觉林蛙骨髓细胞的染色体 箭头指次缢痕(下同)

图版2.牛蛙(♀)的染色体组型 牛蛙骨髓细胞的染色体

图版3.滇蛙(♂)的染色体组型 滇蛙骨髓细胞的染色体

图版4.华西雨蛙(♀)的染色体组型 华西雨蛙肠细胞的染色体



图版5.四种无尾两栖类染色体组型模式图  
A.牛蛙 B.昭觉林蛙, C.滇蛙 D.华西雨蛙