

河南花背蟾蜍的核型、C-带和 Ag-NORs 研究

董自梅^① 周 洁^② 常重杰^{③*}

(^①濮阳职业技术学院 濮阳 457000; ^②平顶山市二十七中学 平顶山 467000;

^③河南师范大学生命科学学院 新乡 453002)

摘要: 利用骨髓细胞蒸汽固定法制备染色体标本,研究了分布于河南新乡的花背蟾蜍(*Bufo raddei*)的核型、C-带和 Ag-NORs。结果表明:河南产花背蟾蜍体细胞染色体数为 22 条,核型公式为 $2n = 22(20m + 2sm)$,全部为中部或亚中部着丝点染色体, $NF = 44$ 。Ag-NORs 具有多态现象。C-带核型显示 22 条染色体的着丝点均正染, No. 1 染色体近着丝粒处有不定型插入型 C-带, No. 4 染色体具有恒定近端部插入型 C-带,随体部位被正染的仅占所观察细胞的 15%。

关键词: 核型; C-带; Ag-NORs; 花背蟾蜍

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)01-29-07

Karyotype, C-banding and Ag-NORs of *Bufo raddei* from Henan

DONG Zi-Mei^① ZHOU Jie^② CHANG Zhong-Jie^③

(^① Puyang Technical College, Puyang 457000; ^② Pingdingshan Twenty-Seventh Middle School, Pingdingshan 467000;

^③ College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The chromosome samples were prepared from metaphase marrow cells from *Bufo raddei* which distributed in Xinxiang, Henan by steam-fixation method. Karyotype, C-banding and silver-staining nucleolus organizer regions (Ag-NORs) were observed on chromosomes. The chromosome number of *Bufo raddei* is $2n = 22(20m + 2sm)$, and all of the chromosomes were metacentric or submetacentric ($NF = 44$). In addition, polymorphism was found in Ag-NORs whereas all the chromosomes were stained in C-banding. There was a variable insert type C-banding near centromere in No. 1 chromosome and an invariable insert type C-banding near terminal position in No. 4 chromosome.

Key words: Karyotype; C-banding; Ag-NORs; *Bufo raddei*

蟾蜍科动物在全球广泛分布于除澳大利亚、新几内亚和马达加斯岛之外的温带及热带地区,种类繁多,约有 300 余种^[1],我国计 2 属 17 种(包括亚种)^[2]。其中中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)和花背蟾蜍(*B. raddei*)是我国分布最广的两种。吴政安^[3]、温昌祥^[4]、尚克刚^[5]等对中华大蟾蜍的核型及带型做过报道;尚克刚等^[6]对分布于北京的花背蟾蜍核型及 Ag-NORs 也做过报道,但花背蟾蜍的 C-带迄今

未见报道。本文研究了分布于河南新乡的花背蟾蜍的核型、C-带及 Ag-NORs,并与中华大蟾蜍的 C-带做了比较,以探讨我国蟾蜍科动物在种、属之间以及不同地理种群间的差异性,为研

* 通讯作者;

第一作者介绍 董自梅,女,34 岁,硕士,讲师;研究方向:细胞遗传学。

收稿日期:2003-07-20,修回日期:2003-11-10

究我国蟾蜍类动物的起源与演化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 56 只(23♀,33♂)性成熟的花背蟾蜍均采自河南省新乡市郊区。

1.2 方法

1.2.1 骨髓细胞染色体玻片标本的制作 按吴政安^[7]报道的蒸汽固定法并加以改进。为提高分裂指数,以 0.01 ml/g(体重)剂量腹腔注射 5%的葡萄糖酵母汁(20 ml,10%的葡萄糖溶液加 1 g 干酵母,37~40℃发酵 2~4 h,待出现气泡后使用),连续 2~3 d,在最后一天注射酵母汁后 4~6 h,以 8~12 μg/g(体重)剂量自背部注射 0.04%的秋水仙素预处理 8~12 h。低渗时间为 1~2 h。

1.2.2 C-带技术 参照哺乳动物显带方法^[8]并加以改进。取片龄 7~15 d、染色体分散良好的标本,0.2 mol/L HCl 室温处理 15 min,5% Ba(OH)₂饱和溶液 58℃处理 7~10 min,2×SSC 液中 60℃温育 40 min。10% Giemsa 染色 8~15 min,空气干燥后镜检。

1.2.3 Ag-NORs 技术 参照 Howell 等^[9]的快速银染法并加以改进。将 50% AgNO₃ 溶液与 2%明胶(内含 1%甲酸)以 2:1 混合后,立即加到染色体标本上,覆以盖片。在 65℃温箱内染色 8~15 min,当整张片子呈金褐色时取出,流水冲去盖片,干燥后镜检。

染色体分类按 Levan^[10]的标准。

2 结果

2.1 花背蟾蜍的核型 在显微镜下观察了 20 个个体(11♀,9♂)200 个分散良好的中期分裂相,其染色体数目统计结果见表 1。并选出 20 个分散良好的中期分裂相进行放大、拍照、测量,其测量数据见表 2。

表 1 花背蟾蜍体细胞染色体数目统计

观察细胞数		染色体数目				
		< 20	21	22	23	> 23
♀	100	7	5	85	2	1
♂	100	6	3	86	3	2
总计	200	13	8	171	5	3
占观察细胞的百分数(%)		6.5	4	85.5	2.5	1.5

表 2 花背蟾蜍的染色体测量数据(来自 20 个细胞,20 个个体)

染色体组	染色体编号	相对长度 ¹⁾	着丝点指数 ²⁾	臂比指数 ³⁾	着丝点类型
A	1	17.69±0.60	45.08±1.23	1.22±0.06	m
	2	16.09±0.74	45.21±1.78	1.21±0.09	m
	3	12.94±0.62	43.29±3.20	1.32±0.17	m
	4	11.88±0.37	32.37±3.37	2.12±0.35	sm*
	5	10.83±0.63	45.80±3.53	1.20±0.19	m
	6	9.43±0.50	44.45±2.99	1.26±0.15	m
B	7	4.99±0.25	43.73±3.70	1.30±0.20	m
	8	4.64±0.23	46.35±3.34	1.17±0.17	m
	9	4.46±0.29	40.89±4.74	1.48±0.29	m
	10	4.04±0.11	44.96±4.12	1.24±0.21	m
	11	2.99±0.25	45.83±2.09	1.19±0.10	m

1)染色体长度/单倍体长度;2)着丝点指数=(短臂的长度/整个染色体的长度)×100;3)染色体的长臂/染色体的短臂
*带有随体

结果表明:花背蟾蜍的核型是 2n=22,NF=44。按照染色体的相对长度和着丝点指数,可以把全部染色体分为 A、B 两大组。A 组由 6 对大型染色体组成,相对长度大于 9%,B 组由 5 对小型染色体组成,相对长度小于 5%。除

了 No.4 染色体为亚中部着丝点染色体外,其余全部为中部着丝点染色体,随体位于 No.4 染色体长臂末端(图版 I:1,5)。未发现与性别相关的异型染色体存在。

2.2 C-带结果 观察了花背蟾蜍雌雄各 5 个

C-带,22 条染色体的着丝点全部被 C-带正染(图版 II:3,7,4,8)。2 个个体的 No.1 染色体端部浅染且近着丝粒处有不恒定插入型 C-带;No.2、5、10 染色体 C-带图像较大;No.4 染色体具有恒定近端部插入型 C-带,随体部位被正染的仅占所观察细胞的 15%,85% 的细胞中第 4 染色体长臂末端随体部位没被 C-带正染。

2.3 Ag-NORs 经银染后,不同个体之间出现了丰富的多态现象(图版 I:2~4;图版 II:1,2),统计结果见表 3。

根据染色体测量统计数据 and 带型结果绘制了河南花背蟾蜍染色体的带型模式(图 1)。

表 3 花背蟾蜍银染多态现象统计数据			
银染点数目	银染区域位点	占观察分裂相的比例 (%)	个体数
1	2 qter 4/5 处	2	1
	4 qter	5	3
2	2 个 4 qter	45	4
	1 个位于 4 qter 另 1 个位于 4 qter 4/5 处	45	4
3	2 个 4 qter 和 1 个 2qter	1	1
	2 个 4 qter 和 1 个 10 qter	1	1
4	2 个 4 qter 和 2 个位于 1,5 chr	1	1

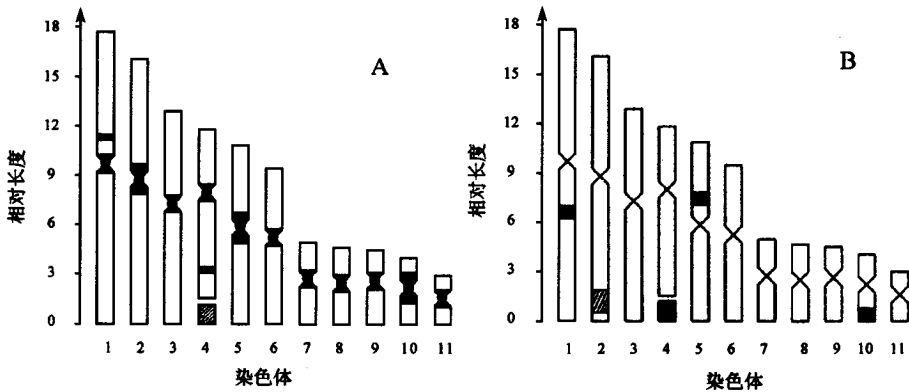


图 1 花背蟾蜍染色体 C-带(A)及银带(B)带型模式图

■ 恒定带 ▨ 不恒定带

3 讨论

通过对花背蟾蜍的核型分析,发现分布于河南的花背蟾蜍和吴政安^[3]报道的中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizana*),刘万兆、杨大同^[11]报道的云南喜山蟾蜍(*B. himalayanus*)和黑眶蟾蜍(*B. melanosti*),李树深^[12]报道的云南哀牢蟾蜍(*B. ailaoanus*),马军^[13]报道的广西黑眶蟾蜍(*B. melanosti*),尚克刚^[6]报道的北京花背蟾蜍(*B. raddei*)以及 Silva 等^[14]报道分布于巴西的 10 种蟾蜍,它们的体细胞染色体数都是 2n = 22,由 6 对大型染色体(相对长度 > 9%)和 5 对小型染色体(相对长度 < 5%)组成,说明蟾蜍科动物核型的保守性。但它们的相对长度、臂比、随体、次缢痕的位置不同,又说明种间存在差异

性。值得注意的是:河南产花背蟾蜍和北京产花背蟾蜍的随体位置有差异,北京产花背蟾蜍的随体位于 No.4 染色体短臂,而河南产花背蟾蜍随体位于 No.4 染色体长臂。另外,邓崇新、尚克刚^[15]曾根据花背蟾蜍血淋巴细胞染色体 DNA 复制顺序确定其性染色体构成是 XY 型,且在分裂中期的染色体上出现了异态现象。本文未发现雌雄染色体间明显的异态现象,说明花背蟾蜍中可能存在种内不同地理种群间染色体多态现象。

Ag-NORs 是显示 NOR 简便可靠的方法。Hsu 等^[16]用原位分子杂交证明 Ag-NORs 是基因组中 18S + 28S 核糖体基因(rDNA)的分布区。更多学者认为,Ag-NORs 不是核糖体基因本身,而是与 rDNA 转录有关的一种酸性蛋白质,

因此,Ag-NORs是具有转录活性的NOR。大多数两栖动物的NOR只有一对,而且在*Bufo*属中NOR也仅位于特定的一对染色体上。Shimid^[17]报道的17种蟾蜍中,应用Ag-NORs技术确定有7种NOR染色体是第1号染色体,在第6号染色体上的有5种,第7号染色体上的有2种,第10号染色体上的有1种,第11号染色体上的有2种。本文报道的河南产花背蟾蜍NOR位于第4号染色体长臂上,尚克刚^[5]报道的北京花背蟾蜍NOR也位于第4号染色体上,但在短臂末端,二者Ag-NORs都出现了多态现象,表现在Ag-NORs数目、Ag-NORs在染色体上的位置、Ag-NORs之间的相对大小。对河南产和北京产花背蟾蜍Ag-NORs多态性进行比较,发现二者的相同之处表现在:Ag-NORs数目都分别出现1、2、3、4个,并且都在第1、2、4、5染色体上出现Ag-NORs;不同之处在于:北京产花背蟾蜍Ag-NORs位于第4对染色体短臂末端,同源染色体之间没有出现位置差异。河南产花背蟾蜍第4同源染色体45% Ag-NORs有位置差异,即一个位于长臂末端,一个位于长臂4/5处(图版I:4)。同时第4染色体上出现一个Ag-NORs的比例远小于北京的花背蟾蜍,北京产花背蟾蜍银带还出现在第3、6、7、8染色体上。本文在这些染色体上未观察到银带,但在第10染色体上出现银带(图版II:1)。钱启龙^[18]报道,安徽产花背蟾蜍Ag-NORs位于第3染色体长臂末端且仅存在于一条染色体上。三者出现如此多的差异,可能是由于地理分布不同和环境差异所造成的,也不否认存在亚种的可能性。总的看来,花背蟾蜍的主要核仁组织区位于第4染色体上,而在其它染色体上具有潜在产生18S和28S RNA的能力。究其多态性的原因可能是由于核仁组织区能发生各种结构重排,如缺失、重复和易位等因素所造成,但花背蟾蜍出现如此丰富的多态性,这种可能性不大。Nardi^[19]等在讨论*Triturus vulgaris*的NOR多态现象时,认为NOR数目上的多态原因之一有可能是在卵子和精子发生时,由于基因扩增而产生额外的rDNA拷贝附着到其它染色体

上,其附着位点可能具有类似的简单序列。Odierna等^[20]研究意大利不同地区同一种蛙Ag-NORs多态性时,认为是由于环境压力诱导产生了染色体断裂和重排造成的。花背蟾蜍产生多态现象的原因有待于进一步的研究证明。

C-带技术是细胞遗传学、遗传学及细胞分类中常用的,主要与高度重复的DNA序列和卫星DNA有关^[21]。从细胞学的角度来看,C-带又与染色体的着丝点、次缢痕及核仁区相关,因此C-带和银带应该有一定的对应关系,Swarc等^[22]报道巴西Tibagi河的黑斑蟾蜍银带和C-带的一致性。而本文的实验结果表明,花背蟾蜍的C-带和银带并不完全一致,即随体部位并不总是被C-带深染,因而说明异染色质也具有异质性。对于蟾蜍科来说,全部染色体显示着丝点C-带是一个共同的特征。本文C-带和温昌祥^[4]等报道的中华大蟾蜍C-带做了比较,二者相同之处是:带型都没有性别差异,都存在插入型C-带和端部型C-带,着丝粒处都具有染色很深的C-带图像。二者不同之处是:中华大蟾蜍的插入型C-带位于No.3染色体和No.6染色体上,端部C-带位于No.6染色体的随体部位;而花背蟾蜍插入型C-带位于No.4染色体和No.1染色体上,端部C-带位于No.4染色体的随体部位,但总的看来,二者C-带图像很相似,提示二者的亲缘关系较近。

致谢 承蒙和振武教授和陈晓虹副教授协助鉴定花背蟾蜍标本,谨致谢忱。

参 考 文 献

- [1] Duellman W E, Trueb L. Biology of Amphibians. New York: McGraw-Hill Book Company Press, 1986, 445 ~ 458.
- [2] 中国野生动物保护协会主编, 费梁执行主编. 中国两栖动物图鉴. 郑州: 河南科学技术出版社, 1999, 348 ~ 351.
- [3] 吴政安. 两栖类离体培养细胞的染色体研究. 动物学报, 1978, 24(1): 117 ~ 126.
- [4] 温昌祥, 吕群, 项维. 中华大蟾蜍染色体分带和姐妹染色单体互换的研究. 遗传学报, 1983, 10(4): 291 ~ 297.
- [5] 尚克刚, 李薇锦, 蒋海燕等. 花背蟾蜍的核型分析 I. 遗传学报, 1982, 9(4): 298 ~ 302.
- [6] 尚克刚, 李士鹏, 金昊. 花背蟾蜍的核型分析. 遗传学

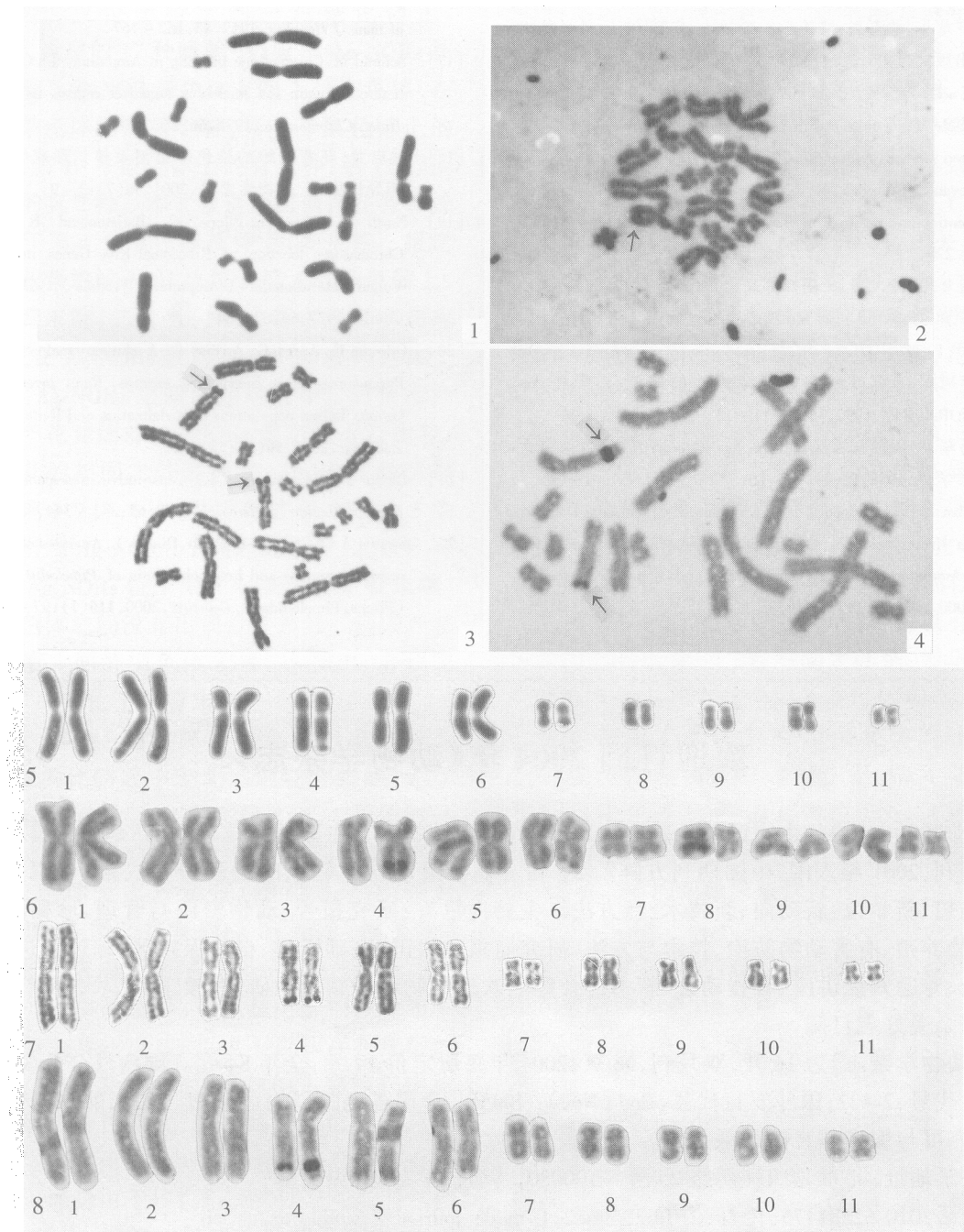
- 报,1984,11(1):52~60.
- [7] 吴政安.两栖类骨髓细胞的染色体标本的制作方法.遗传,1982,4(1):38~39.
- [8] 卢龙斗,常重杰.遗传学实验技术.安徽:中国科学技术出版社,1996,228~229.
- [9] Howell W M, Black D A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer-A1-step method. *Experientia*, 1980, 36:1 014~1 015.
- [10] Levan A, Fredga K, Sandbergm A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52:201~220.
- [11] 刘万兆,杨大同.云西南部高黎贡山两种蟾蜍的核型、C-带和 Ag-NORs 和研究,两栖爬行动物学研究,1997(6~7):1~4.
- [12] 李树深.袁牢蟾蜍和新疆绿蟾蜍的核型、C-带和 Ag-NORs.遗传,1992,14(5):11~13.
- [13] 马军.广西黑眶蟾蜍核型及 Ag-NORs 研究.广西医科大学学报,1998,15(4):14~16.
- [14] Silva A P Z, Haddad C F B, Kasahara S. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Aunra) using differential staining. *Cytobios*, 2000, 103(402):25~38.
- [15] 邓崇新,尚克刚.花背蟾蜍 XY 型性别决定的细胞遗传学证据.遗传学报,1984,11(5):395~399.
- [16] Hsu T C. Mammalian chromosomes *in vitro*. I. The karyotype of man. *J Heredity*, 1952, 43:162~167.
- [17] Schmid M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 1978, 66:361~388.
- [18] 钱启龙.花背蟾蜍的染色体组型及核仁形成区硝酸银特异性染色.生物学通报,2001,36(7):3~9.
- [19] Nardi I, Barsacchi-Pilone G, Batistoniand R, et al. Chromosome location of Ribosomal-Kna Genes in *Triturus Vulgaris-Meridionalis* (Amphibia, Vrodela). *Chromosoma* (Berl), 1977, 64:67~84.
- [20] Odierna G, Aprea G, Arribas O. A chromosomal study of the Pyrenean endemic brown frog species, *Rana pyrenaica*, and various Italian populations of R-dalmatina and R-italica. *Folia Zoologia*, 2001, 50(1):55~63.
- [21] Raicu P, Geormaneanu C. Constitutive heterochromatin in *Rana ridibunda*. *J Heredity*, 1977, 63:343~344.
- [22] Swarca A C, Giuliano-Caetano, Dias A L. Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 2000, 110(1):97~100.

董自梅等:河南花背蟾蜍的核型、C-带和 Ag-NORs 研究

图版 I

DONG Zi-Mei *et al.*: Karyotype, C-banding and Ag-NORs of *Bufo raddei* from Henan

Plate I



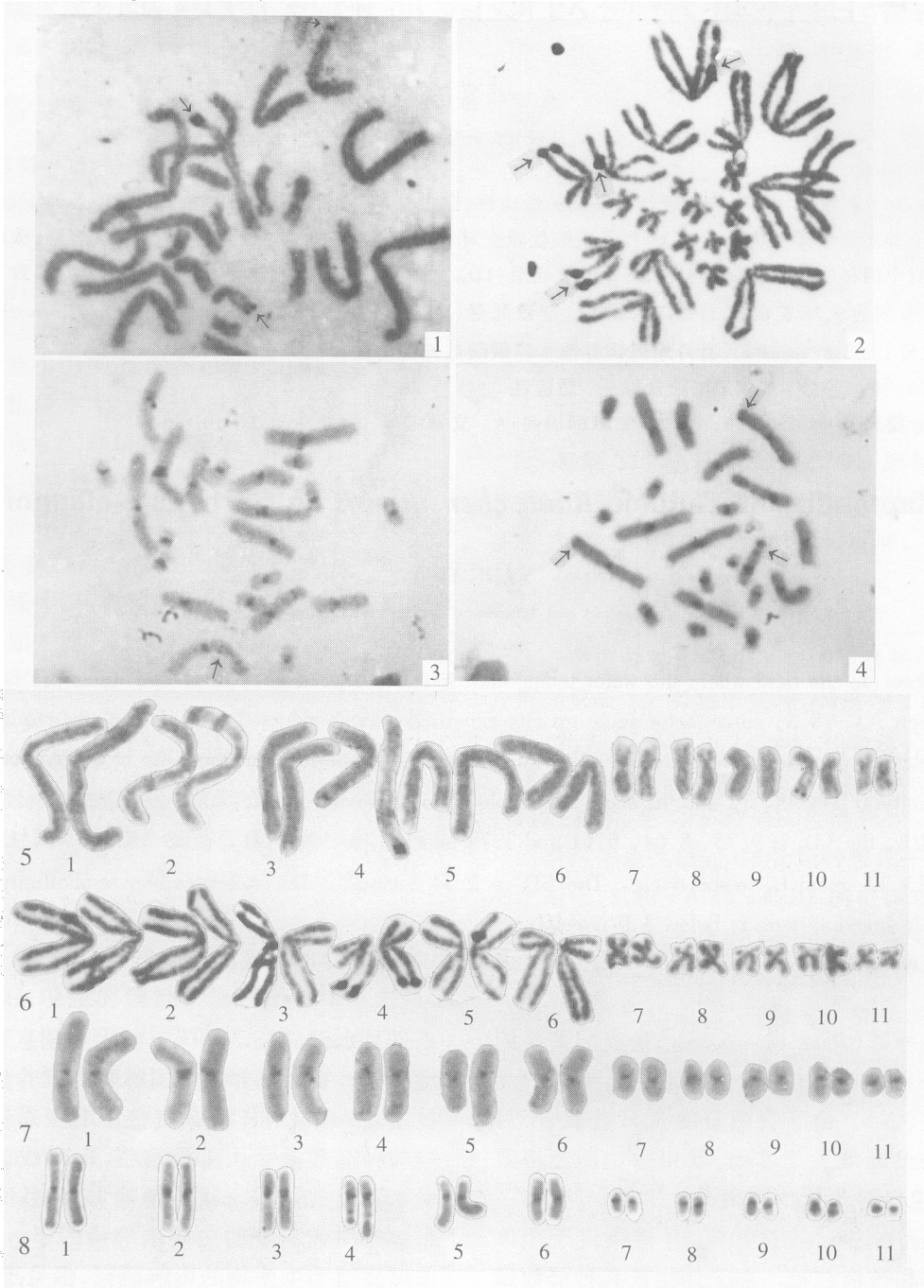
1,5.河南花背蟾蜍中期分裂相及核型图;2,6.一个4 qter 银带及核型图;3,7.二个4 qter 银带及核型图;4,8.一个位于4 qter,另一个位于4 qter 4/5 处银带及核型图

董自梅等:河南花背蟾蜍的核型、C-带和 Ag-NORs 研究

图版 II

DONG Zi-Mei *et al.* : Karyotype, C-banding and Ag-NORs of *Bufo raddei* from Henan

Plate II



1,5.二个 4 qter 和一个 10 qter 银带及核型图;2,6.二个 4 qter 和二个 1,5 chr 银带及核型图;3,7.No.1 插入型 C-带及核型图;4,8.No.4 插入型和端部型 C-带;No.1 端部 C-带浅染及核型图