

中国水龟类的核型与银带带型研究

郭超文 聂刘旺 汪 鸣

(安徽师范大学生物系, 芜湖 241000)

摘要 以血培养细胞为材料, 研究了三种水龟的核型与 NORs, 结果表明, 染色体数均为 $2n = 52$, 核型模式 $9 + 5 + 12$, 属龟科核型中的原始类型。但眼斑水龟 $NF = 76$, 而四眼斑水龟和黄喉拟水龟的 $NF = 78$ 。从核型结构看, 眼斑水龟与四眼斑水龟相似, 而黄喉拟水龟则有较大差别, 作者还发现黄喉拟水龟核型的一些重要特征, 即其 A 组 No.3 和 No.6 染色体有次缢痕, No.6 长臂呈清晰的随体, 这些是拟水龟属核型的主要特征, 但在以往的资料中都未曾记载过。三种水龟的雌雄个体间均未见有异型的性染色体。仅显示一对 NORs, 并均位于 A 组较小的一对中部着丝粒染色体上, 表明其 NORs 核型的保守性和 NORs 位置的一致性。

关键词 眼斑水龟, 四眼斑水龟, 黄喉拟水龟, 核型, NORs

水龟类 (*Clemmys complex*) 划分为 3 属, 即水龟属 (*Clemmys*), 眼斑水龟属 (*Sacalia*) 和拟水龟属 (*Mauremys*) 共约 10 种。我国有水龟 3 种, 其中眼斑水龟 [*S. bealei* (Gray)] 和四眼斑水龟 [*S. quadriocellata* (Siebenrock)] 属眼斑水龟属, 黄喉拟水龟 [*M. mutica* (Cantor)] 属拟水龟属。Bickham^[1] 分析了水龟类的核型, 证实了水龟类划分为三属的观点, 并发现水龟属核型最大一对微小染色体具有次缢痕, 此为区别于其他两个属的主要特征。Bickham 报道眼斑水龟核型与黄喉拟水龟相似, 陈俊才等^[2] 研究我国黄喉拟水龟和四眼斑水龟核型结果与 Bickham 报道的相一致。但结果表明, 黄喉拟水龟核型还有一些重要的特征未曾被前人发现, 拟水龟属的核型与眼斑水龟属有明显的差异, 并首次报道 3 种水龟的 NORs 及眼斑水龟雌性的核型, 以进一步确定我国水龟类的核型结构, 并探讨其分类地位。

1 材料与方法

眼斑水龟 (3♀, 2♂), 四眼斑水龟 (4♀, 3♂) 和黄喉拟水龟 (2♀, 2♂) 均购自安徽广德。

1.1 外周血淋巴细胞培养, 由心静脉抽血, 全血培养。培养基组成: 培养液 (1640) 4ml, 小牛血清 1ml, PHA 0.1ml, 双抗 1%, pH7.2—7.4, 38℃ 下培养 72h, 终止培养前 4h 加秋水仙素, 最终浓度为 $0.06\mu\text{g} / \text{ml}$ 。染色体标本按蒸气固定—空气干燥法制片。

1.2 核仁组织者 (NORs) 银染色 参照 Howell et al^[3] 方法。配制两种溶液: (1) 2% 白明胶溶液 10ml, 加入 0.1ml 甲酸。(2) 50% 硝酸银水溶液。

在染色体上滴加 (1) 液 2 滴, 滴加 (2) 液 4 滴, 盖上干净盖玻片, 置 70℃ 温箱中 5—

7min, 然后镜检, 当核仁组织者呈黑色时, 用蒸馏水冲洗, 晾干。

1.3 用常规方法分析核型, 染色体分类按 Levan et al^[4] 的标准, 核型模式参照 Bickham 标准, NORs 分析均用多个细胞的显微照片, 结合镜下观察进行。

2 结果

2.1 核型分析

体细胞染色体数与核型统计数据见表 1, 2, 核型如图版 I 1, 3, 5, 三种水龟的结果如下:

2.1.1 眼斑水龟 二倍体数 2n = 52, 核型模式为 9 + 5 + 12, A 组中 9 对均为中部着丝粒染色体(M)。B 组的 No. 1, 2, 5 为亚端部着丝粒染色体(ST), No. 3, 4 为端部着丝粒染色体

表1 三种水龟的二倍体染色体数
Tab.1 The diploid chromosome number of three species of turtles

物 种		观察细胞数	2n			2n=52 %
Species			51 ≥	52	≥53	
眼斑水龟	♀	100	22	88	0	87.64
<i>S. bealei</i>	♂	78	6	68	4	
四眼斑水龟	♀	88	19	62	7	77.22
<i>S. quadriocellata</i>	♂	92	13	77	2	
拟黄喉水龟	♀	76	9	66	1	83.33
<i>M. mutica</i>	♂	80	13	64	3	

表2 三种水龟的染色体统计数据 ($\bar{x} \pm S_x$)¹⁾²⁾
Tab.2 The seastistical data of karyotype for three species of turtles

组别 Group	No.	眼斑水龟 <i>S. bealei</i>		四眼斑水龟 <i>S. quadriocellata</i>		黄喉拟水龟 <i>M. mutica</i>	
		相对长度 Relative length	臂比值 Arm ratio	相对长度 Relative length	臂比值 Arm ratio	相对长度 Relaue length	臂比值 Arm ratio
A	1	12.22±0.51	1.37±0.30	13.01±0.81	1.18±0.37	13.66±0.77	1.41±0.23
	2	10.10±0.47	1.27±0.35	10.22±0.56	1.32±0.22	12.68±0.59	1.32±0.28
	3	5.05±0.48	1.17±0.21	4.76±0.65	1.41±0.21	4.88±0.82	1.27±0.19
	4	4.75±0.39	1.04±0.10	4.41±0.31	1.38±0.30	4.59±0.29	1.35±0.09
	5	4.24±0.26	1.10±0.21	4.07±0.44	1.33±0.29	3.51±0.47	1.36±0.33
	6	3.84±0.34	1.11±0.09	3.60±0.54	1.07±0.40	3.02±0.51	1.81±0.11
	7	3.64±0.30	1.40±0.21	3.25±0.22	1.33±0.22	2.83±0.29	1.23±0.17
	8	2.83±0.17	1.46±0.21	2.55±0.13	1.20±0.31	2.44±0.71	2.13±0.25
	9	2.42±0.34	1.18±0.09	2.44±0.21	1.22±0.19	2.34±0.33	1.18±0.11
B	1	7.37±0.69	4.62±0.35	7.55±0.67	5.00±0.29	8.59±0.63	6.33±0.31
	2	6.77±0.74	3.91±0.26	5.69±0.47	4.44±0.13	7.02±0.40	3.80±0.20
	3	5.46±0.80	> 7	5.46±0.44	6.36±0.19	4.98±0.42	> 7
	4	4.85±0.27	> 7	4.99±0.38	> 7	4.88±0.32	4.00±0.09
	5	4.04±0.22	3.44±0.13	4.41±0.40	3.80±0.17	3.51±0.27	3.50±0.21
C	1	1.81±0.14		2.32±0.45		1.95±0.33	
	12	1.61±0.11		1.51±0.21		1.36±0.45	

1) 表中共计量10个细胞
10 cells were measured in table
2) M: 臂比值1.00—1.70; SM: 1.70—3.00; ST: 3.00—7.00; T:>7

(T)。C 组含 12 对微小染色体(m), 由于小, 不能进行染色体分析。A 组 No.9 与 C 组 No.1 的相对长度分别为 2.42 ± 0.34 和 1.81 ± 0.14 , 有一定差异, 大小型染色体间的介限比较清楚, 容易区别。由于 C 组染色体多数呈点状, 在统计染色体臂数时, 按常规均计为 1, 因此眼斑水龟染色体总臂数 $NF = 76$ 。在雌雄个体间未见有异型的性染色体。

2.1.2 四眼斑水龟 $2n = 52$, 为 $9 + 5 + 12$ 模式。A 组含 9 对 M 染色体。B 组 No.4 为 T 染色体, 其余 4 对为 ST 染色体。C 组由 12 对 m 染色体组成。大小型染色体的介限不清楚, 结合形态分析给于划分。四眼斑水龟的 $NF = 78$, 未见有异型的性染色体。

2.1.3 黄喉拟水龟 $2n = 52$, 为 $9 + 5 + 12$ 。A 组 No.6 和 No.8 为 SM, 其余 7 对为 M, No.3 短臂有次缢痕。No.6 长臂有次缢痕, 并呈清晰的随体(图版 I : 5)。B 组有 1 对 T 染色体(No.3), 4 对 ST 染色体(Nos.1, 2, 4, 5)。C 组为 12 对 m 染色体。这物种的 $NF = 78$, 未见有异型的性染色体。

2.2 Ag-NORs 分析

三种水龟均仅显示一对 NORs, 四眼斑水龟和黄喉拟水龟 NORs 位于 A 组 No.8 长臂末端区, 眼斑水龟 NORs 位于 A 组 No.7(图版 I : 2, 4, 6), 出现率分别为 76.1%, 65.3% 和 69.0%。未见有融合或异形现象。

3 讨论

3.1 上述结果表明, 三种水龟 $2n = 52$, 为 $9 + 5 + 12$ 模式, 这与 Bickham 所研究的结果相似, 属龟科核型的原始类型。在我国的眼斑水龟属中, 眼斑水龟与四眼斑水龟之间仅 B 组 No.3 有差异, 前者为 T, 而后者则为 ST, 因而眼斑水龟 $NF = 76$, 四眼斑水龟 $NF = 78$, 但四眼斑水龟 B 组 No.3 的臂比值已接近 7(表 2), 因此这两个近缘种核型应视为相似, 表明我国眼斑水龟属核型有较强的保守性, 支持关于龟类核型具有属以上分类学意义, 而很少有属以下的分类学价值的观点。

Bickham 研究眼斑水龟和黄喉拟水龟核型中均未发现有次缢痕或随体。陈俊才等报道四眼斑水龟和黄喉拟水龟结果与 Bickham 完全一致。但本文结果表明黄喉拟水龟 A 组 No.3 短臂和 No.6 长臂各有一稳定的次缢痕, 并且 No.6 显示清晰的随体。次缢痕和随体都是染色体有效的形态学特征, 对确定物种的亲缘关系, 探索核型演化等都有重要的价值。作者认为上述两对染色体的次缢痕和随体应是拟水龟属核型的主要特征。有次缢痕染色体对的分化, 可能是水龟类属间核型演化的主要机制。

3.2 采用分子杂交已经证实, 银染色技术可特异地显示出核糖体大、小亚基的 rRNA 基因(28s + 18sDNA)的活性^[6], 其呈现的 NORs 在研究核型演化及物种亲缘关系中被做为一项重要指标。NORs 的数目与分布因物种而异, 一般随演化程度的提高而由少变多。本文研究的三种水龟均仅显示一对 NORs, 并都位于 A 组的 No.7 或 No.8, 这与 Batagurinae 亚科多数种结果相一致, 与普通核型一样, NORs 显示结果也证明水龟类核型在演化上的保守性。

在许多物种中, NORs 的位置为次缢痕区, 即次缢痕 = NOR = rDNA。本研究的结果, 眼斑水龟属的两个种在常规 Giemsa 染色并未出现次缢痕, 黄喉拟水龟 A 组 No.3 和 No.6 在常规核型中出现了次缢痕, 但银染色后显示 NORs 的染色体显然不是 No.3 或

No. 6, 因此三种水龟的 NORs 均不在次缢痕区, 说明 NORs 位置与次缢痕区的对应关系不是绝对的, 在许多物种, NORs 和次缢痕是研究核型的两个互有相关的重要形态特征, 而我国水龟类则不存在这种现象。

参 考 文 献

- [1] Bickham, J. W.: A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*, *Herpetologica*. 1975, **31**: 198—204
- [2] 陈俊才等: 三种龟类的薄层扫描核型分析, 两栖爬行动物学研究(第 1, 2 辑). 贵阳: 贵州科技出版社. 1992
- [3] Howell, WM et al: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method, *Experientia*. 1980, **36**: 1014—1015
- [4] Levan, A et al: Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas*. 1964, **52**: 201—220

STUDIES ON THE KARYOTYPE AND NORs OF THREE TURTLES IN THE *SACALIA* AND *MAUREMYS* FROM CHINA

Guo Chaowen, Nie Liuwang and Wang Ming

(Department of Biology, Anhui Normal University, Wuhu 241000)

Abstract The karyotypes and NORs of three species of turtles, i. e. *Sacalia bealei*, *S. quadriocellata* and *Mauremys mutica* were studied from mitotic metaphase of cultured blood cells prepared by the colchicine-hypotonic-air drying method. The diploid chromosome number is $= 52$ consisting of 9 meta- or submetacentric pairs, 5 ter- or subterminal pairs and 12 pairs of microchromosomes. The karyotypic formula is $9 + 5 + 12$, being the primitive type in karyotypes of Emydidae. The number of fundamental (NF) of *S. bealei* is 76 and those of *S. quadriocellata* and *M. mutica* are 78 respectively. The feature of karyotypic structure of *S. bealei* is similar to that of *M. quadriocellata*. The secondary constriction and satellite were reported for the first time in *M. mutica*. The secondary constriction locates on the short arm of 3rd and the long arm of 6th chromosome of group A, and the satellite is on the 6th chromosome of group A. No dimorphic sex chromosomes were observed in either sex of the three species examined.

The NORs occurred on the long arm of the 7th pair of chromosomes in *S. bealia*, and located on long arm of the 8th pair of chromosomes in *S. quadriocellata* and *M. mutica*. The evidence of NORs indicated in this paper for the three species reveals the extreme conservativeness with regard to karyotype and it is reported hitherto.

Key words *Sacalis bealei*, *S. quadriocellata*, *Mauremys mutica*, Karyotype, NORs

图版 I



眼斑水龟的核型(1)与 NORs(2), 四眼斑水龟的核型(3)与 NORs(4), 黄喉拟水龟的核型(5)与 NORs(6)
 The karyotype(1) and NORs(2) of *Sacalia healei*; The karyotype(3) and NORs(4) of *S. quadriocellata*;
 The karyotype(5) and NORs(6) of *Mauremys mutica*