

三种龟类动物的细胞遗传研究 *

郭超文 汪 鸣 聂刘旺

(安徽师范大学生物系, 芜湖 241000)

摘要 本文以外周血淋巴细胞为材料, 首次报道马来闭壳龟和地龟的核型, G带, C带和Ag-NORs, 以及平胸龟的G带和C带。发现平胸龟的核型与前人报道的有差异。研究结果表明: 平胸龟 $2n = 54(14M + 4ST + 8T + 28m)$, N.F. = $72, 7 + 6 + 14$ 。A组 No.6 q per有一次缢痕。Ag-NORs位于 A组的 No.7 q ter. 其全部染色体的着丝粒区均显示阳性 C带, 并且 A组的 No.7 整条异染色质化; 马来闭壳龟 $2n = 52(18M + 4ST + 6T + 24m)$, N.F. = $74, 9 + 5 + 12$ 。Ag-NORs位于 A组 No.7 q ter. 全部染色体的着丝粒区均有深染 C带, C组的 No.1 整条异染色质化; 地龟核型 $2n = 52(16M + 4ST + 6T + 26m)$, N.F. = $72, 8 + 5 + 13$, A组 No.7 p per有一次缢痕。Ag-NORs位于 A组 No.7 q per, 呈异态。全部染色体着丝粒区 C带阳性, A组的 No.1 q ter 和 No.2, 7 p q ter 呈现 C带阳性。在三种龟的 G带型中, 仅马来闭壳龟 A组 No.8 和 B组 No.2 有时呈现同源染色体间异型, 其余均可进行同源配对。本文还讨论了核型的演化机制。

关键词 龟类, 核型, G带, C带, Ag-NORs

有关龟鳖类的染色体研究, 从 30 年代起就有不断报道。龟鳖类动物有曲颈龟和侧颈龟两类。记载过染色体组型的曲颈龟已占其总数的 55% 左右^[1-5], 做过带型分析的种类约 25%^[6, 7], 在脊椎动物中是研究得比较充分的类群之一。我国有龟鳖类 30 多种, 均属曲颈龟类, 做过染色体组型分析的仅少数几种, 分带核型仅作者报道的 4 种。龟鳖类在脊椎动物的系统演化上占有十分重要的地位, 有些龟鳖类动物的分类地位尚存有争论。选择水栖龟鳖类为材料进行染色体研究, 对于分析龟鳖类物种的特性, 探索其分类、遗传、进化和系统发育关系都有重要的意义。本文研究了三种龟的核型、G带、C带和 Ag-NORs。

1 材料与方法

1.1 材料 平胸龟 (*platysternon megacephalum* Gray) 3♀, 2♂, 1989 年 9 月采自安徽广德; 马来闭壳龟 (*Cuora amboinensis* Daudin, 1802) 4♀, 4♂, 1991—1992 年购自广州水产

* 国家自然科学基金资助课题

陈壁辉教授提供马来闭壳龟的生态分布资料, 特此致谢。

1994-12-03 收到; 1997-03-22 修回。

市场; 地龟 (*Geoemyda spengleri* Gmelin) 3♀, 4♂, 1991 年和 1993 年 6 月先后购自武汉市场。

1.2 外周血培养及染色体标本制备 由心脏静脉取血, 全血培养。培养基组成: 4:1 的培养液(199 或 1640) 和小牛血清, PHA(Difco) 0.2ml, 双抗 0.1%, pH7.2—7.4。置 37℃ 培养 72h, 终止培养前 6h 加秋水仙素, 最后浓度为 0.025—0.05μg / ml。染色体制片按常规蒸气固定法。

1.3 G 显带 G 显带基本按 Seabright 的胰酶法稍加修改^[8]。制备的标本空气干燥后, 于 60℃ 烤片过夜。烤片后用 0.25% 胰酶处理 2—3min, 经 D.P 缓冲液, 70% 乙醇和 95% 乙醇漂洗, Giemsa 染色 10min。

1.4 C 显带 参照 Sumner 的方法进行^[9]

1.5 Ag-NORs 染色 参照 Howell 等的方法进行^[10]。核型分析按 Bickham 的分类排列^[11], 着丝粒位置的确定和染色体总臂数(N.F.)统计参照 Levan 等的标准^[12], 微小染色体臂数依常规计为 1。各种带型分析均以多个细胞的显微照片结合镜下标本观察进行。

2 结果与讨论

2.1 无带核型

三种龟染色体的数目, 测量数据和核型的资料列于表 1 和表 2, 核型如图 1—3。



图 1 平胸龟的染色体组型(1), G-带(2), C-带(3)和 Ag-NORs (4). (箭头示 NOR)

Fig. 1 The karyotype(1), G-banding(2), C-banding(3) and Ag-NORs (4), (the arrow pointed NOR) of *P. megacephalum*

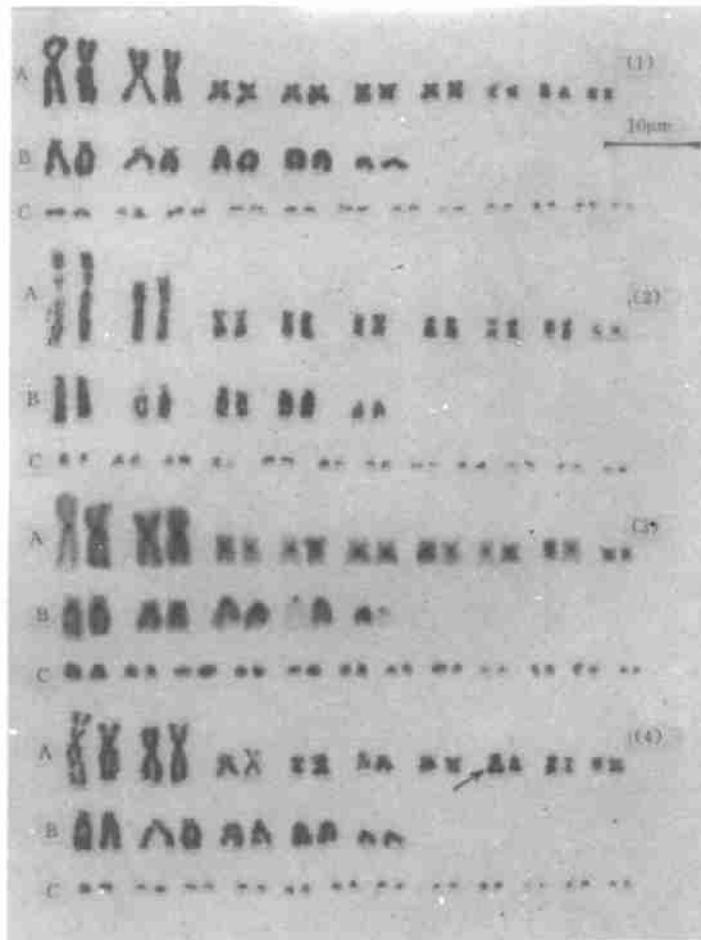


图2 马来闭壳龟的染色体组型(1), G-带(2), C-带(3)和Ag-NORs(4), (箭头示NOR)

Fig.2 The karyotype(1), G-banding(2), C-banding(3) and Ag-NORs(4), (the arrow pointed NOR) of *C. amboinensis*

研究中分析三种龟各 100 个中期分裂相, 其中平胸龟 $2n = 54(14M + 4ST + 8T + 28m)$, N.F. = $72, 7 + 6 + 14$ 模式。A 组的 7 对染色体均为 M, 其中 No. 6 长臂近着丝粒区可见次缢痕。B 组中的 No. 1, 2 为 ST, No. 3—6 为 T, C 组含 14 对微小染色体 (m: microchromosome); 马来闭壳龟 $2n = 52(18M + 4ST + 6T + 24m)$, N.F. = 74, 为 $9 + 5 + 12$ 模式。A 组 9 对均为 M, B 组的 No. 1, 2 为 ST, No. 3—5 为 T, C 组由 12 对 m 染色体组成; 地龟 $2n = 52(16M + 4ST + 6T + 26m)$, N.F. = 72, 核型模式为 $8 + 5 + 13$ 。A 组 8 对染色体也均为 M, No. 7 短臂近着丝粒区有一稳定的次缢痕 (图 3)。B 组与马来闭壳龟相似, No. 1, 2 为 ST, No. 3—5 为 T, C 组有 13 对 m 染色体。在这三种龟的雌雄个体间均未发现有异型的性染色体。

以上三种龟分别隶属于曲颈龟亚目 (Cryptodira) 的平胸龟科 (Platysternidae) 和龟科 (Emydidae)。平胸龟是平胸龟科唯一的现存种, Haiduk 等曾分析了北美平胸龟的染色体组型, 高建民等报道福州平胸龟的染色体组型与 Ag-NORs。以上报道与本文的结果相比

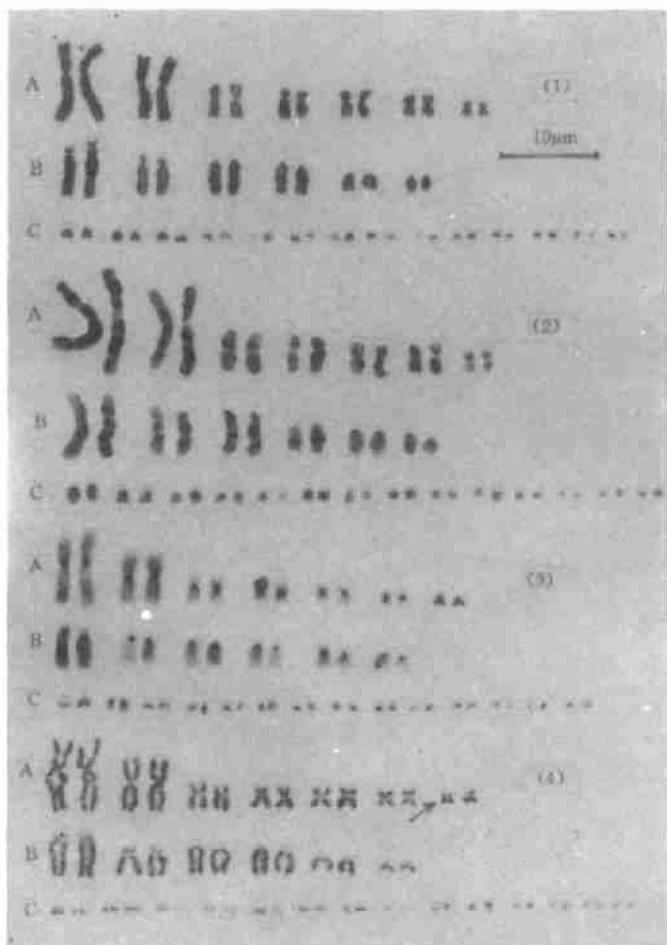


图 3 地龟的染色体组型(1), G-带(2), C-带(3)和 Ag-NORs (4),(箭头示 NOR)

Fig. 3 The karyotype(1), G-banding(2), C-banding(3) and Ag-NORs (4),(the arrow pointed NOR) of *G. spengleri*

较,二倍体数($2n$)均为54,但北美平胸龟的核型模式为 $8+5+14$,其A组多了一对M或SM染色体,B组少了一对T染色体,对照Haiduk等提供的核型图,虽然其染色体偏小,而且文中缺少染色体测量数据,但要将一对大型的T染色体错定为M或SM染色体是不可能的。可见在新、旧大陆两地间的平胸龟核型模式,以及与其相关的染色体总臂数上的差异是明显的。另外,北美平胸龟的一对次缢痕位于A组的最小染色体对的短臂,而本文的次缢痕出现在A组No.6长臂。因此,就这两个不同地理分布群来说,核型中的染色体数相同,而个别染色体对的着丝粒位置不同,其发生机制可能是染色体的臂间倒位,根据次缢痕分布的分析结果,还存在染色体的易位。通常认为核型中含t或st染色体少的类群是较特化的,据此,分布于新大陆的北美平胸龟似乎特化些;与福州分布群相比较,染色体数相同,但高建民等认为福州平胸龟的微小染色体的相对长度有时与最小的大型染色体对很接近,将大型染色体计为11对。本文A组和B组的最后一对染色体相对长度分别为 2.71 ± 0.24 和 2.89 ± 0.11 ,与C组No.1(相对长度 1.81 ± 0.10)差别明显(表1),这从核型

表1 三种龟的核型数据
Tab.1 The karyotypic data of three species of turtle

M1: 中部着丝点染色体 (metacentric); ST: 亚端部着丝点染色体 (subtelocentric); T: 端部着丝点染色体 (telocentric)。

图上也不难看出,因此作者认为大型染色体应为13对。特别是多一对大型双臂染色体,导致染色体总臂数的差异。

在闭壳龟中,已报道核型的有三种(表3),从表中可见三种的 $2n$ 均为52,但有两类模式。在系统演化上,一般龟类动物染色体具有相对的保守性,即在近缘种间,甚至同科的不同属之间的核型差异都较小。而科间差异较明显,这主要表现于染色体数目和形态。但龟科较特殊,如鼻龟属的 *Rhinoclemmys pulcherrima* $2n = 52$,模式 $6 + 5 + 15$ 。而 *R. punctularis* $2n = 56, 6 + 5 + 17^{[13]}$ 。已报道的闭壳龟二倍体染色体数均相同,种间的差异仅表现于染色体的形态,因而核型模式不同。据 Bickham 的研究,分布于旧大陆龟科的 Batagurine 亚科 $2n = 52$,模式为 $9 + 5 + 12$ 的核型是原始的^[14],依此观点,马来闭壳龟是闭壳龟属中较原始的种,而金头闭壳龟和三线闭壳龟则相对较特化。不难推测,其演化机制可能是大型双臂染色体的着丝粒断裂而产生微小染色体,以及微小染色体丢失。

Desmet 曾报道过 *Geoemyda spinosa* (Gray) ♀ 体和 *G. trijuga coronata* (Anderson) ♀ 体两种地龟的核型^[15],这两种的核型差异很大,前者 $2n=52$ ($14M+4SM+2ST+6T+26m$) ,

表2 三种龟的核型资料

Tab.2 Karyotypes of three species of turtle

物种 Species	产地 Locality of collection	$2n$	N. F.	核型模式 Karyotypic formula	次缢痕 (SC)	Ag-NORs
平胸龟 <i>P. megacephalum</i>	安徽 广德	54	72	$7+6+14$	A No.6 q per	A No.7 q ter
马来闭壳龟 <i>C. amboinensis</i>	广西	52	74	$9+5+12$		A No.7 q ter
地龟 <i>G. spengleri</i>	湖南	52	72	$8+5+13$	A No.7 p per	A No.7 q per

p: 短臂(short arm); q: 长臂(long arm); per: 近着丝粒区(pericentric); ter: 端部(terminal)。

表3 三种闭壳龟的核型

Tab.3 Karyotypes of three species of Cuora

物种 Species	产地 Locality of collection	Zn	N. F.	核型模式 Karyotypic formula	次缢痕 (SC)	文献 References
<i>C. amboinensis</i>	美国	52	72	$9+5+12$		A No.9 q ter [18]
金头闭壳龟 <i>C. aurocapitata</i>	安徽南陵	52	72	$8+5+13$	A No.1 p	A No.7 q ter [1]
三线闭壳龟 <i>C. trifasciata</i>	广东	52	72	$8+5+13$		A No.7 q ter [1]
马来闭壳龟 <i>C. amboinensis</i>	广西	52	74	$9+5+12$		A No.7 q ter 本文

N.F.=72(按 Levan 等标准), 后者则为 2n=50(20M+10SM+6ST+2T+12m), N.F.=86。与本文相比较, 我国地龟与 *G. spinosa* 相似。需要指出的是地龟属的近缘种间显著差异是迄今研究过的龟科动物核型在系统演化中的又一特殊性例证。

2.2 G 带型

分析每种龟 10 个中期分裂相, 据剪贴的照片对照显微镜下标本的观察结果, 确定染色体的带纹特征, 结果表明, 三个种的大型染色体均可进行同源配对, 但微小染色体因太小或带纹欠清晰, 较难分析。在 A 组的 No.1—2 上可清楚地看出两种龟科动物的带纹特征一致。与平胸龟比较, A 组的 No.2 基本相似, 而 No.1 不同, 这可作为判定两科动物 G 带差异性的标准之一。但是需要说明的是平胸龟和马来闭壳龟的 No.1—2 染色体标本较长, 带纹相对较清晰, 同源特点较明显。相比之下, 地龟的标本染色体较短, 呈现的带纹有合并现象, 只有在显微镜下才可加以区分和比较。

2.3 C 带型

C 带显示结果表明, 三种龟的着丝粒区的结构异染色质含量丰富, 几乎所有染色体都显示 C 带阳性。除此以外, 平胸龟的 A 组 No.7 呈现整条 C 带阳性, C 组的 No.1, 9 显示了染色体臂端部 C 带阳性; 马来闭壳龟也有一对(C 组 No.1)呈整条结构异染色质化; 地龟除着丝粒 C 带比其他两种相对较弱外, 其 A 组的 No.1, 2, 7 的两臂端部有大面积 C 带纹。

一般在同一物种内, 结构异染色质在染色体上的数量及分布是基本恒定的, 而不同物种间则有所不同^[16], 因此 C 带分析是鉴别不同物种, 特别是近缘种的有效方法。至于平胸龟和马来闭壳龟 C 带型中呈现整条染色体阳性 C 带现象, Bickham 等在研究眼斑水龟 (*Sacalia bealei*) ♂ 和 *Chrysemys scripta elegans* ♀, 以及 Dowler 等在 *Gopherus polyphemus* 中都曾报道过^[17]。最早发现整条染色体呈阳性 C 带的是在鸟类和蛇类的 W 性染色体, 龟类中的整条阳性 C 带染色体是否有与鸟类和蛇类的演化意义? 有待进一步研究。

2.4 Ag-NORs

观察结果表明, 平胸龟和马来闭壳龟的 Ag-NORs 位于 A 组的 No.7 q ter, 地龟位于 A 组 No.7 q per。地龟的 Ag-NORs 异态, 即同源染色体的一条有染色块, 另一条没有。本文研究的平胸龟结果与福州分布群相似, 而马来闭壳龟与金头闭壳龟、三线闭壳龟及 Bickham 等报道的相似^[18], 马来闭壳龟的 Ag-NORs 位于一对小的大型中部着丝粒染色体的长臂端部, 并且在同源染色体间银染色块的面积大小异形。

据统计, 迄今做过核仁组织者银染色研究的龟鳖类已有 30 多种, 结果都仅显示一对 Ag-NORs, 表明此类动物的 18s + 28s rRNA 基因无扩增现象, 但其异态或异形现象则比较普遍, 如 Bickham 等报道的 27 种 43 个体中, 有 31% 呈现异形^[18], 异形上的差异不仅出现在不同物种间, 也存在于同一物种的不同个体之间。说明龟鳖类的 Ag-NORs 同样具有较大的保守性, 但不同物种之间或种内的不同个体之间仍有一些差异, 这主要表现为异态或异形, 它反映了调控核仁形成的结构基因表达活性的变异。

参 考 文 献

- [1] 郭超文,聂刘旺,汪 鸣. 中国四种龟的细胞遗传研究. 遗传学报, 1995, **22**(1): 40—45
- [2] 高建民等. 龟类细胞遗传学的研究Ⅱ. 平胸龟的核型和银染核仁组织者区及其系统发育的意义. 福建师范大学学报(自然科学版), 1988, **4**(2): 77—85
- [3] Bickham J W, Carr J L. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia*, 1983, **4**: 918—932
- [4] Carr J L, J W Bickham. Sex chromosomes of the Asian black pond turtle, *Siebenrockiella crassicollis* (Testudines: Emydidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 1981, **31**: 178—183
- [5] Haiduk M W, Bickham J W. Chromosomal homologies and evolution of testudinoid turtles with emphasis on the systematic placement of *Platysternon*. *Copeia*, 1982, (1): 60—66
- [6] Stock A D, Mengden G A. Chromosome banding pattern conservatism in birds and nonhomology of chromosome banding patterns between birds, turtles, snakes and amphibians. *Chromosoma (Berl.)*, 1975, **50**: 69—77
- [7] Sites J W, et al. Banded karyotypes of six taxa of Kinosternid turtles. *Copeia*, 1979, (4): 692—698
- [8] Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 1971, (2): 971—972
- [9] Sumner A T. A simple technique for demonstrating centromeric hetero-chromatin. *Exp. Cell Res.*, 1972, **75**: 304—306
- [10] Howell W M, Black D A. Controlled silverstaining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experimentia*, 1980, **36**: 1014—1015
- [11] Bickham J W. A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. *Herpetologica*, 1975, **31**(2): 198—204
- [12] Levan A, et al. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, **52**: 201—220
- [13] Bickham J W, Baker R J. Karyotypes of some neotropical turtles. *Copeia*, 1976, (4): 703—708
- [14] Bickham J W, Baker R J. Chromosome homology and evolution of Emydid turtles. *Chromosoma (Berl.)*, 1976, **54**: 201—219
- [15] Desmet W H C. The chromosomes of 11 species of Chelonia (Reptilia). *Acta Zool. Path. Antverpiensia*, 1978, **70**: 15—34
- [16] Yunis J J, Yasminch W G. Heterochromatin, Satellite DNA and cell function: Structural DNA of eucaryotes may support and protect genes and aid in speciation. *Science*, 1971, **174**: 1200—1209
- [17] Dowler R C, Bickham J W. Chromosomal relationships of the tortoises (family Testudinidae). *Genetica*, 1982, **58**: 189—197
- [18] Bickham J W, Rogers D S. Structure and variation of the nucleolus organizer region in turtles. *Genetica*, 1985, **67**: 171—184

A CYTOGENETIC STUDY ON THREE SPECIES OF TURTLE

Guo Chaowen, Wang Ming and Nie Liuwang

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

Abstract The conventional karyotypes, G-bands, C-bands and Ag-NORs of three species of turtles have been studied. *Platysternon megacephalum* Gray has $2n = 54(14M + 4ST + 8T + 28m)$, N.F. = 72, $7 + 6 + 14$ (Karyotypic formula). The No. 6 chromosome of group A has a secondary constriction (SC) in the q per. The Ag-NORs are on the No. 7 q ter of group A; *Cuora amboinensis* (Daudin) has $2n = 52(18M + 4ST + 6T + 24m)$, N.F. = 74, $9 + 5 + 12$. There are a pair of Ag-NORs in the No. 7 q ter of group A; *Geoemyda spengleri* Gmelin has $2n = 52(16M + 4ST + 6T + 26m)$, N.F. = 72, $8 + 5 + 13$. The No. 7 p per of group A has a SC. The Ag-NORs with hereromorphic phenomenon located on the No. 7 q per of group A.

All of the centromeric regions of the chromosomes showed staining of C-positive for these three species. Besides this, the telomeric C-bands was found at the No. 1 q ter of group A and the Nos. 2,7 p q ter of group C in *G. spengleri*. The No. 7 chromosome of group A of *P. megacephalum* and the No. 1 chromosome of group C of *C. amboinensis* showed whole staining of C-positive.

The chromosomes of G-banded were analyzed. The results show that each homologous pair has its own special G-banded patterns, so is possible to be paired in the karyotype.

Key words Turtle, Karyotype, G-band, C-band, Ag-NORs