

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.02.003

四川卧龙自然保护区华西蟾蜍的核型和Ag-NORs 研究

董丙君^{1,2}, 江帆³, 赵尔宓^{1,3*}

(1. 四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064; 2. 沈阳师范大学化学与生命科学学院, 沈阳 110034; 3. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘要:采用常规骨髓细胞制片法对产于卧龙自然保护区华西蟾蜍的核型及 Ag-NORs 位点进行了观察和分析。结果表明卧龙自然保护区蟾蜍与大部分蟾蜍相同: $2n = 22$, $NF = 44$, 为 $6 + 5$ 核型模式。核型为 $20M + 2SM$, 次缢痕较为明显, 位于第 6 对染色体(其中的一条)长臂末端, NORs 位于次缢痕位置即 $6q^{ter}$ 。通过与我国中华蟾蜍种组的核型及 Ag-NORs 位点等细胞学信息比较分析, 不支持卧龙自然保护区卧龙蟾蜍和沙湾蟾蜍为有效种, 其可能是华西蟾蜍的次级同物异名。

关键词: 卧龙地区; 华西蟾蜍; 核型; Ag-NORs

中图分类号: Q959.5; Q343.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2011)02-0170-03

Cytogenetic Studies on *Bufo andrewsi* in Wolong Nature Reserve

DONG Bing-jun^{1,2}, JIANG Fan³, ZHAO Er-mi^{1,3*}

(1. Key Laboratory for Bio-resources and Eco-environment (Ministry of Education), College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. College of Chemistry and Life Sciences, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China; 3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: In this work, we present cytogenetic data on the toads in Wolong Nature Reserve for the first time. The karyotype and NORs localities were described and compared with other toads. Toads in Wolong Nature Reserve had similar cytogenetic information to the toads of *Bufo gargarizans*, which had 22 chromosomes: $2n = 22$, with 6 large-sized pairs and 5 small-sized pairs, and $NF = 44$. The karyotype was $20M + 2SM$, and secondary constriction was also observed on the end region of the long-arms of the sixth pairs of chromosomes. Ag-NORs were located at $6q^{ter}$. *B. wolongensis* and *B. kabischi* in Wolong Nature Reserve were not valid species in comparison with other toads.

Key words: Wolong Nature Reserve; *Bufo andrewsi*; karyotype; Ag-NORs

卧龙蟾蜍 *Bufo wolongensis* 和沙湾蟾蜍 *B. kabischi* 为 Herrmann 和 Kuhnel (1997) 首次报道, 模式产地为四川省成都市西北部卧龙自然保护区, 模式标本现保存于维也纳自然历史博物馆(奥地利)。据报道, 卧龙蟾蜍采自皮条河(Pitiao River)岸边, 海拔 1400 m; 沙湾蟾蜍则是采自相距不远的林缘北坡, 海拔 1800 m。Herrmann 和 Kuhnel (1997) 从成体的外部形态、骨骼特征和皮肤显微结构等方面特征将其鉴定为两个新种, 隶属于中华蟾蜍种组(*B. gargarizans* group)。

新种自发表后至今尚无相关报道。因为两新种分布区及海拔与华西蟾蜍 *B. andrewsi* 大致相同, 且外部形态等特征与华西蟾蜍很难区分, 因此有效性

一直受到质疑, 一些学者认为是华西蟾蜍的同物异名(与吴贯夫个人通讯)。虽然这两个新种的有效性存在争议, 但鉴于缺少相关的证据, 有的学者将其列为有效种(赵尔宓等, 2000; Frost, 2009); 而另一些学者则并不承认是有效种, 但没有给出具体的解释(费梁等, 2005)。

为了进一步明确卧龙地区蟾蜍的细胞学分类特征, 本文对其核型和 Ag-NORs 进行了研究。

1 材料与方法

卧龙地区蟾蜍采自四川省卧龙自然保护区(图 1, 正方形表示采样点), 经鉴定为华西蟾蜍, 随机抽取 2 ♂ 2 ♀ 进行染色体制片。

收稿日期: 2010-07-06 接受日期: 2010-09-01

作者简介: 董丙君(1977~), 男, 博士, 主要从事两栖爬行动物学研究, E-mail: dongbingjun@synu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zem007@126.com

致谢: 河南科技大学熊建利博士协助标本采集, 沈阳师范大学王丽同学帮助处理数据, 在此一并致谢!

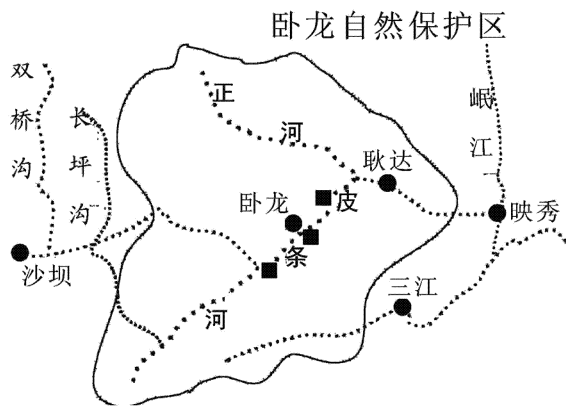


图 1 本研究采样点图(正方形黑框)
Fig. 1 Map of the sampling sites in this study

染色体标本制作采用常规骨髓细胞蒸汽固定法(吴政安,1982);Ag-NORs 染色采用快速、简便的核仁组织区的一步染色法(谭安鸣等,1986);OLYMPUS B50-DP70 数码摄像显微镜观察,计数 100 个中期分裂相,确定其二倍体数;核型分析选择 10 个分散好、图像清晰的分裂相,拍照、放大、测量,利用 SPSS 13.0 统计软件计算染色体的相对长度、臂比和着丝粒指数,并进行数据的统计分析。染色体类型的划分参照 Levan(1964)。

2 结果

2.1 体细胞染色体数目

通过对 100 个骨髓细胞中期分裂相的观察与计数,卧龙地区华西蟾蜍的体细胞染色体数目为 $2n = 22$,

NF = 44(封 2,图 2)。

2.2 核型分析

卧龙地区蟾蜍染色体组型如图 3(封 2)和表 1。由表 1 可见,除 No. 4 为亚中部着丝粒染色体(SM)外,其余 10 对均为中部着丝粒染色体(M)。根据染色体相对长度,可将卧龙地区蟾蜍的染色体分为 A、B 两组。A 组包括 No. 1 ~ 6,为大型染色体;B 组包括 No. 7 ~ 11,为小型染色体。核型模式为: $20M + 2SM$ 。

在 A 组的 6 对大型染色体中,由于 No. 4 属于 SM 型,故很容易与其他 5 对区分。No. 1 是整个染色体中最长的,虽与 No. 2 只相差 0.66,二者仍能区分, No. 3 和前两者差别较大,能够区分。No. 5 和 No. 6 对染色体同属 M 型染色体,长度差异为 1.23,也能够区别;B 组的 5 对染色体相对 A 组的 6 对来说,在相对长度的数值上较为接近(最大差值仅为 1.38),但相邻染色体在相对长度的数值上仍然具有显著性差异($P < 0.05$)。在所观察卧龙地区蟾蜍的分裂相中,均未发现雌、雄异型性染色体。

2.3 银染

银染结果显示:在 No. 6 染色体中(只出现在其中一条染色体上)的长臂末端,存在明显的深染部分,即核仁组织区(NORs)的存在位点,标记为 $6q^{ter}$ (封 2,图 4),这也是次缢痕所在位置,没有发现其他的 NORs。

表 1 卧龙地区蟾蜍核型数据
Table 1 Data analysis of karyotype in this study

染色体组(Group)	No.	相对长度(RL)	着丝粒指数(CI)	臂比(AR)	染色体类型(Type)
A	1	15.30 ± 0.73	45.28 ± 1.30	1.21 ± 0.07	M
	2	14.64 ± 0.49	44.55 ± 1.61	1.25 ± 0.08	M
	3	12.75 ± 0.76	41.55 ± 2.59	1.41 ± 0.14	M
	4	11.62 ± 0.77	36.42 ± 0.99	1.75 ± 0.08	SM
	5	10.98 ± 0.74	45.48 ± 3.66	1.21 ± 0.19	M
	6	9.75 ± 0.56	44.60 ± 2.86	1.25 ± 0.15	M
B	7	5.62 ± 0.23	46.03 ± 2.46	1.18 ± 0.12	M
	8	5.41 ± 0.26	44.18 ± 3.54	1.28 ± 0.19	M
	9	5.27 ± 0.33	46.25 ± 2.32	1.17 ± 0.11	M
	10	4.45 ± 0.37	46.80 ± 1.83	1.14 ± 0.09	M
	11	4.24 ± 0.31	47.19 ± 1.89	1.12 ± 0.09	M

3 讨论

通过对卧龙地区蟾蜍核型分析,和吴政安(1982)报道的中华大蟾蜍 *B. bufo gargarizans*、刘万兆和杨大同(1997)报道的云南喜山蟾蜍 *B. himalayanus* 和黑眶蟾蜍 *B. melanostictus*、李树深

(1992)报道的云南哀牢蟾蜍 *B. ailaoanus*、马军(1998)报道的广西黑眶蟾蜍 *B. melanostictus*、尚克刚等(1984)报道的北京花背蟾蜍 *B. raddei* 相同,它们的体细胞染色体数都是 $2n = 22$,由 6 对大型染色体和 5 对小型染色体组成,进一步说明了蟾蜍科动物核型的保守性。但也能够看出,它们在相对长度、臂

比、着丝粒的位置等方面有差异,即使是同一物种,在核型组成和染色体类型方面不同研究也存在不同,有的学者解释为地理环境差异或是亚种分化(董自梅等,2004),但本文作者认为很可能是实验误差造成的。制作染色体操作不同、数据处理分析方法不同等会影响实验结果。卧龙地区蟾蜍与已有研究的蟾蜍核型相同,体细胞染色体数目为 $2n = 22$, $NF = 44$ 。第 4 对染色体为 SM 型染色体,而以往对蟾蜍染色体的研究也表明,中华蟾蜍、华西蟾蜍第 4 对染色体都为 SM 型,能够看出蟾蜍属中第 4 对染色体还是相对保守的。

原位分子杂交证明,Ag-As 技术所显示的核仁组织区(Ag-NORs)为 18S + 28S rRNA 基因分布区。一些研究表明,通常状况下,Ag-NORs 位于次缢痕区域,在不同的种间,Ag-NORs 数目和位置也有很大变化,但看不出严格的种特异性。杨玉华(1983)对中华蟾蜍种组的中华蟾蜍、岷山蟾蜍 *B. minshanicus* 和华西蟾蜍的 Ag-NORs 进行研究,Ag-NORs 都位于第 6 号染色体长臂末端,没有发现额外的 NORs。我们对卧龙地区蟾蜍的 Ag-NORs 研究表明,Ag-NORs 同样位于第 6 号染色体长臂的末端,该位置也是次缢痕位置所在,同样没有发现额外的 NORs,说明这 4 个种的亲缘关系较近。

蟾蜍属物种的外部形态相当保守。尤其是中华蟾蜍种组成员,中华蟾蜍和华西蟾蜍这两个种(亚种)外部形态极为相似,二者之间的关系一直存在争议。华西蟾蜍自订立新种后不久,Pope 和 Boring (1940)认为是大蟾蜍 *Bufo bufo* 的同物异名,刘承钊和胡淑琴(1961)恢复 *andrewsi*,但认为是 *Bufo bufo* 的一个亚种。此后,华西蟾蜍与分布于我国的另外 2 种中华蟾蜍和岷山蟾蜍长期被认为是大蟾蜍的 3 个亚种。杨玉华(1983)研究了我国中华蟾蜍种组中争论较多的 3 种(亚种)的分类地位问题,认为中华蟾蜍和华西蟾蜍的亲缘关系较近,应保留亚种级关系,而岷山蟾蜍和前两者亲缘关系较远,应为种级关系。胡其雄等(1984)对我国蟾蜍属的分类进行了研究,认为华西蟾蜍与中华蟾蜍在形态上差异显著,分布区和中华蟾蜍有很大部分重叠,在垂直分布上也有重叠,二者呈现同域分布,认为华西蟾蜍为独立种。Liu 等(2000)的细胞遗传和分子进化研究结果认为华西蟾蜍等应该为各自有效的独立种。费梁等(2005)将华西蟾蜍和岷山蟾蜍分别作为中华蟾蜍的亚种。Fu 等(2005)通过 DNA 测序和同功酶电泳分

析认为华西蟾蜍等几个相近种并不存在亚种间的分化,应统一为 *B. gargarizans*。Frost (2009)在“Amphibian species of the world 5.0”中将这 3 个种(亚种)都列为有效种。

作者在卧龙蟾蜍和沙湾蟾蜍的模式标本产地共采集到 28 只蟾蜍,经鉴定都为华西蟾蜍,且核型和 Ag-NORs 也符合华西蟾蜍的细胞学分类特征,因此认为四川卧龙自然保护区卧龙蟾蜍和沙湾蟾蜍很可能是误定,应是华西蟾蜍的同物异名。

4 参考文献

- 董自梅,周洁,常重杰. 2004. 河南花背蟾蜍的核型、C-带和 Ag-NORs 研究[J]. 动物学杂志, 39(1): 29 ~ 35.
- 费梁,叶昌媛,黄永昭,等. 2005. 中国两栖动物检索及图解[M]. 成都:四川科学技术出版社.
- 胡其雄,江耀明,田婉淑. 1984. 我国蟾蜍属的分类研究[J]. 两栖爬行动物学报, 3(1): 79 ~ 85.
- 李树深. 1992. 哀牢蟾蜍和新疆绿蟾蜍的核型、C-带和 Ag-NORs 研究[J]. 遗传, 14(5): 11 ~ 13.
- 刘承钊,胡淑琴. 1961. 中国无尾两栖类[M]. 北京:科学出版社.
- 刘万兆,杨大同. 1997. 云南西部高黎贡山两种蟾蜍的核型、C-带和 Ag-NORs 研究[J]. 两栖爬行动物学研究, (6-7): 1 ~ 4.
- 马军. 1998. 广西黑眶蟾蜍核型及 Ag-NORs 研究[J]. 广西医科大学学报, 15(4): 14 ~ 16.
- 尚克刚,李士鹏,金昊. 1984. 花背蟾蜍的核型分析[J]. 遗传学报, 11(1): 52 ~ 60.
- 谭安鸣,吴政安,赵尔宓. 1986. 快速、简便的核仁组织区(Ag-NORs)的一步染色法[J]. 两栖爬行动物学报, 5(1): 72 ~ 74.
- 吴政安. 1982. 两栖类骨髓细胞的染色体标本的制作方法[J]. 遗传, 4(1): 38 ~ 39.
- 杨玉华. 1983. 我国大蟾蜍三个亚种的 C-带, Ag-NORs 以及血清蛋白、乳酸脱氢酶(LDH)同工酶电泳的比较研究[J]. 两栖爬行动物学报, 2(3): 1 ~ 10.
- 赵尔宓,张学文,赵蕙,等. 2000. 中国两栖纲和爬行纲动物校正名录[J]. 四川动物, 19(3): 196 ~ 207.
- Frost DR. 2009. Amphibian Species of the World 5.3, online reference[EB/OL]. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>
- Fu JZ, Weadick CJ, Zeng XM, et al. 2005. Phylogeographic analysis of the *Bufo gargarizans* species complex: A revisit[J]. Mol Phylogenet Evol, 37: 202 ~ 213.
- Herrmann HJ, Kuhnle KD. 1997. Zwei neue Arten der *Bufo bufo* superspecies aus der Provinz Sichuan, SW-China[J]. Sauria, 19(4): 31 ~ 40.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 52: 201 ~ 220.
- Liu WZ, Lathrop A, Fu JZ, et al. 2000. Phylogeny of East Asian bufonids inferred from mitochondrial DNA sequences (Anura: Amphibia) [J]. Mol Phylogenet Evol, 14: 423 ~ 435.
- Pope CH, Boring AM. 1940. A survey of Chinese amphibian. Peking Nat Hist Bull, 15(1): 13 ~ 18.