

188-192

5

云南兔(*Lepus comus*)的染色体研究

陈志平 王应祥 刘瑞清
(中国科学院昆明动物研究所, 昆明, 650223)

Q 959.836

摘 要

本文以染色体分带技术(G-, C-带和银染色), 对云南兔(*Lepus comus*)的核型进行了观察分析。结果表明: $2n = 48$, $NF = 88$ 。常染色体由6对端着丝粒染色体, 5对亚端着丝粒染色体, 10对亚端着丝粒染色体和2对端着丝粒染色体组成; X染色体为亚端着丝粒染色体。除少数几对染色体(Nos.9,14,16,20)着丝粒C-带呈阴性外, 其余均呈阳性或浅染, 但异染色质的含量差异较大。Ag-NORs的数目为5-6个, 分别位于Nos.17,19,21。通过与兔科其它属种核型的比较, 对其染色体进化作了讨论。

关键词 云南兔; 染色体带型; 核型进化 染色体. 核型

云南兔(*Lepus comus*)是分布于云贵高原和滇西地区唯一的一种野兔(王应祥等, 1985), 最初由Allen(1927)定名为一个种, 尔后(1938年)他又将其划归为高原兔(*Lepus oiostolus*)的一个地理亚种。后来国内外学者对云南兔究竟是独立的种抑或是高原兔的地理亚种, 一直意见纷纭(高耀亭等, 1964; 罗泽珣, 1981,1988; 王应祥等, 1985; Ellerman等, 1951; Angermann, 1967; Corbet, 1978, 1980)。尽管国外学者对兔属不少种类的核型进行了研究, 但国内对该属动物的染色体研究还很不充分。本文首次报道了云南兔的常规核型和G-带、C-带及银染核仁组织者(Ag-NORs)的数目和分布, 并与兔科其它属种的核型进行了比较分析, 为我国兔属动物的分类鉴定与系统进化研究提供细胞遗传学依据。

材料和方法

1. 实验动物

成年雌性云南兔(*Lepus comus*) 2只, 捕于云南马龙县。

2. 方法

(1)肺成纤维细胞培养和骨髓细胞短期培养 在无菌条件下取出云南兔的肺组织, 剪碎后胰酶消化, 在含15%小牛血清的日本“199”培养液里进行培养(37.5℃)。待细胞贴壁长成单层后, 连续传代培养。传代后24-36小时, 用0.25%胰酶(Difco 1:250)消化收获细胞。在收获细胞前1.5小时加秋水仙素(终浓度为0.2微克/毫升, 常规空气干燥法制染色体标本。骨髓细胞在相同的培养液里培养5小时(37.5℃), 于收获细胞前1.5

本文于1991年7月15日收到, 1992年9月21日收到修改稿。

4314

小时加入秋水仙素(终浓度为0.5微克/毫升),常规空气干燥法制染色体标本。

(2) G-带按Scabright(1971)方法,稍加修改。片龄1周左右,置37℃温箱中过夜后,以0.025%胰蛋白酶溶液处理约1分钟(室温),PBS洗2次,凉干,Giemsa染色。

(3) C-带参照Sumner(1972)方法,先将染色体标本放入0.2N HCl中处理30分钟,再以5%Ba(OH)₂,54℃,处理7—10分钟,水洗,置入2×SSC液中,60℃,孵育2—5小时。水洗,凉干,Giemsa染色。

(4) 核仁组织者(NORs)硝酸银染色参照Howell等(1980)方法。先配两种溶液,(a)2%白明胶溶液(内含1%甲酸),(b)50%AgNO₃水溶液。染色时在染色体标本上滴加(a)液2滴、(b)液4滴,盖以洁净的22×50(毫米)盖玻片,置60℃烤箱中染至金黄色,镜检。当染色体呈棕黄色,核仁组织者呈黑色时即可,蒸馏水冲洗,凉干。必要时,利用同一分裂相先作常规核型染色,拍照后褪色,再以硝酸银染色。

(5) 核型分析 选取10个分散较好的中期分裂相摄影、测量,按Levan等(1964)标准确定染色体的形态类型。

结 果

1. 常规核型

云南兔染色体数目的统计和测量结果分别列于表1和表2。

表1 云南兔二倍体染色体数目统计

Table 1 The counts of diploid chromosome number of Yunnan hare

动物编号 Animal No.	性别 Sex	观察细胞数 No. of cells observed	染色体数目 Number of chromosome				
			<47	47	48	49	>49
I	♀	70	2	7	59	2	0
I	♀	60	1	4	53	1	1

表2 云南兔的核型测量数据

Table 2 The measuring data of karyotype of Yunnan hare

No.	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	着丝点位置 Location of centromere	No.	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	着丝点位置 Location of centromere
1	6.18±0.24	1.58±0.10	M	13	6.02±0.05	3.92±0.08	ST
2	4.78±0.09	1.42±0.11	M	14	5.60±0.12	4.95±0.16	ST
3	4.65±0.08	1.69±0.08	M	15	5.16±0.13	6.60±0.12	ST
4	4.43±0.08	1.43±0.01	M	16	4.65±0.08	3.85±0.06	ST
5	2.28±0.15	1.36±0.01	M	17	4.27±0.12	6.82±0.18	ST
6	2.21±0.13	1.38±0.01	M	18	3.81±0.17	3.66±0.08	ST
7	5.10±0.21	2.31±0.13	SM	19	3.70±0.18	4.05±0.12	ST
8	4.76±0.14	1.82±0.09	SM	20	3.47±0.14	6.68±0.09	ST
9	3.61±0.08	2.05±0.02	SM	21	3.19±0.08	4.60±0.08	ST
10	3.46±0.10	1.88±0.08	SM	22	1.76±0.08		A
11	2.80±0.16	2.11±0.10	SM	23	1.32±0.05		A
12	6.60±0.09	4.10±0.07	ST	X	6.16±0.16	2.34±0.07	SM

从表1可以看出,在计数的130个中期细胞中,含48条染色体的细胞约占86.1%,因此可以确定云南兔二倍体染色体数目为2n=48。常染色体中有6对(Nos.1—6)中着

丝点染色体, 5对(Nos. 7—11)亚中着丝点染色体, 10对(Nos. 12—21)亚端着丝点染色体和2对(Nos. 22, 23)端着丝点染色体。X染色体为一较大的亚中着丝点染色体(表2)。此外, 在Nos. 17, 19, 21染色体短臂近着丝点区均有一个不很明显的次缢痕(图版I-A)。

2. G-带核型

云南兔的每条染色体都显示出特有的带纹, 因而可使同源染色体能正确地一一配对。在较长的染色体长臂上一般有2—4条深带和2—3条浅带, 短臂上仅有1—2条深带和1条浅带。X染色体长臂上有4条深带和3条浅带, 短臂具1条深带1条浅带(图版I-C)。

3. C-带核型

云南兔的C-带核型中, Nos. 9, 14, 16, 20染色体的着丝点C-带呈阴性, 其余染色体着丝点区均有结构异染色质分布, 只是含量的差异较大, 如Nos. 1—5, 7, 8, 11, 22染色体的着丝点C-带异染色质相对较为丰富, 而Nos. 13, 15, 18染色体的着丝点C-带则呈很弱的阳性。X染色体的着丝点C-带浅染。未发现插入异染色质、端位异染色质和异染色质短臂(图版I-D)。

4. 银染核仁组织者(Ag-NORs)的数目和分布

通过45个分裂相的观察计数, 发现云南兔的核型中有5—6个Ag-NORs, 分布于Nos. 17, 19, 21染色体的次缢痕区域。在一些细胞(50%)中, No. 21染色体的Ag-NORs呈多态性, 即两条同源染色体中一条染色体银染呈阳性, 另一条呈阴性(图版I-B)。

讨 论

云南兔究竟是独立的种或是高原兔的云南亚种, 长期存在争议。王应祥等(1985)认为云南兔是一独立种。罗泽珣(1988)依据形态特征(上门齿沟原形的丫字形断面形状等)认为: 云南兔、海南兔(*Lepus hainanus*)、印度黑颈兔(*L. nigricollis*)、缅甸兔(*L. peguensis*)和泰国兔(*L. siamensis*)的亲缘关系较近, 将它们归于印度兔亚属(*Indolagns*)。比较云南兔和印度黑颈兔的常规核型, 发现尽管二者的染色体数目一致($2n=48$), 但核型中染色体的形态则不尽相同; 前者 $NF=88$, 后者 $NF=80[6(M)+28(SM+ST)+12(A), XY(SM, A)]$ (Sharma等, 1975)。由于目前这些种类多数尚无常规核型和分带核型可以比较, 因此在细胞水平上它们之间的关系究竟如何, 有待进一步研究。

Robinson等(1983)通过对兔属(*Lepus*) 6个种的G-、C-带的比较研究, 发现它们之间没有明显的差异, 推测该属在其散布和物种的分化过程中, 基本不包含核型方面的变化。已有的研究资料表明: 兔科其它一些属种尽管 $2n$ 数目不同, 但它们的G-带同源性很高。通过G-带带纹的比较分析, 发现 $2n$ 数目的减少主要由于罗伯逊融合造成的(Stock, 1976; Schroder等, 1978a, b; Robinson, 1980; Robinson等, 1981)。我们比较了云南兔和这些分布于美洲及欧洲类群的G-带核型, 发现它们的G-带带纹也基本一致。可见兔科各类群间的G-带同源性很高。

Robinson等(1983)根据已有的资料总结出兔属具有较少的结构异染色质, 我们的结果也与之有类似之处。但是, 尽管总体上讲云南兔的结构异染色质数量较少, 可着丝点C-带呈阴性的染色体对数并不太多(Nos. 9, 14, 16, 20)。我们把云南兔与同属其他种的C-带核型进行了比较, 发现它们之间仍有一些区别。Robinson等(1981)报道了*L. cratachayi*的C-带核型, 其中有11对(Nos. 1, 2, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 18, 22, 23)染

染色体着丝点C-带呈阴性, 还有7对(Nos. 5, 6, 8, 14, 19, 20, 21)同源染色体的着丝点C-带均是一条呈阳性, 另一条呈阴性。X和Y染色体的着丝点异染色质也很少, 没有发现插入、端位异染色质和异染色质短臂。*Lepus capensis*的C-带核型中着丝点异染色质也极少(Robinson等, 1983)。Stock(1976)报道了*L. americanus*的C-带核型, 其着丝点异染色质明显多于*L. crawshayi*和*L. capensis*。而云南兔的结构异染色质比*L. americanus*的还要稍丰富一些, *L. townsendii*的着丝点异染色质则相对更为丰富(Robinson等, 1983)。这说明尽管兔属种类在G-带上同源性很高, 但一些种类的染色体C-带确实存在差异。此外, 本属与兔科其它属种相比, 异染色质的数量和分布同样存在一定的差异(Stock, 1976; Robinson, 1980; Robinson等, 1981; Robinson等, 1983; Robinson等, 1983; Robinson等, 1984)。如棉尾兔属的*Sylvilagus bachmani*的C-带核型中, 所有染色体着丝点C-带均呈阳性, 异染色质较为丰富。而穴兔属的*Ochotona princeps*的C-带核型中, 所有染色体着丝点C-带都呈强阳性, 异染色质更为丰富, 每条染色体均有大块的深染区出现(Stock, 1976)。看来, 兔类的核型演化过程中除罗伯逊融合外, 异染色质的变化可能也是其核型进化的一个途径。

参 考 文 献

- 王应祥, 罗泽珣, 冯祚建. 1985. 云南兔*Lepus comus* Allen的分类订正. 动物学研究, 6(1):101—109.
- 罗泽珣. 1981. 我国野兔分类检索表. 野生动物, (1):12—13.
- 罗泽珣. 1988. 中国野兔. 林业出版社.
- 高耀亭, 冯祚建. 1984. 中国灰尾兔亚种的研究. 动物分类学报, 1(1):19—28.
- Allen G M. 1927. Lagomorpha collected by the Asiatic Expeditions, Amer Mus Nat Novitates 283:8—9.
- Allen G M. 1938. The mammals of China and Mongolia. Part I, 573—578. Amer Mus Nat Hist, New York.
- Corbet G B. 1978. The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review. London and Ithaca, Cornell University Press, 73.
- Corbet G B, Hill J E. 1980. A world list of mammalian species. London and Ithaca, Cornell University Press, 197—198.
- Ellerman J R, Morrison-Scott T C S. 1951. Checklist of Palaearctic and Indian Mammals. Brit Mus (Nat. Hist.), 432.
- Howell W M, Black D A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36:1014—1015.
- Levan A, Freoga K, Sanberg A A. 1964. Nomenclature for centomeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201—220.
- Robinson T J. 1980. Comparative chromosome studies in the family Leporidae (Lagomorpha, Mammalia). *Cytogenet. Cell Genet*, 28:64—70.
- Robinson T J, Elder F F B, Lopez-Forment W. 1981. Banding studies in the volcano rabbit, *Romerolagus diazi* and Crawshay's hare *L. crawshayi*. Evidence of the Leporid ancestral karyotype. *Can J Genet. Cytol*, 23:468—474.
- Robinson T J, Skinner J D. 1983. Karyology of the riverine rabbit, *Bunolagus monticularis*, and its taxonomic implications. *J Mammal*, 678—681.
- Robinson T J, Elder, F F B, Chapman J A. 1983. Karyotypic conservatism in the genus *Lepus* (order Lagomorpha) *Can J Genet Cytol*, 25:540—544.
- Robinson T J, Elder, F F B, Chapman J A. 1984. Evolution of chromosomal variation in cottontails, genus *Sylvilagus* (Mammalia, Lagomorpha). *Cytogenet. Cell Genet*, 38:282—298.
- Seabright M A. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 11:971—972.
- Schroder J, Suomalainen H, van der Loo W, Schoder E. 1978a. Karyotypes in lymphocytes of two strains of rabbit and species of hares. *Hereditas*, 88:183—188.
- Schroder J, Antoni J, van der Loo W. 1978b. Comparison of the karyotypes in the Jack rabbit (*Lepus californicus deserticola*) and the European hare (*Lepus europaeus*). *Hereditas*, 89:134—135.

- Sharma G P, Honda S M, Ashwani K. 1975. Analysis of chromosomes in the hare, *Lepus nigricollis* Cuvier. *Mammal Chrom Newsl.* 16:168.
- Stock A D. 1976. Chromosome banding pattern relationships of hares, rabbits and pikas (Order Lagomorpha). *Cytogenet. Cell Genet.* 17:78-88.
- Sumner A T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75:304-306.

STUDIES ON THE CHROMOSOMES OF YUNNAN HARE (*LEPUS COMUS*)

CHEN Zhiping WANG Yingxiang LIU Ruiqing
(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica, Kunming, 650223*)

Abstract

The karyotype of Yunnan hare (*Lepus comus*) has been studied by banding techniques (G-, C-banding) and silver staining. The number of diploid chromosome is 48, autosomes consist of 6 pairs of metacentrics, 5 pairs of submetacentrics, 10 pairs of subtelocentrics and 2 pairs acrocentrics, X is a larger submetacentric. And very faint secondary constrictions is found on pairs 17, 19, 21.

The G-banded, C-banded and silver-stained karyotypes have been observed. The chromosomal homologies of genus *Lepus* are high by comparing their G-banded karyotypes. The centromeric heterochromatin is found in all chromosomes except Nos. 9, 14, 16, 20, whereas the centromeric C-bands of Nos. 13, 15, 18 are very faintly stained. The sequential studies of conventional and silver-stained karyotypes show Ag-NORs at the faint secondary constrictions of Nos. 17, 19, 21. The Polymorphism of Ag-NORs of No. 21 is found. And the karyotype evolution of Leporidae has been discussed by comparison with other species.

Key words Yunnan hare; Banding patterns of chromosomes; Karyotype evolution

欢迎订阅1994年《农业科技通讯》

《农业科技通讯》是中国农业科学院主办的中央级农牧业综合性科技期刊，面向全国，面向生产，报道农牧业新成果，新产品，传播最新致富技术和信息。

《农业科技通讯》为月刊，每期定价2.00元，全年定价24元。全国各地邮局自10月下旬开始办理订阅手续，邮发代号：2-602。

读者对象：农牧业科技人员、推广人员、基层干部、科技户、专业户、农村青年、院校师生和与农业有关的人员。