

团花锦蛇、绿锦蛇和三索锦蛇的核型及 Ag-NORs *

罗 静 王蕊芳 熊郁良¹ 吴世芳 王婉瑜¹ 李东升¹ 朱绍文¹ 张亚平* *

(中国科学院昆明动物研究所分子与细胞研究开放实验室,

¹中国科学院昆明动物研究所毒素室 昆明 650223)

摘 要 报道了锦蛇属团花锦蛇(*E. davidi*)、绿锦蛇(*E. prasina*)和三索锦蛇(*E. radiata*) 3个种的核型和 Ag-NORs。团花锦蛇的核型 $2n = 3(8V + 6sV + 2I + 20M)$, 绿锦蛇的核型 $2n = 3(7V + 7sV + 2I + 20m)$, 三索锦蛇的核型 $2n = 4(6V + 3sV + 2sI + 5I + 24m)$; ①团花锦蛇和绿锦蛇的染色体数目和结构与此属大多数种的相似; ②此属种类的性染色体为 ZW 型, 绿锦蛇的性染色体为第 4 对大染色体, 三索锦蛇的为第 5 对大染色体, 团花锦蛇由于为雄性, 未见染色体异型。③Ag-NORs 在数目及在染色体上的位置均不相同, 团花锦蛇的 NORs 在第 9 对染色体上, 数目为 2 个, 绿锦蛇的 NORs 在第 5 对染色体上, 数目为 4 个, 三索锦蛇的 NORs 在第 4 对大染色体上, 数目为 4 个。④我们发现三索锦蛇较为特殊, 其染色体数目、形态、性染色体的位置和形态及 Ag-NORs 均与其它种类不同, 可能的原因是此物种在核型演化过程中发生过染色体断裂和重排事件, 提示三索锦蛇可能是一个特化的类群。⑤锦蛇属的种类可分为包括三索锦蛇为特殊的一组的 4 个组。图版 1 表 2 参 18

关键词 核型; Ag-NORs; 染色体演化; 团花锦蛇; 绿锦蛇; 三索锦蛇

CLC Q342.22 : Q959.620.3

KARYOTYPES AND Ag-NORs OF *ELAPHE PRASINA*, *E. DAVADI* AND *E. RADIATA* ELAPHE (REPTILIA : COLUBRIDAE)

LUO Jing, WANG Ruifang, XIONG Yuliang¹, WU Shifang,
WANG Wanyu¹, LI Dongsheng¹, ZHU Shaowen¹, & Zhang Yaping* *

(Lab. of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology;

¹ Lab. of Animal Toxicology, Kunming Institute of Zoology, Kunming 650223)

Abstract Karyotypes and Ag-NORs of 3 species; *Elaphe prasina*, *E. davadi* and *E. radiata* female were reported. The karyotypes of *E. prasina* and *E. davadi* were $2n = 8V + 6sV + 2I + 20M$ (male) and $2n = 7V + 7sV + 2sI + 20m$ (female), respectively. The karyotype of *E. radiata* was $2n = 6V + 3sV + 2sI + 5I + 24m$. Considering other species in *Elaphe*, the results suggested that: ① the numbers and morphological structures of *E. prasina* and *E. davadi* were homomorphic as those of most species in this genus; ② Sex chromosomes of the 3 species were heteromorphic which resulted from Z and W differences in chromosome sizes and centromere positions; ③ The numbers and positions of NORs in the 3 species were different. ④ *E. radiata* was distinct at chromosomal level. The differences in its karyotype, sex chromosomes and the NORs may suggest abrupt chromosomal event in the evolution of *E. radiata*. ⑤ The species in *Elaphe* could be divided into 4 groups including *E. radiata* as a specific group. Fig 1, Tab 2, Ref 18

Keywords karyotype; Ag-NORs; chromosome evolution. *E. prasina*; *E. davadi*; *E. radiata*

CLC Q342.22 : Q959.620.3

锦蛇属 (*Elaphe*) 隶属游蛇科 (Colubridae), 全世界共有 50 多种, 分布于亚洲、欧洲、北美和中美^[1]。亚洲约有 30 多种, 此属在我国分布有 15 个种, 其中 2 个种, 王锦蛇 (*E. carinata*) 和紫灰锦蛇 (*E. porphyracea*) 已有亚种分化^[2]。随着细胞学技术的不断进步, 细胞遗传学的研究已为蛇类系统关系提供了许多有意义的证据^[3-5]。我国关于锦蛇属染色体方面的工作已有不少报道^[1, 2, 6-8]。在我国分布的锦蛇中, 至少有 6 个种和 1 个亚种有核型或是 C 带及 Ag-NORs 的报道。本文的研究, 旨在为锦蛇属的分类关系、性染色体分化和染色体演化等提供有益的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

绿锦蛇 (*E. prasina*, ♀)、团花锦蛇 (*E. davidi*, ♂) 和三索锦蛇 (*E. radiata*, ♀) 各 1 条, 团花锦蛇和三索锦蛇采自广西, 绿锦蛇产地不明。

1.2 方法

1.2.1 动物处理 按体重 $w = 5 \times 10^{-6}$ 的量腹腔活体蛇注射秋水仙素, 14 h 后处死;

1.2.2 染色体制备 立即取出脊椎, 剔除脊椎上的肌肉, 剪碎脊椎, 加入无菌的 1640 培养液, 洗涤制成细胞悬液, 离心收集细胞, 在 $\rho(\text{KCl}) = 4 \text{ g/L}$ KCl 溶液中低渗 35 min, 离心后用 V 甲醇:V 冰醋酸为 3:1 固定液固定 2 次, 每次 15 min, 常规空气干燥法制片, Giemsa 染色, 镜检, 拍照。

1.2.3 银染 用 Howell 等^[10]的方法制片, 即用 2 滴 $\rho(\text{AgNO}_3) = 50 \text{ g/L}$ 的 AgNO_3 溶液、1 滴 2% 明胶溶液 (含 1% 的甲酸) 染片, 65 °C 保温 5 ~ 6 min, 直至整张片子呈金黄色, 然后在显微镜下观察, 镜检, 拍照。

表 1 锦蛇属各个种的核型及 Ag-NORs

Table 1 Karyotypes of different species in genus *Elaphe*

种名 Species	$2n$	大染色体 Macro-chromosome	小染色体 Micro-chromosome	性染色体 Sex chromosome	Ag-NORs
<i>E. davidi</i>	36	16(8V + 6sV + 2I)	20	?	No. 9(2 个)
<i>E. prasina</i>	36	16(7V + 7sV + 2I)	20	No. 4	No. 3(4 个)
<i>E. radiata</i>	40	16(6V + 3sV + 2sI + 5I)	24	No. 5	No. 4(4 个)
<i>E. carinata</i>	36	16(7V + 7sV + 2I)	20	No. 4	No. 1(1 个)
<i>E. taeniura</i>	36	16(7V + 7sV + 2I)	20	No. 4	No. 12(1 个)
<i>E. dione</i>	36	16(7V + 7sV + 2sI)	20	No. 4	?
<i>E. moellendorffi</i>	36	16(7V + 7sV + 2sI)	20	No. 4	?
<i>E. rufodorsata</i>	36	16(7V + 7sV + 2sI)	20	No. 4	microchromosome (1)
<i>E. bimaculata</i>	34	16(7V + 7sV + 2I)	20	No. 4	?
<i>E. schrenckii anomala</i>	36	16(7V + 7sV + 2I)	20	No. 4	microchromosome (1)

注: ? 表示未见报道(“?” representing no reports), 下同 (The same below)

2 结果

据中期分裂相的观察结果, 团花锦蛇、绿锦蛇和三索锦蛇 $2n$ 分别为 36、36 和 40。3 个种的大染色体均为 16 条, 团花锦蛇、绿锦蛇微小染色体为 20 条, 而三索锦蛇共有 22 条微小染色体。它们的核型组成分别为团花锦蛇 $2n = 36(8V + 6sV + 2I + 20m)$, 绿锦蛇 $2n = 36(7V + 7sV + 2I + 20m)$, 三索锦蛇 $2n = 40(6V + 3sV + 2sI + 5I + 20m)$ (图 1A, C, E 及表 1)。

我们检测的 3 种蛇类中, 雌性个体绿锦蛇和三索锦蛇有明显的性染色体的分化, 它们的性染色体分别位于第 4 或第 5 对大染色体上, 团花锦蛇由于为雄性个体, 未显示同源染色体的差异。但根据锦蛇属其它种类的性染色体位置, 我们初步推测可能在第 4 对大染色体上。同时团花锦蛇和三索锦蛇的性染色体由于无雄性个体, 根据此属其他种类的性染色体, 我们推测 Z 染色体较 W 染色体大。

以银染技术处理后, 团花锦蛇、绿锦蛇、三索锦蛇显示的 Ag-NORs 数目及在染色体上的位置如图 1 表 1 所示。三种蛇的数目和在染色体上的位置均有差异。团花锦蛇的 Ag-NORs 在一对微小染色体上, 数目为 2 个, 绿锦蛇的 Ag-NORs 位于第 5 对大染色体的短臂上, 数目为 4 个, 而三索锦蛇的 Ag-NORs 在第 4 对大染色体的末端, 数目也为 4 个。这显示锦蛇属已报道的种中, Ag-NORs 数目及在染色体上的位置均不相同。

3 讨论

3.1 锦蛇属各个种的核型比较

比较前人(表1)的报道和我们的研究结果,和大多数游蛇科其它属的物种一样,此属多数种的 $2n$ 基本为36。在报道的6个种和1个亚种及本研究的3种蛇中,共有8个种均为此数。仅有三索锦蛇 $2n$ 为40,双斑锦蛇的为34。这显示了此属蛇类的染色体数目具有一定的变异。Morscalch^[9]在研究无尾类时曾认为该类群核型进化是通过染色体数目减少,微小染色体和端着丝点染色体的消失而发生的。锦蛇属的蛇类中,三索锦蛇微小染色体数目较多,而双斑锦蛇的微小染色体数目相对较少,同时三索锦蛇的端着丝粒染色体数目也相对较多。这可能意味着三索锦蛇的染色体或者属于此属中较为原始的,或是此物种在染色体演化中发生过染色体断裂事件而产生了较多的微小染色体。

同时,此属蛇类的染色体形态也相对保守,各个种的大染色体中,第1至第3对常染色体的着丝粒位置均为中、亚中。除三索锦蛇外,其余种类第5、第7和第8对染色体也仅是略有变化(表2)。和游蛇亚科其它近缘属^[12]比较,在锦蛇属、翠蛇属、游蛇属和乌梢蛇属^[7,8,13]中,其大染色体的第1对和第3对在报道的种中均为中着丝粒染色体。

这也显示了游蛇亚科在染色体进化上的相对保守性。

锦蛇属内各个种的第6对染色体的变异较大,据第6对大染色体形态的不同,可把除三索锦蛇外的种分为中着丝粒组(仅绿锦蛇1种)、亚端着丝粒组(包括白条锦蛇、百花锦蛇和红线锦蛇3种)和端着丝粒组(包括团花锦蛇、王锦蛇、黑眉锦蛇、双斑锦蛇、和棕黑锦蛇5种),王义权等^[15]的RAPD结果也提示王锦蛇、黑眉锦蛇和双斑锦蛇可能为一组,我们的划分与之有一致之处。然而Wang^[16]等(1999)根据线粒体细胞色素B片段长度为246b的结果却表明,锦蛇属黑眉锦蛇、百花锦蛇为一组,而玉斑锦蛇、棕黑锦蛇、红线锦蛇、王锦蛇和双斑锦蛇为一组。由于核基因组和线粒体基因组的演化规律不同,同时Wang等测定的序列较短,而变异位点又极多,很可能存在过饱和现象,故而我们无法判断哪种划分更可靠些,有待进一步地深入分析。

3.2 锦蛇属内物种的性染色体

锦蛇属各个种的性染色体的位置及着丝粒均较为保守。除三索锦蛇外,其余各个种的性染色体均位于第4对大染色体,并且都是Z染色体为中着丝粒,W染色体为亚中或是亚端着丝粒,而具有亚端着丝粒的W染色体也仅有棕黑锦蛇1种。三索锦蛇的性染色体为第5对大染色体,两个性染色体大小不同,并且一个的着丝粒位置为亚中,另外一个为端着丝粒,由于无雄性个体作比较,我们初步判断,较大的染色体为Z染色体,而较小的为W染色体(图板E表2)。蛇类已有性染色体的分化,其性染色体同鸟类的性染色体相似,属于ZZ/ZW型。Ohnd^[17]认为在雌性染色体组型中,ZW染色体有3个不同的类型,最原始的是染色体同型,其次是ZW异型,但Z与W染色体大小接近,再次是ZW异型,通常是W染色体比Z染色体小。从蛇类各科的染色体进化来看,最为原始的是蟒科(Boidae)的性染色体,为ZW同型。同型的性染色体从形态上通常难于鉴别,最为进化的是蝰科(Viperidae)蛇类的染色体,通常为ZW异型,染色体大小和着丝粒位置均不同,而对于游蛇科(Colubridae)的蛇类来说,性染色体可能是同型或是异型^[18]。对于性染色体异型的种类,Z和W染色体的区别可能有三种情况,一是两个染色体大小相近,而两个染色体的着丝粒位置不同,二是两个染色体的大小不同,二着丝粒位置相同,三是两个染色体的大小及其着丝粒的位置均不相同。锦蛇属的蛇类的性染色体异型均属于第三种情况。

表2 锦蛇属各个种大染色体比较

种名 Species	大染色体序号 No. of Macrochromosome								
	1	2	3	4	5	6	7	8	W
<i>E. davidi</i>	V	sV	V	V(Z?)	V	I	sV	sV	?
<i>E. prasina</i>	V	sV	V	V(Z)	V	V	sV	sV	sV(No.4)
<i>E. radiata</i>	V	sV	V	sI	sV(Z)	V	I	I	I(No.5)
<i>E. carinata</i>	V	sV	V	V(Z)	V	I	sV	sV	sV(No.4)
<i>E. taeniura</i>	V	sV	V	V(Z)	V	I	sV	sV	sV(No.4)
<i>E. dione</i>	V	sV	V	V(Z)	V	sI	sV	sV	sV(No.4)
<i>E. moellendorffi</i>	V	sV	V	V(Z)	V	sI	sV	sV	?
<i>E. bimaculata</i>	V	sV	V	V(Z)	V	sI	sV	sV	sV(No.4)
<i>E. bimaculata</i>	V	sV	V	V(Z)	V	I	sV	sV	sV(No.4)
<i>E. schrenckii anomala</i>	V	sV	V	V(Z)	V	I	sV	sI	sI(No.4)

三索锦蛇不但染色体数目及各对大染色体的着丝粒位置特殊,其性染色体的位置及着丝粒位置也与锦蛇属其它物种有着明显的不同。按张服基的报道,锦蛇属、游蛇属、灰鼠蛇属、翠蛇属和乌梢蛇属是亲缘关系较近的几个属,比较核型我们发现,三索锦蛇的大染色体较近游蛇属的渔游蛇(*Natrix piscator*)除第 2 和 8 对大染色体及 W 染色体不同之外,其它均相同。这提示三索锦蛇是否应归入锦蛇属值得作进一步研究。

3.3 Ag-NORs 与染色体演化

近年来,在研究核型进化及物种亲缘关系中,Ag-NORs 被作为一项重要的指标,Ag-NORs 的分布位置因物种而异,其显现的数目一般随演化的不同而有差异。演化程度高的物种,其 Ag-NORs 的数目较多,反之则少^[3]。以此衡量的话,三索锦蛇和绿锦蛇是锦蛇属中较为特化的类群,而红点锦蛇、团花锦蛇次之;王锦蛇、黑眉锦蛇可能较为原始(见表 2)。

综上所述,锦蛇属的蛇类按第 6 对大染色体的形态、性染色体的位置及 NORs 的位置和数目可分为 4 组,染色体较为特化的三索锦蛇和绿锦蛇各为一组,红点锦蛇所在的三种蛇为一组,而团花锦蛇所在的 5 种蛇为一组,可能为锦蛇属中较为基本的染色体类型。

值得一提的是三索锦蛇染色体数目较多,应划分在较原始的类群中,而从 Ag-NORs 数目来看,则属于较进化的类群。可能的原因是三索锦蛇的核型在进化中发生过断裂及重组而导致染色体数目较多,性染色体位置独特,且 Ag-NORs 数目也较多。由于我们未作 C 带,无法准确证明上述推测,此物种值得作进一步研究。

致谢 感谢贺维顺、刘爱华教授、林世英和苟世康老师,以及李海鹏同学给予的大力支持和帮助!

参考文献

- 1 Wang RF(王蕊芳),He WS(贺维顺),Shi LM(施立明),Shi QH(史庆华). Observations on mitotic chromosomes and synaptonemal complex of *Elaphe taniura* (Reptilia). *Acta Zoologica Sinica*(动物学报). 1991, **37**(4): 438 ~ 442
- 2 Xie XF(谢兴夫),Qu YF(曲韵芳),Yang YJ(杨友金),Huang MH. A preliminary observation on the karyotype of three species of genus *Elaphe*. *Acta Herp Sin*(两栖爬行动物学报). 1983, **3**(3): 23 ~ 44
- 3 Becak W, Becak M L. Cytotaxonomy and chromosomal evolution in serpents. *Cytogenetics*. 1969, **8**: 247 ~ 262
- 4 Desmet WHO. The chromosomes of 23 species of snakes. *Acta Zool Pathol Antverpiensia*. 1978, **70**: 85 ~ 118
- 5 Gorman G C. The chromosomes of reptilia, a cytotoxic interpretation. In: Chiarelli A B, Capanna E eds. Cytotaxonomy and vertebrate evolution. New York: Academic Press, 1973. 349 ~ 424
- 6 郭超文,董永文,陈存武. 红点锦蛇染色体组型、C 带和 Ag-NORs 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. 171 ~ 174
- 7 郭超文,聂刘旺,吴小兵. 两种蛇的核型与 Ag-NORs. 见: 两栖爬行动物学研究(第 6、7 辑). 贵阳: 贵州科技出版社, 1997. 268 ~ 269
- 8 郭超文,马虹. 棕黑锦蛇赤峰亚种染色体组型、C 带和 Ag-NORs 研究. 遗传. 1997, **19**(3): 20 ~ 22
- 9 Morescalchi A. Cytotaxonomy and vertebrate evolution. Chiarelli A B, Capanna I. Eds. 1973. p233 ~ 248
- 10 Yang YJ(杨友金),Huang MH(黄美华),Qu YF(曲韵芳),Xie XF(谢兴夫). A comparative study on the karyotypes of four species of Colubrinae. *Acta Herp Sin*(两栖爬行动物学报). 1986, **5**(1): 30 ~ 33
- 11 Howell W M, Black D A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980, **36**: 1014 ~ 1015
- 12 Zhang FJ(张服基),Hu SQ(胡淑琴),Zhao EM(赵尔宓). Comparative studies and phylogenetic discussions on hemipenial morphology of the Chinese Colubrinae. *Acta Herp Sin*(两栖爬行动物学报). 1984, **3**(3): 23 ~ 44
- 13 Gao JM(高建民),Zhang QJ(张秋金). 游蛇科 4 种的核型比较. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报). 1996, **2**(3): 280 ~ 283
- 14 Zhang FJ(张服基). Preliminary studies on the phylogeny of *Elaphe zaoecys*, *Ptyas* and *Entechinus*. *Acta Herp Sin*(两栖爬行动物学报). 1988, **7**(2): 47 ~ 55
- 15 Wang YQ(王义权),Zhou KY(周开亚). Study on randomly amplified polymorphic DNA of 10 species in Colubridae. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报). 1996, **2**(3): 273 ~ 279
- 16 Wang YQ, Zhou KY, Xu LS, Yang G, Xu GJ. The evolutionary relationships of several colubrid snakes suggested by sequences analysis of cyt b gene fragment. *Acta Zoologica Sinica*(动物学报). 1999, **25**(3): 332 ~ 338
- 17 Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked gene. Monoger. Endocrinol. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York. 1967, Vol. 1
- 18 Wang RF, Liu WZ, He WS et al. A Study on the Karyotype and Ag-NORs of Yunnan Macropidhodon ruduis(Reptilia: Colubridae). *Zoological Research*. 1996, **17**(2): 169 ~ 172

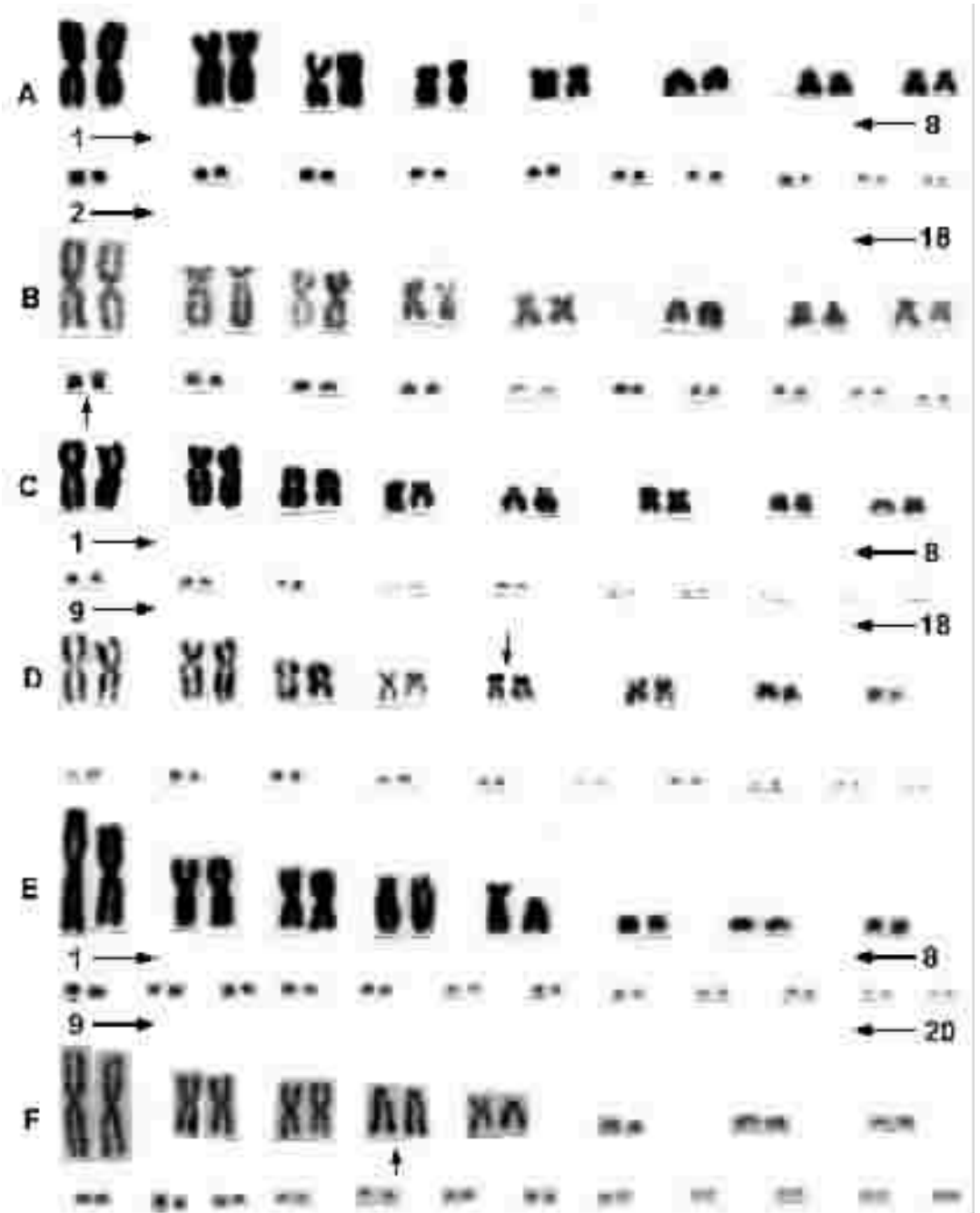


图1 锦蛇属(*Elaphe* 游蛇科, Colubridae)团花锦蛇、绿锦蛇和三索锦蛇的核型及 Ag-NORs. A、C和E分别为团花锦蛇、绿锦蛇和三索锦蛇的核型, 1至8表示它们的大染色体, 团花锦蛇和绿锦蛇的小染色体为9至18; 三索锦蛇的小染色体为9至20. B、D和F分别为它们的银染结果, 箭头所指的为 Ag-NORs 在染色体上的位置.

Fig.1 Karyotypes and Ag-NORs of *E. davidi*, *E. prasina* and *E. radiata* in genus *Elaphe*. (A, C and E). The numbers of 1-8 showing their macro-chromosomes, 9-18 showing micro-chromosomes in *E. davidi* and *E. prasina*; 9-20 showing micro-chromosomes in *E. radiata*. B, D and F being the results of the AgNO₃ staining. The arrows showing the Ag-NORs of the 3 species.