

中国角蟾属精子的形态学研究^{*} (两栖纲:锄足蟾科)

郑中华 费 梁 叶昌媛

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘 要 采用光镜与电镜结合,对角蟾属 16 个种 18 个居群精子的形态结构进行观察和比较,并通过计算机图像处理对其各部位长度进行测量和计算.结果表明,角蟾属的精子主要包括头和尾两部分,头部呈螺旋状,尾部为波状或弯曲状.根据精子的头部形状和量度,角蟾属的精子可分为 2 类.角蟾属内种(或亚种)间精子存在一定的差别,但同种不同地理居群和不同个体的精子形态相同,仅长度略有变化.本文结果与形态学研究结果基本相吻合,可为该属物种的分类提供新的佐证.图 1 表 1 参 11

关键词 两栖纲 锄足蟾科 角蟾属 精子形态

CLC Q954.434 : 959.510.4

STUDY ON MORPHOLOGY OF SPERMATOOZOA OF *MEGOPHRYS* (AMPHIBIA:PELOBATIDAE) FROM CHINA

ZHENG Zhonghua, FEI Liang & YE Changyuan

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract The shapes of spermatozoa of 16 species of genus *Megophrys* from China, including *Megophrys zhangii*, *M. kuatunensis*, *M. boettgeri*, *M. parva*, *M. glandulosa*, *M. medogensis*, *M. omeimontis*, *M. spinata*, *M. jingdongensis*, *M. wushanensis*, *M. wuliangshanensis*, *M. minor*, *brachykolos*, *M. m. binchuanensis*, *M. m. minor*, *M. gigantea* and *M. shapingsensis*, were examined with light and transmission electron microscopy and the sizes of spermatozoa were measured on enlarged light photomicrographs using computer image analysis. The results show that in *Megophrys* the spermatozoa are thin and long [$90.52 \sim 186.71 (123.15 \pm 26.66) \mu\text{m}$] and consist of two parts, head and tail. The head is spiral and corkscrew-shaped, and the shape of tail is winding. The spermatozoa can be divided into two groups based on the measurements of head. The spermatozoa of group I are short ($116.45 \pm 5.06 \mu\text{m}$) and those group II are long ($176.77 \pm 4.69 \mu\text{m}$). The spermatozoa shape of *Megophrys* differs from that of the other families of Anura. The differences in morphological characteristics of spermatozoa also exist among the species (subspecies) of *Megophrys*, but the spermatozoa shape is very similar among different individuals and populations in the same species. Spermatozoa vary slightly in length. The result from this study coincides in that from morphological studies and may be a useful method for classification of *Megophrys*. Fig 1, Tab 1, Ref 11

Keywords Amphibia; Pelobatidae; *Megophrys*; morphology of spermatozoa

CLC Q954.434 : 959.510.4

无尾两栖类精子的形态学研究可为其分类和系统学研究提供有用的资料^[1,2].近年来,对无尾两栖类蟾蜍科、雨蛙科、蛙科、树蛙科等精子的形态已有一些研究^[1,3,4],但我国学者报道甚少^[5~7],有关锄足蟾科精子的研究国内外均未见报道,更缺乏系统研究.角蟾属(*Megophrys*)是锄足蟾科(Pelobatidae)中种数最多的一个

收稿日期:1999-09-14 接受日期:1999-12-15

^{*} 国家自然科学基金重点项目(No 39720080),中国科学院分类区系特别支持项目,中国科学院西南基地项目,中国科学院成都地奥科学基金项目资助.

属,现有 30 种左右,主要分布在亚洲的东部和南部.我国已知 23 种(亚种),分布于秦岭以南诸省^[8].本文对我国角蟾属 16 个种 18 个居群精子的形态拟进行系统研究,比较种间、不同地理居群间,以及不同个体间精子形态的异同,并探讨该属精子的形态特征在分类学上的意义.

1 材料和方法

1.1 材料

研究所用物种有大花角蟾、沙坪角蟾、峨眉角蟾(2 个居群)、景东角蟾、棘指角蟾(2 个居群)、巫山角蟾、无量山角蟾、小角蟾指名亚种、小角蟾短肢亚种、小角蟾宾川亚种、张氏角蟾、挂墩角蟾、淡肩角蟾、凹顶角蟾、腺角蟾、墨脱角蟾,共计 16 种 18 个居群.标本采于 1987~1998 年的 5~6 月(即繁殖期),其产地见表 1.每种选用两个雄性标本(张氏角蟾、墨脱角蟾仅一个标本).

1.2 光镜和电镜标本的制备

剖取性成熟雄蟾的辜丸,清洗血液后,将其剪碎,加入 2.5% 戊二醛(或 10% 甲醛)固定液,用玻棒轻轻挤压和搅拌,静置片刻(让其自然沉淀),吸取上面的液体涂片,自然干燥 10~24 h,用苯胺蓝染色后,于 Olympus BHs-2 光学显微镜下观察、拍照.电子显微镜样品制备为,吸取精子悬浮液,置于 150 目铜网上,待自然干燥后,于 JEM-100cx 电子显微镜观察和拍照.

1.3 精子长度的测量和计算

精子的总长和各部位的长度系用放大的光学显微镜照片,经计算机图像处理进行测量,所得数据用 spss 软件进行统计分析.

2 结果

对角蟾属 16 个种精子形态结构的光镜和电镜观察结果表明,角蟾属的精子细长,主要包括头和尾两部分.其特点是精子头部呈螺旋状,尾部纤细,呈波状或弯曲状,少数种尾部可见冠状突起或膜样结构(如大花角蟾和腺角蟾).根据精子头部形态、精子头部和尾部的量度,角蟾属的精子可分为 2 类.

第一类,精子全长为 $90.52 \sim 163.57(116.45 \pm 5.06) \mu\text{m}$,精子头顶端细尖,向后渐粗,头前段(最细处)与后段(最粗处)宽之比约为 1:4,头和尾易分,头部短于尾部(头长 $37.72 \sim 76.40 \mu\text{m}$,尾长 $51.77 \sim 87.17 \mu\text{m}$).根据精子的长度和头部螺旋数,第一类又可分为两组:

第一组,精子较短 [$90.52 \sim 105.88, (97.63 \pm 5.61) \mu\text{m}$],头部螺旋少(5~8 个),排列稀疏,且分布不均匀,前段螺旋似波状,如张氏角蟾、挂墩角蟾、淡肩角蟾、凹顶角蟾、腺角蟾、墨脱角蟾的精子属于此组.其中墨脱角蟾精子最短($90.52 \mu\text{m}$),头部螺旋少(5~6 个);淡肩角蟾的最长($105.88 \mu\text{m}$),头部螺旋较多(7~8 个),张氏角蟾和墨脱角蟾精子头部后段明显加宽(见图 1:b, e~i).

第二组,精子较长 [$111.28 \sim 163.57(127.74 \pm 4.73) \mu\text{m}$],头部螺旋较多(8~15 个),分布比较均匀,如峨眉角蟾、景东角蟾、棘指角蟾、小角蟾(3 个亚种)、巫山角蟾、无量山角蟾属于此组.其中峨眉角蟾(峨眉、合江)和棘指角蟾(南川、雷山)在不同个体和不同地理居群的精子形态区别不明显.在种间或亚种间,其精子的长度和头部螺旋状弯曲数均有一定的差别,以棘指角蟾雷山居群的精子最短($111.28 \mu\text{m}$),螺旋数较少为 9~10 个;在小角蟾 3 个亚种中,以短肢亚种精子较短($118.62 \mu\text{m}$),螺旋数最少,为 8~9 个,而指名亚种的精子为本组中最长($163.57 \mu\text{m}$),螺旋数也最多(14~15 个)(见图 1:j~q).

第二类,精子全长为 $166.82 \sim 186.71(176.77 \pm 4.69) \mu\text{m}$,精子头顶端细尖,向后略微渐粗,头前段与后段宽之比近于 1:2,其差别不明显.头部螺旋状弯曲分布不均匀,头前段螺旋细而密(14~18 个),中段直,后段螺旋稀少(2~3 个).头尾粗细几相等,难区分.头部长于尾部,如大花角蟾、沙坪角蟾的精子属于此类.其中沙坪角蟾精子相对较长,而大花角蟾精子尾部可见冠状突起(见图 2:a, c, d).

角蟾属 16 种精子的量度见表 1.

3 讨论

3.1 精子形态特征及在分类学上的意义

对角蟾属 16 个种 18 个居群精子的研究结果表明,该属多数物种精子的形态是相似的.其共同特征是精

表 1 角蟾属 16 种精子的量度(百分比为各部位与总长之比)
Table 1 Sperm size of the sixteen species of *Megophrys* (Ratios to the total length given by %)

种 名 Species	采集地 Locality	精子数 Number of sperm	精子量度 (l/ μ m)				
			头 长 Head length	尾 长 Tail length	总 长 Total length	头 宽 Head width	头部螺旋数 Number of head spiral
张氏角蟾 (<i>Megophrys zhangii</i>)	西藏聂拉木 (Nyalanmu, Tibet)	15	41.10 $\pm$ 2.35 (43.32%)	54.11 $\pm$ 6.48 (56.68%)	95.21 $\pm$ 6.29	0.97 $\pm$ 0.02	5.60 $\pm$ 0.32
挂墩角蟾 (<i>M. kuatunensis</i>)	福建崇安 (Chongan, Fujian)	15	39.83 $\pm$ 2.18 (42.73%)	54.09 $\pm$ 9.49 (57.27%)	93.92 $\pm$ 11.07	0.95 $\pm$ 0.03	6.7 $\pm$ 0.48
淡肩角蟾 (<i>M. boettgeri</i>)	福建崇安 (Chongan, Fujian)	20	46.19 $\pm$ 2.21 (43.62%)	59.69 $\pm$ 6.68 (56.38%)	105.88 $\pm$ 6.05	0.94 $\pm$ 0.03	7.8 $\pm$ 0.42
凹顶角蟾 (<i>M. parva</i>)	云南勐腊 (Mengla, Yunnan)	15	45.82 $\pm$ 1.64 (46.95%)	51.77 $\pm$ 1.85 (53.05%)	97.59 $\pm$ 2.55	0.96 $\pm$ 0.02	7.1 $\pm$ 0.32
腺角蟾 (<i>M. glandulosa</i>)	云南景东 (Jingdong, Yunnan)	20	41.24 $\pm$ 1.21 (44.28%)	61.39 $\pm$ 4.28 (59.82%)	102.63 $\pm$ 4.01	0.96 $\pm$ 0.03	7.7 $\pm$ 0.48
墨脱角蟾 (<i>M. medogensis</i>)	西藏墨脱 (Medog, Tibet)	15	37.72 $\pm$ 1.39 (41.70%)	52.80 $\pm$ 3.27 (58.30%)	90.52 $\pm$ 3.68	0.97 $\pm$ 0.02	5.5 $\pm$ 0.52
峨眉角蟾 (<i>M. omeimontis</i>)	四川峨眉 (Emei, Sichuan)	20	57.55 $\pm$ 2.12 (45.48%)	68.99 $\pm$ 4.93 (54.52%)	126.54 $\pm$ 5.49	0.91 $\pm$ 0.03	11.6 $\pm$ 0.50
	四川合江 (Hejiang, Sichuan)	15	60.70 $\pm$ 4.74 (46.27%)	70.48 $\pm$ 5.48 (53.73%)	131.18 $\pm$ 7.45	0.91 $\pm$ 0.03	11.2 $\pm$ 0.79
棘指角蟾 (<i>M. spinata</i>)	四川南川 (Nanchuan, Sichuan)	15	55.57 $\pm$ 2.94 (45.98%)	65.26 $\pm$ 2.48 (54.02%)	120.83 $\pm$ 3.78	0.95 $\pm$ 0.02	11.4 $\pm$ 0.55
	贵州雷山 (Leishan, Guizhou)	15	46.78 $\pm$ 2.21 (42.04%)	64.50 $\pm$ 2.26 (57.96%)	111.28 $\pm$ 2.12	0.95 $\pm$ 0.03	9.4 $\pm$ 0.52
景东角蟾 (<i>M. jingdongensis</i>)	云南景东 (Jingdong, Yunnan)	15	57.20 $\pm$ 4.03 (46.78%)	65.14 $\pm$ 5.03 (53.22%)	122.34 $\pm$ 7.21	0.92 $\pm$ 0.02	10.7 $\pm$ 0.95
巫山角蟾 (<i>M. wushanensis</i>)	四川巫山 (Wushan, Sichuan)	15	63.26 $\pm$ 4.89 (49.34%)	65.03 $\pm$ 5.79 (50.66%)	128.29 $\pm$ 4.55	0.91 $\pm$ 0.03	10.5 $\pm$ 0.53
无量山角蟾 (<i>M. wuliangshanensis</i>)	云南景东 (Jingdong, Yunnan)	15	58.09 $\pm$ 3.95 (48.59%)	61.43 $\pm$ 3.13 (51.41%)	119.52 $\pm$ 4.57	0.95 $\pm$ 0.02	11.2 $\pm$ 0.42
小角蟾短肢亚种 (<i>M. minor. brachykolos</i>)	广西龙胜 (Longshen, Guangxi)	15	56.48 $\pm$ 3.31 (47.63%)	62.14 $\pm$ 4.23 (52.37%)	118.62 $\pm$ 2.94	0.94 $\pm$ 0.02	8.4 $\pm$ 0.52
小角蟾宾川亚种 (<i>M. m. binchuanensis</i>)	云南宾川 (Binchuan, Yunnan)	15	64.12 $\pm$ 2.71 (47.42%)	71.10 $\pm$ 3.34 (52.58%)	135.22 $\pm$ 3.93	0.93 $\pm$ 0.02	11.2 $\pm$ 0.79
小角蟾指名亚种 (<i>M. m. minor</i>)	四川洪雅 (Hongya, Sichuan)	20	76.40 $\pm$ 2.67 (46.71%)	87.17 $\pm$ 4.11 (53.19%)	163.57 $\pm$ 5.3	0.94 $\pm$ 0.03	14.2 $\pm$ 0.42
大花角蟾 (<i>M. gigantea</i>)	云南景东 (Jingdong, Yunnan)	20	91.38 $\pm$ 4.22 (54.78%)	75.44 $\pm$ 4.45 (45.22%)	166.82 $\pm$ 3.24	0.66 $\pm$ 0.03	16.6 $\pm$ 1.34
沙坪角蟾 (<i>M. shapingensis</i>)	四川普雄 (Puxiong, Sichuan)	15	107.33 $\pm$ 3.11 (57.55%)	79.38 $\pm$ 7.39 (42.45%)	186.71 $\pm$ 6.14	0.65 $\pm$ 0.02	16.3 $\pm$ 1.15

子细长,头部呈螺旋状,尾部呈波状或弯曲状,精子的顶体和中段不明显,尾部无波动膜,仅少数种可见冠状突起或膜样结构 精子头部略粗于尾部或几相等.角蟾属精子形态与无尾两栖类其他科物种的精子形态^[1-7]相比较有明显差别,根据精子形态特征可将角蟾属物种与无尾两栖类其他科物种区别开.

角蟾属精子形态特征在种间也存在差异,特别是成体形态差异大的物种,其精子的差异较大,如大花角蟾和沙坪角蟾 2 种的成体形态与角蟾属其他种明显不同,本文大花角蟾和沙坪角蟾的精子形态特征基本一致,种间仅有微小差别,精子形态为本文结果中的第二类,其共同特征是头部长于尾部,头尾粗细几相等,难区分,头部螺旋状弯曲分布不均匀与角蟾属其他物种的精子形态(为第一类)有明显差别(见表 1,图 1:a,c,d),这一结果与形态学研究结果相吻合,也为以形态特征为依据将上述 2 个种列为角蟾属中同一个种组提供了佐证^[8].

此外,地理隔离明显的种类,其精子的形态差异也大,如张氏角蟾和墨脱角蟾采集地为西藏聂拉木和墨脱,与角蟾属中其他相近物种地理隔离甚明显,并被横断山所阻隔.费梁依据成体的形态相似性,将这两个种分别归在小角蟾种组和峨眉角蟾种组^[8].本文张氏角蟾和墨脱角蟾的精子较短(全长分别为 95.21 μ m $\pm$ 6.29 μ m 和 90.52 μ m $\pm$ 3.68 μ m),是角蟾属中精子最短的物种.这 2 个种精子的形态相似,头部螺旋少(5~7 个),

后段明显加宽(见图 1:f,q)与小角蟾种组(小角蟾 3 个亚种、巫山角蟾、无量山角蟾等)和峨眉角蟾种组(棘指角蟾、峨眉角蟾等)物种精子的形态和量度都存在差异.从上述两个种组内精子的形态差异,可以显示其种间的区别,并且在物种间随着地理相距愈远,其精子的形态差异就愈大或因青藏高原抬升和横断山特定地理环境所隔离,而造成精子形态的分化.另外小角蟾指名亚种的精子较长($163.57\ \mu\text{m}$),头部螺旋数较多,与小角蟾短肢亚种和宾川亚种的精子均不相同,从 3 个亚种精子的差异程度显示,后 2 个亚种有可能属于种级.

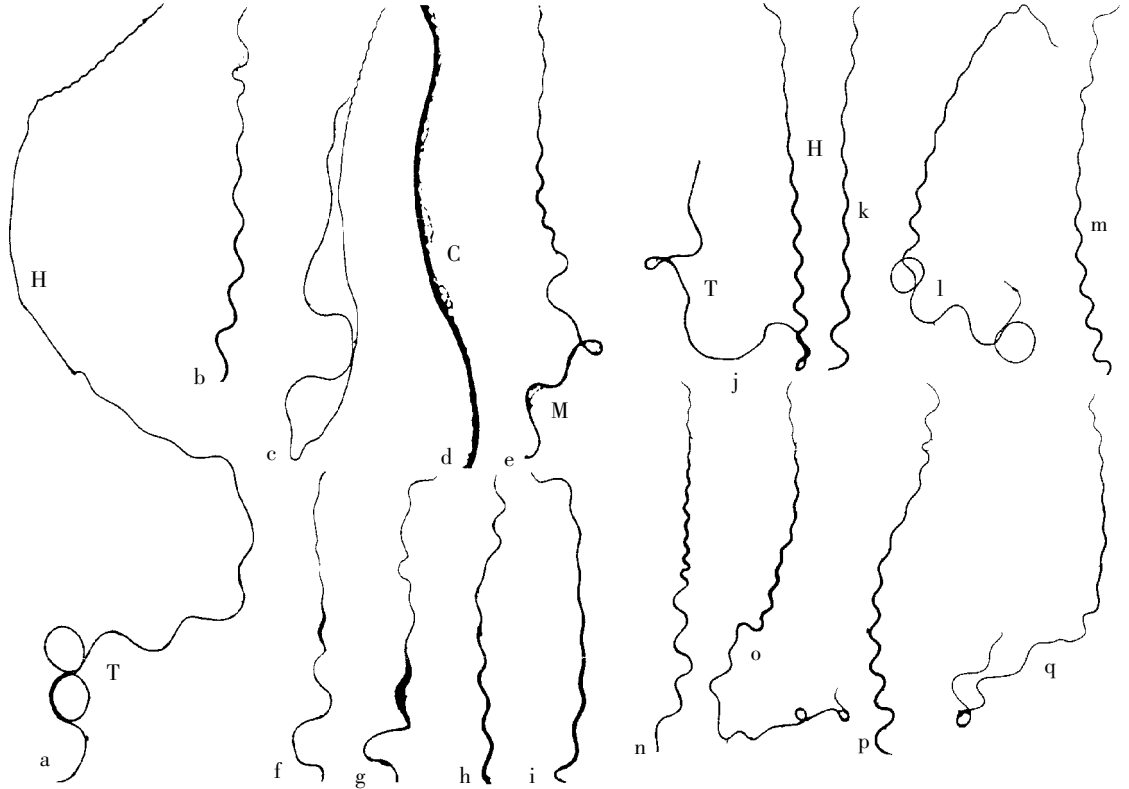


图 1 角蟾属代表种精子的电镜照片

Fig. 1 Micrograph of spermatozoa of some species of *Megophrys*

a. 沙坪角蟾, H 头部, T 尾部 (*Megophrys shapingsensis*, H head, T tail) $\times 1200$; b. 凹顶角蟾精子头部 (Head of *M. parva*) $\times 1200$; c. 大花角蟾 (*M. gigantea*) $\times 850$; d. 大花角蟾精子尾部, C 冠状突起 (Tail of *M. gigantea*, C crest) $\times 2200$; e. 腺角蟾, M 膜样结构 (*M. glandulosa*, M membrane) $\times 850$; f. 墨脱角蟾 (*M. medogensis*) $\times 700$; g. 张氏角蟾精子头部 (Head of *M. zhangii*) $\times 850$; h. 淡肩角蟾精子头部 (Head of *M. boettgeri*) $\times 950$; i. 挂墩角蟾精子头部 (Head of *M. kuatunensis*) $\times 1100$; j. 峨眉角蟾, H 头部, T 尾部 (*Megophrys omeimontis*, H head, T tail) $\times 1650$; k. 无量山角蟾精子头部 (Head of *M. wuliangshanensis*) $\times 1650$; l. 景东角蟾 (*M. jingdongensis*) $\times 1500$; m. 小角蟾短肢亚种精子头部 (Head of *M. minor. brachykolos*) $\times 1700$; n. 小角蟾指名亚种 (*M. m. minor*) $\times 600$; o. 小角蟾宾川亚种 (*M. m. binchuanensis*) $\times 1000$; p. 巫山角蟾精子头部 (Head of *M. wushanensis*) $\times 1500$; q. 棘指角蟾 (*M. spinata*) $\times 1150$. Head = sperm head and tail = sperm tail.

3.2 不同地理居群、不同个体精子的特征

对峨眉角蟾(四川峨眉,合江)和棘指角蟾(四川南川,贵州雷山)两个种的不同地理居群精子的观察结果表明,同种不同地理居群精子的形态基本相同,仅精子长度略有变化(见表 1),同时,本文对腺角蟾、淡肩角蟾、峨眉角蟾、大花角蟾、小角蟾指名亚种等不同个体的精子进行的比较结果表明,不同个体精子的形态较为一致,但精子的长度略存在差异,如淡肩角蟾不同个体精子长度分别平均为 $106.67 \pm 7.8\ \mu\text{m}$ 和 $105.07 \pm 4.30\ \mu\text{m}$,而峨眉角蟾分别为 $128.45 \pm 7.17\ \mu\text{m}$ 和 $124.62 \pm 3.8\ \mu\text{m}$. Kuramoto^[1,10] 在研究中国和日本的林蛙和树蛙,以及有尾类的小鲵和蝾螈的精子时也发现,同种不同地理居群和不同个体精子的形态相同,其长度有差别; Wortham 等^[9] 研究无肺螈科(Plethodontidae)精子时也得出同样结论,而且认为不同地理居群精子长度的变异大

于不同个体的差异. 这些结果与本文研究的结果基本一致. 由此, 似可认为角蟾属精子的形态较稳定, 不因地区不同而改变.

3.3 关于两栖类精子的长度与生境差异问题

Kuramoto^[10]曾报道, 在流溪内繁殖的小鲵(*Hynobius kimurae* 和 *H. naevius*), 其精子比静水池内繁殖类型物种的长得多. 蝾螈(*Cynops*)精子较长(407 ~ 428 μm), 而陆地受精的琉球棘螈(*Echinotriton andersoni*)精子较短(220 μm). van der Horst 等^[11]报道, 南非蛙类在水内受精类群精子的头部比陆地受精类群的精子短. 本文角蟾属物种均在山溪水内繁殖, 但不同物种对水的依赖性有所不同, 如大花角蟾、沙坪角蟾对水域依赖性大于角蟾属中的其他种, 本文对比各种精子的长度, 对水域依赖性强的前述物种精子确实相对较长. 但同类动物精子的长度差异是否与水域类型和繁殖方式有关, 还待进一步积累资料和深入研究.

参考文献

- 1 Kuramoto M. Generic differentiation of sperm morphology in treefrogs from Japan and Taiwan. *J Herpetol.* 1996, **30**(3): 437 ~ 443
- 2 Fouquette MJ, Delahoussaye AJ. Sperm morphology in the *Hyla rubra* group (Amphibia, Anura, Hylidae), and its bearing on generic status. *J Herpetol.* 1977, **11**: 387 ~ 396
- 3 Kuramoto M. Spermatozoa of several frog species from Japan and adjacent regions. *Jpn J Herpetol.* 1998, **17**(3): 107 ~ 116
- 4 Wilson B, van der Horst G, Channing A. Scanning electron microscopy of the unique sperm of *Chiromantis xerampelina*. *Proc Electron Microscop Soc S Afr.* 1991, **21**: 255 ~ 256
- 5 Liang R J(梁仁济). Morphologies of spermatozoa in 24 chinese anurans species. *Chin J Zool(动物学杂志)*. 1994, **29**(1): 20 ~ 23
- 6 Mo HY(莫慧英). Ultrastructural studies on the spermatozoa of the frog *Rana nigromaculata* and the toad *Bufo Bufo asiaticus*. *Zool Res(动物学研究)*. 1985, **6**(4): 381 ~ 389
- 7 Lin DJ(林丹军), You YL(尤永隆), Zhong XR(钟秀容). The structure of the spermatozoon of *Hyla chinensis* and its Bearing on phylogeny. *Zool Res(动物学研究)* 1998, **20**(3): 161 ~ 167
- 8 费梁. 中国两栖动物图鉴. 郑州: 河南科学技术出版社. 1999. 1 ~ 423
- 9 Wortham JWE, Jr, Brandon R A. Comparative morphology of some plethodontid salamander spermatozoa. *Copeia*. 1977, **1977**(4): 666 ~ 680
- 10 Kuramoto M. Further studies on sperm morphology of Japanese salamanders, with special reference to geographic and individual variation in sperm size. *Jpn J Herpetol.* 1997, **17**(1): 1 ~ 10
- 11 van der Horst G, Wilson B, Channing A. Amphibian sperm: phylogeny and fertilization environment. In: Jamieson BGM, Ansio J, Justine J.-L. ed. *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. Paris: Editions du Muséum National d'Histoire Naturelle, 1995. 333 ~ 342