

峨眉髭蟾精子形态结构及分类学意义

郑中华*, 谢 锋, 江建平, 费 梁

(中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要:应用透射电镜、扫描电镜和光学显微镜对峨眉髭蟾 (*Vibrissaphora boringii*) 精子的形态和超微结构研究的结果表明: 峨眉髭蟾的精子具角蟾科物种精子基本的形态和结构特征, 即精子头部呈螺旋状, 尾部呈弯曲状; 精子具锥形的顶体、纤维束构成的穿孔器、平行排列的中心粒和双轴丝; 线粒体位于尾部; 精子核窝不明显、无轴纤维和波动膜等特征。此外, 对已有报道的角蟾科和无尾类物种精子的特征进行分析比较表明: (1) 角蟾科精子细胞核呈螺旋状, 中心粒平行排列, 尾部具双轴丝等结构不同于无尾类其他科精子的结构, 具有明显的科间差别; (2) 角蟾科精子各部的量度, 尾部线粒体的分布和数量, 以及轴丝的排列等特征在属间和种间表现出明显的差异; (3) 峨眉髭蟾和东南亚拟髭蟾指名亚种精子的形态和超微结构存在明显的差异。

关键词: 峨眉髭蟾; 精子特征; 分类学意义

中图分类号: Q959.530.5; Q954.43 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2006) 03–0291–08

Ultrastructure and Morphology of the Spermatozoa in *Vibrissaphora boringii* and Its Taxonomical Sense (Anura: Megophryidae)

ZHENG Zhong-hua*, XIE Feng, JIANG Jian-ping, FEI Liang

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

Abstract: Ultrastructure and morphology of the spermatozoa in *Vibrissaphora boringii* was studied by light microscopy, transmission and scanning electron microscopy. The structural features of spermatozoa in *V. boringii* and its taxonomical sense in *Vibrissaphora* and Megophryidae were discussed. The results show that the sperm of *V. boringii* present basic morphological and structural characters of Megophryidae by having a spiral head, forniciform tail, conical acrosome vesicle, perforatorium composed of fibers, parallel centrioles, two axonemes and mitochondrion lying in the tail, and lacking distinct nuclear fossa, axial fibers and an undulating membrane. Additionally, comparative analyses of the sperm structure among Megophryidae and other families of tailless Amphibians (Anura) indicates that: 1) The ultrastructural and morphological characters of spermatozoa in Megophryidae, including spiral nucleus, parallel centrioles and two axonemes in the tail, obviously differs from those of the other families of Anura; 2) The distinct differences in size of sperm, the amount and the distribution of mitochondrion, and the range of axonemes also exist among the species and genera of Megophryidae; 3) The ultrastructure and morphology of spermatozoa of *Leptobranchium aff. hasselti* and *Vibrissaphora boringii* notably differs from each other.

Key words: *Vibrissaphora boringii*; Sperm feature; Taxonomical sense

峨眉髭蟾 (*Vibrissaphora boringii*) 隶属于两栖纲 (Amphibia) 无尾目 (Anura) 角蟾科 (Megophryidae) (Fei et al, 2005)。该物种分布于我国四川、湖南和贵州, 为我国特有的珍稀物种。由于过量采集和栖息地遭到破坏, 其数量急剧减

少, 处于濒危状态, 已被列入《中国物种红色名录》(Wang & Zhao, 1998)。对无尾两栖类精子形态结构的研究已有不少报道 (Kuramoto, 1996, 1998; Meyer, 1997; Lee & Jamieson, 1992, 1993; Jamieson et al, 1993; Scheltinga, 2002; Costa et al, 2004; Lin et al,

* 收到日期: 2005–12–06; 接受日期: 2006–03–30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30570195)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhengzh@cib.ac.cn

1999 Lin & You, 2000 Zheng et al, 2000, 2002)。相关研究涉及到盘舌蟾科 (Discoglossidae)、滑趾蟾科 (Leiopelmatidae)、龟蟾科 (Myobatrachidae)、尾蟾科 (Ascaphidae)、蟾蜍科 (Bufonidae)、蛙科 (Ranidae) 和雨蛙科 (Hylidae) 等科物种。已有研究表明, 无尾两栖类精子的形态和大小具有科、属或种的特征 (Kuramoto, 1996, 1998; Zheng et al, 2000, 2002)。两栖类动物精子结构比较稳定, 比较精子形态结构可为其分类和系统发育研究提供新依据 (Meyer, 1997; Lee & Jamieson, 1992, 1993; Jamieson et al, 1993; Costa et al, 2004), 但对角蟾科精子研究的报道较少, 未见对峨眉髭蟾精子形态和超微结构研究的报道。本文拟通过光学显微镜和电子显微镜对峨眉髭蟾精子的形态和超微结构进行观察研究, 了解和认识其形态结构特征, 同时为该属物种的分类和系统学研究提供精子学数据。

1 材料和方法

1.1 标本来源

于 2003 年 2 月—2004 年 3 月的繁殖季节, 从四川峨眉山清音阁繁殖场地, 共捕捉峨眉髭蟾雄性标本 4 只。由于个体间精子形态特征差异不显著 (Kuramoto, 1996, 1997; Zheng et al, 2000)。故剖腹取出精巢, 并将 4 只个体的精巢混在一起, 用生理盐水洗涤后备用。

1.2 标本制备

1.2.1 精子形态标本的制备 将清洗干净的精巢剪破, 放入 2.5% 戊二醛固定液中, 用玻璃棒轻轻挤压和搅拌, 制成精子悬液。然后, (1) 参照 Zheng et al (2000) 的方法, 吸取静置片刻的精子悬浮液涂片, 待自然干燥后, 用苯胺蓝染色 2 min, 于 ZEISS Axioplan 2 imaging 光学显微镜下观察和拍照。(2) 参照 Zheng et al (2005) 的方法, 吸取精子悬浮液涂片, 待自然干燥后, 经 GIKO-IB3 离子溅射仪喷金, 于 JSM-5900LV 扫描电子显微镜观察和拍照。

1.2.2 超薄切片标本的制备 参照 Zheng et al (2005) 的方法, 将制备好的精子悬液离心, 弃除上清液; 在沉淀物中小心地加入 2.5% 戊二醛固定液, 4℃ 过夜; 经 PBS 漂洗, 用 1% 锇酸后固定, 各级乙醇脱水, 618 环氧树脂渗透并包埋, LKB 切片机制作超薄切片。切片经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 于 JEM-100CX 透射电子显微镜观察和拍照。

1.2.3 精子的测量和数据统计 用 ZEISS Axioplan 2 imaging 光学显微镜成像并输入电脑, 所获精子照片用 AxioVision 4.0 软件进行测量, 共选择 15 条精子进行测量, 所得数据用 SPSS 软件进行群体特征统计分析, 对不同特征分别以平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 精子的形态和量度

在光镜和扫描电镜下峨眉髭蟾精子的形态相同, 精子细长, 主要由头部和尾部构成, 无明显的颈部。头部略粗于尾部, 呈螺旋状, 顶端尖细, 向后渐粗; 尾部呈弯曲状或波状。尾部无波动膜, 光镜下精子的顶体和细胞核, 头部与尾部无明显区别。精子的全长为 $(89.78 \pm 6.53) \mu\text{m}$, 头长 $(42.46 \pm 4.52) \mu\text{m}$, 头宽 $(0.72 \pm 0.1) \mu\text{m}$, 头部螺旋数为 (4.5 ± 0.7) 个, 尾长 $(47.32 \pm 4.52) \mu\text{m}$ 。扫描电镜下可见顶体末端与头部连接处略向内收缩。因此顶体和头部易于区别, 顶体长度为 $3.5 \mu\text{m}$, 约占精子头部总长的 8.24% (图 2, 3)。

2.2 精子的超微结构

超薄切片电镜观察结果显示, 峨眉髭蟾的精子由头部和尾部构成 (图 1)。

2.2.1 头部结构 头部由顶体复合物和细胞核构成。顶体复合物 (acrosome complex) 位于精子头部的最前端, 并延伸到细胞核的前段, 表面有细胞膜包裹。顶体复合物由顶体 (acrosome)、顶体下腔 (subacrosomal space) 和穿孔器 (perforatorium, scheltinga, 2002) 构成。顶体呈圆锥状, 由顶体内膜、顶体外膜和内部较电子致密的物质构成 (图 4—7)。顶体的厚度较一致, 仅末端膨大形成囊状结构 (图 8, 9), 顶体在细胞核的表面呈不对称分布, 纵切片和横切片显示其在细胞核两边的长度不一致 (图 8, 9)。顶体的下面是顶体下腔, 下腔中有穿孔器, 靠近细胞核顶端的下腔中可见一些颗粒样结构 (图 4)。穿孔器呈锥形, 由电子密度相同的纤维样物质构成, 横切片显示纤维样物质是由一束束的纤维构成, 外周没有膜包裹。穿孔器从精子头部前端一直到细胞核的前段, 与顶体平行, 或略长于顶体 (图 5—9)。

细胞核 (nucleus) 呈螺旋状, 核内染色质分布均匀, 电子致密, 外周由核膜包裹。细胞核的前端渐细呈锥状伸入顶体下腔, 核的顶端为电子透明状

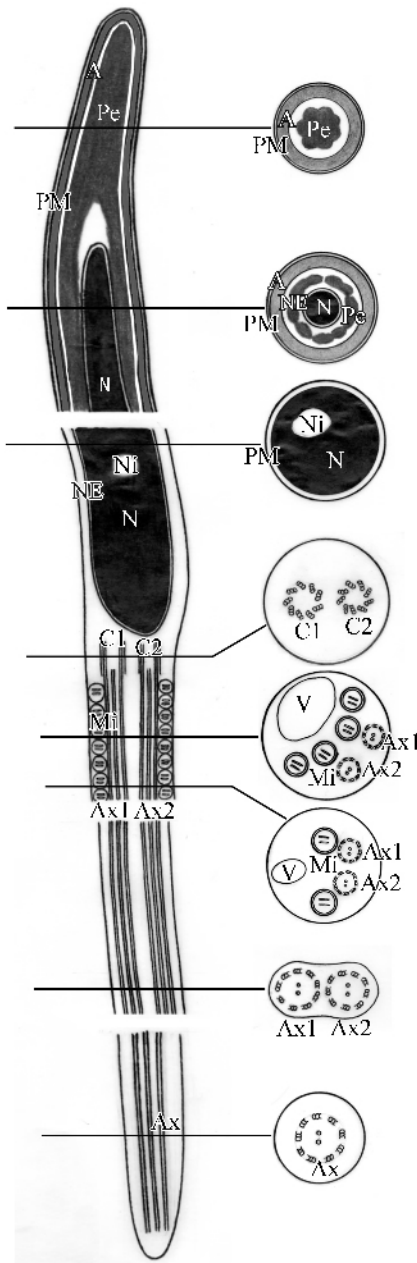


图 1 峨眉髭蟾精子结构模式图

Fig. 1 The structure pattern of the spermatozoon of *Vibrissaphora boringii*

A：顶体 (Acrosome)；Ax1，Ax2：轴丝 1，轴丝 2 (Axoneme 1，Axoneme 2)；C1，C2：中心粒 1，中心粒 2 (Centriole 1，Centriole 2)；Mi：线粒体 (Mitochondrion)；N：细胞核 (Nucleus)；NE：核膜 (Nuclear envelope)；NI：核内含物 (Nuclear inclusion)；Pe：穿孔器 (Perforatorium)；PM：细胞质膜 (Plasma membrane)；V：液泡 (vacuole)。

(图 4)；核的后端似椭圆形或锥形，无明显的核窝 (nuclear fossa 植入窝)。细胞核中存在电子透明的核内含物 (nuclear inclusions) (图 8，10，17)。

2.2.2 尾部结构 尾部由中心粒区 (centriole) 中段 (midpiece) 主段 (principal piece) 和末段

(end piece) 构成。中心粒区：又叫颈部 (neck piece)，较短，紧接在细胞核的后端，主要由 2 个中心粒和中心粒旁物质 (pericentriolar material) 构成。中心粒具典型结构，由 9 个三联微管形成风车状。2 个中心粒呈平行排列，并构成尾部轴丝的基部，中心粒旁为低电子密度的中心粒旁物质 (图 10)。

中段：主要由轴丝 (axoneme) 线粒体 (mitochondrion) 和液泡 (vacuole) 构成。轴丝为两根，紧接于颈部两个中心粒的后面，每根轴丝都具有典型的 9+2 结构，即中间是两条中央微管，外周 9 组二联微管。两根轴丝平行排列，外周被同一质膜包裹，双轴丝从尾部中段一直贯彻到主段。轴丝旁边是线粒体，线粒体圆球形，整齐地排列在轴丝旁，呈串状。在中段的前部和后部线粒体的分布不一致：在中段的前部，即靠近中心粒处，线粒体较密集，在轴丝旁可见 4 个或多个线粒体 (图 13，14)；而在中段的后部，每根轴丝的旁边仅见 2 个线粒体 (图 20，21)。此外，中段的轴丝旁可见许多低电子密度的液泡结构 (图 11)，随着中段的延长液泡逐渐减少，直至消失 (图 12)。

主段和末段：主段和末段的结构相同，仅由双轴丝构成，两根轴丝平行排列，周围有少量的细胞质，外周由质膜包裹，线粒体和液泡都已消失 (图 15，16，18，19)。此外，电镜下可见单根轴丝存在，即 1 个 9+2 结构，在轴丝的旁边有少量的细胞质，外周有质膜包裹 (图 19)。

3 讨论

3.1 精子的形态特征

本文结果表明，峨眉髭蟾精子的形态与已有报道的角蟾科的角蟾属 (*Megophrys*) 拟角蟾属 (*Ophryophryne*) 短腿蟾属 (*Branchytarsophrys*) (Zheng et al, 2000, 2002) 拟髭蟾属 (*Leptobrachium*) 和掌突蟾属 (*Leptotalax*) (Scheltinga, 2002) 物种精子的形态基本相似，其共同特点是精子细长，头部呈螺旋状，尾部呈波状或弯曲状，精子头部略粗于尾部，尾部无波动膜。说明峨眉髭蟾的精子具有角蟾科物种精子的科内共同形态特征。

通过本文结果和已有的研究结果可以看出，角蟾科物种精子各部分的量度存在明显差异 (表 1)，主要表现在两个基本方面：(1) 精子总长度的差异：如拟髭蟾属的东南亚拟髭蟾指名亚种 (*L. aff.*

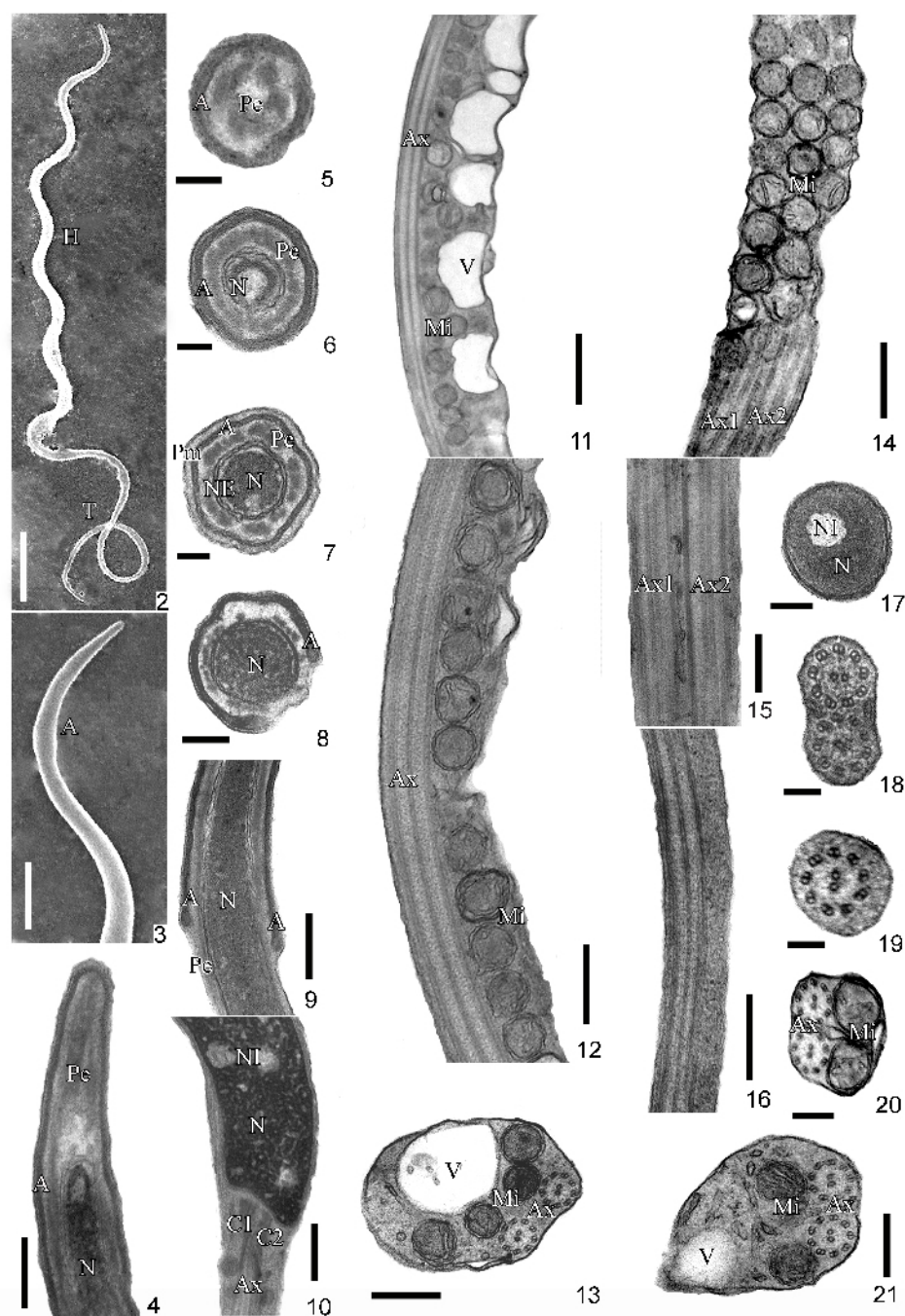


图 2—21 峨眉髭蟾精子的超微结构

Figs. 2—21 Ultrastructure of the spermatozoa of *Vibrissaphora boringii*

2. 精子的扫描电镜照片, 示头部、尾部 (SEM photograph of spermatozoa, showing head and tail), 比例尺 = $6 \mu\text{m}$;
3. 头部前端的扫描电镜照片, 示顶体 (SEM photograph of the anterior head, showing acrosome), 比例尺 = $2 \mu\text{m}$;
4. 头部前端的纵切片, 示顶体、穿孔器和细胞核 (Longitudinal section of the anterior head, showing acrosome, perforatorium, nucleus), 比例尺 = $0.3 \mu\text{m}$;
5. 头部顶端的横切片, 示顶体和纤维状的穿孔器 (Cross section of the anterior head, showing acrosome and perforatorium), 比例尺 = $0.1 \mu\text{m}$;
- 6, 7. 头部前端的横切片, 示顶体、纤维状的穿孔器、细胞核、核膜和细胞质膜 (Cross sections of the anterior head, showing acrosome, perforatorium, nucleus, nuclear envelope and plasma membrane), 比例尺 = $0.1 \mu\text{m}$;
8. 顶体后端的横切片, 示顶体囊不对称 (Cross section of the posterior acrosome, showing asymmetrically acrosome), 比例尺 = $0.2 \mu\text{m}$;
9. 顶体后端的纵切片, 示顶体囊不对称 (Longitudinal section of the posterior acrosome, showing asymmetrically acrosome), 比例尺 = $0.4 \mu\text{m}$;
10. 头后部和中心粒区的纵切, 示细胞核、核内含物、轴丝和 2 个中心粒 (Longitudinal section through the posterior head and the

centrioles ,showing nucleus ,nuclear inclusions ,two centrioles and axial fibre), 比例尺 = 0.6 μm ;

11. 尾部中段的纵切, 示轴丝、线粒体和液泡, 比例尺 = 1 μm 。

12, 14. 尾部中段的纵切, 示轴丝和线粒体 (Longitudinal sections of the middle piece of the tail ,showing axoneme and mitochondrion), 比例尺分别为 0.4、0.6 μm ;

13, 20, 21. 尾部中段的横切, 示双轴丝、线粒体和液泡 (Longitudinal sections of the middle piece of the tail ,showing axoneme ,mitochondrion and vacuoles), 比例尺分别为 0.4、0.2、0.3 μm ;

15, 16. 尾部主段的纵切, 示双轴丝 (Longitudinal sections of the principal piece of the tail ,showing axoneme), 比例尺 = 0.3、0.4 μm ;

17. 头部的横切片, 示细胞核和核内含物 (Cross section of the head ,showing nucleus and nuclear inclusion), 比例尺 = 0.4 μm ;

18, 19. 尾部主段的横切, 示轴丝 (Cross sections of the principal piece of the tail ,showing axoneme), 比例尺 = 0.1 μm 。

A : 顶体 (Acrosome); Ax1, Ax2 : 轴丝 (Axoneme); C1, C2 : 中心粒 (Centriole); H : 头部 (Head); Mi : 线粒体 (Mitochondrion); N : 细胞核 (Nucleus); NE : 核膜 (Nuclear envelope); NI : 核内含物 (Nuclear inclusion); Pe : 穿孔器 (Perforatorium); PM : 细胞质膜 (Plasma membrane); T : 尾部 (Tail); V : 液泡 (vacuole)。

表 1 角蟾科 11 个种的精子量度

Tab. 1 Sperm size of some species in Megophryidae (μm)

种名 Species	<i>n</i>	头长 Head length	尾长 Tail length	总长 Total length	头宽 Head width	头部螺旋数 Number of head spirals	数据来源 Data source
峨眉髭蟾 <i>Vibrissaphora boringii</i>	15	42.46 ± 4.52 (47.29%)	47.32 ± 5.10 (52.71%)	89.78 ± 6.53	0.72 ± 0.12	4.5 ± 0.73	This study
东南亚拟髭蟾指名亚种 <i>Leptobrachium aff. hasselti</i>	21	19.8 ± 1.0	27.5 ± 2.5	47.3 ± 3.1	0.71 (<i>n</i> = 4)	3.5	Scheltinga , 2002
尊氏掌突蟾 <i>Leptotalax dringi</i>	11	40.3 ± 1.3	52.4 ± 1.6	92.5 ± 1.7	0.5 (<i>n</i> = 1)	3.5	Scheltinga , 2002
图画掌突蟾 <i>Leptotalax pictus</i>	23	22.3 ± 0.8	41.1 ± 1.6	63.3 ± 1.9	0.6 (<i>n</i> = 2)	3.5	Scheltinga , 2002
小口拟角蟾 <i>Ophryophryne microstoma</i>	15	44.93 ± 2.31 (47.39%)	49.88 ± 2.54 (52.61%)	94.81 ± 3.17	0.98 ± 0.02	6.7 ± 0.88	Zheng et al , 2002
费氏短腿蟾 <i>Branchytarsophrys feae</i>	15	82.40 ± 4.3 (52.60%)	74.27 ± 4.32 (47.40%)	156.67 ± 3.55	0.67 ± 0.03	18.1 ± 1.20	Zheng et al , 2002
宽头短腿蟾 <i>B. carinensis</i>	15	79.47 ± 3.17 (54.88%)	65.43 ± 4.78 (45.12%)	144.90 ± 6.46	0.68 ± 0.02	17.5 ± 0.71	Zheng et al , 2002
墨脱角蟾 <i>Megophrys medogensis</i>	15	37.72 ± 1.39 (41.70%)	52.80 ± 3.27 (58.30%)	90.52 ± 3.68	0.97 ± 0.02	5.5 ± 0.52	Zheng et al , 2000
大花角蟾 <i>M. gigantea</i>	20	91.38 ± 4.22 (54.78%)	75.44 ± 4.45 (45.22%)	166.82 ± 3.24	0.66 ± 0.03	16.6 ± 1.34	Zheng et al , 2000
峨眉角蟾 <i>M. omeimontis</i>	20	57.55 ± 2.12 (45.48%)	68.99 ± 4.93 (54.52%)	126.54 ± 5.49	0.91 ± 0.03	11.6 ± 0.50	Zheng et al , 2000
景东角蟾 <i>M. jingdongensis</i>	15	57.20 ± 4.03 (46.78%)	65.14 ± 5.03 (53.22%)	122.34 ± 7.21	0.92 ± 0.02	10.7 ± 0.95	Zheng et al , 2000

百分比为精子各部与精子总长之比 (Percentage represents the relative length); *n* 为精子数 (Number of sperms)。

hasselti) 精子较短, 全长为 47.3 μm (Scheltinga , 2002); 短腿蟾属的精子较长, 全长为 144.9—156.57 μm , 且头部长于尾部; 而角蟾属物种精子的量度属内差异较大, 如墨脱角蟾 (*M. medogensis*) 精子的全长仅有 90.52 μm , 而大花角蟾 (*M. gigantea*) 的全长为 166.82 μm , 头部也长于尾部 (Zheng et al , 2000 , 2002) 。（2）头部宽度、螺旋分布和数量差异: 如拟髭蟾属、掌突蟾属物种精子头部螺旋状弯曲分布均匀, 螺旋数为 3—4 个。短腿蟾属物种和角蟾属的大花角蟾头部螺旋较多 (17—18 个), 但螺旋的分布不一样: 短腿蟾属头部前段螺旋较密, 中段似波状, 后段较均匀; 大花角

蟾头部前段螺旋细而密 (14—18 个), 中段直, 后段螺旋稀少 (2—3 个)。小口拟角蟾精子的头部较宽 (0.98 μm) (Zheng et al , 2002), 而掌突蟾属的尊氏掌突蟾 (*Leptotalax dringi*) 头部较窄, 为 0.5 μm 。本文峨眉髭蟾精子的全长为 89.78 μm , 螺旋数为 4—5 个, 分布较均匀, 头宽为 0.72 μm 。因此, 比较已有的研究结果表明, 角蟾科物种的精子虽然具有同科内的共同形态特征, 但精子各部分的量度、头部螺旋的分布与数量、头部宽度, 在属间和种间存在明显差异, 这种差异可为该科的属、种分类和系统研究提供新的依据 (Zheng et al , 2000 , 2002)。

3.2 精子的超微结构特征

本文结果显示峨眉髭蟾精子的超微结构与角蟾科中已有报道的拟髭蟾属和掌突蟾属物种 (Scheltinga, 2002) 精子的基本结构相同, 其共同特征为: 精子都具有锥形的顶体, 顶体下腔中有纤维束构成的穿孔器, 细胞核呈螺旋状, 无明显的核窝, 中心粒平行排列, 尾部具双轴丝, 线粒体位于精子尾部的中段, 尾部无轴纤维、边缘丝和波动膜, 但具有大量的液泡。角蟾科精子的结构与已有报道的无尾两栖类其他科物种精子的结构相比较, 具有明显的差别 (表 2), 如蛙科、雨蛙科、蟾蜍科、盘舌蟾科、滑趾蟾科、龟蟾科和尾蟾科等科物种精子的尾部仅有单根轴丝, 中心粒呈垂直或倾斜排列, 多数物种精子都具有核窝; 蛙科精子的顶体小, 呈囊状, 无穿孔器; 滑趾蟾科精子的顶体呈七角形; 蟾蜍科、滑趾蟾科和雨蛙科的肥蛙属 (*Pachymedusa*) 和雨滨蛙属 (*Litoria*) 精子尾部具有波动膜、轴纤维和轴丝旁纤维; 雨蛙科雨蛙属 (*Hyla*) 物种精子尾部具有致密纤维; 尾蟾科精子头部具有核内通道等 (Lin et al, 1999; Lin & You, 2000; Scheltinga et al, 2001; Lee & Jamieson, 1992, 1993; Jamieson et al, 1993)。因此, 可以看出角蟾科精子的结构不同于无尾类其他科精子的结构, 具有明显的科间差别。

此外, 本文结果与已有的研究 (Scheltinga et al, 2001) 相比较还可看出, 角蟾科精子的结构在不同属间存在明显差异, 主要为顶体长度、尾部线粒体分布和数量, 以及轴丝的排列等: 如掌突蟾属物种顶体较长, 超出细胞核前端较长距离; 而拟髭蟾属的较短, 附着在细胞核的前端, 顶体长 $3.3 \mu\text{m}$; 峨眉髭蟾的顶体长度为 $3.5 \mu\text{m}$, 与拟髭蟾属的相似, 也附着在细胞核的前端; 拟髭蟾属和掌突蟾属物种精子尾部的双轴丝呈分开状, 在两轴丝间有大量的细胞质, 而峨眉髭蟾的双轴丝在尾部前段呈分开状, 在尾部后段排列较紧密; 掌突蟾属物种精子的线粒体位于轴丝旁或两轴丝之间, 拟髭蟾属和峨眉髭蟾的线粒体位于轴丝旁; 掌突蟾属和拟髭蟾属物种精子尾部存在两排线粒体, 而峨眉髭蟾尾部线粒体的分布不一致, 中段前部有多个线粒体, 后部为两个线粒体, 主段无线粒体; 峨眉髭蟾尾部末端出现单轴丝, 但在掌突蟾属和拟髭蟾属中未见有单轴丝的报道; 峨眉髭蟾尾部液泡较大, 主要存在于尾部的中段, 而掌突蟾属和拟髭蟾属的液泡存

在于尾部主段的前部, 向后逐渐减少。这些说明角蟾科物种精子的超微结构在不同的属间存在明显的差异 (表 3)。

3.3 精子形态结构及分类学意义

髭蟾属是由 Liu (1945) 根据峨眉髭蟾订立 (峨眉髭蟾是该属的模式种), 但长期来对该属的分类地位和系统位置存在较多分歧意见, 如 Dubois (1980) 认为髭蟾属是拟髭蟾属的同物异名, Dubois & Ohler (1998) 承认髭蟾属与拟髭蟾属有差别, 但指出由于部分物种的一些特征有交叉, 因此建议将其作为拟髭蟾属的一个亚属 *Leptobrachium* (*Vibrissaphora*); Huang et al (1991) 等的研究表明髭蟾属与拟髭蟾属蝌蚪的口内部主要特征是较为一致的, 但 Liu et al (1980) 和 Fei et al (1995) 的形态学研究表明虽然髭蟾属和拟髭蟾属物种的成体极相近似, 但由于髭蟾属的第二性征异常特殊, 即在繁殖季节雄蟾上唇缘有黑色锥状角质刺以及其他一些特征而显著区别于拟髭蟾属, 应独立为属; Zhao et al (1983) 认为从核学的角度看, 髭蟾属与拟髭蟾属有明显差别。现不少学者普遍采用髭蟾属 (Fei et al, 2005; Zhao et al, 1983; Frost, 2004)。Zheng et al (2004) 根据 DNA 序列进行属间系统分析, 表明髭蟾属和拟髭蟾属互为姐妹群。本文对髭蟾属的峨眉髭蟾和拟髭蟾属的东南亚拟髭蟾指名亚种 (Scheltinga, 2002) 精子的形态和超微结构进行比较, 结果表明两属物种精子的形态和结构既存在较高的相似性, 又具有明显的差异 (表 3): 如东南亚拟髭蟾精子较短, 总长度为 $47.3 \mu\text{m}$, 而峨眉髭蟾的精子明显长于东南亚拟髭蟾, 全长为 $89.78 \mu\text{m}$; 东南亚拟髭蟾精子尾部的双轴丝常分开, 中间充满细胞质, 未观察到单轴丝, 而峨眉髭蟾的双轴丝平行排列, 互相邻近的, 尾部末端出现单根轴丝; 东南亚拟髭蟾精子尾部的线粒体为两排, 位于两轴丝旁, 而峨眉髭蟾尾部线粒体的分布不一致, 在尾部中段前部有多个线粒体, 后部为 2 排线粒体, 线粒体常位于轴丝的旁边, 主段无线粒体; 东南亚拟髭蟾的液泡存在于尾部的主段前端且较小, 而峨眉髭蟾尾部液泡较大和较多, 主要存在于尾部的中段。由此可知, 与形态学研究结果一样, 髭蟾属和拟髭蟾属物种精子的形态和超微结构存在明显的差异, 支持髭蟾属的有效性。同时也表明精子结构特征所蕴涵的进化信息, 对角蟾科属种的分类和系统学研究具有重要意义。

表 2 无尾两栖类部分科精子的超微结构
Tab. 2 Sperm ultrastructure of some families in Anura

科 Family	顶体 Acrosome	顶体下腔 Subacrosomal space	穿孔器 Perforatorium	核窝 Nuclear fossa	中心粒 Centriole	线粒体 Mitochondrion	轴丝数 Axoneme number	轴纤维 Axial fiber	轴丝旁纤维 Juxta-axial fiber	波状膜 Undulating membrane	资料来源 Reference source
盘舌蟾科 Discoglossidae	圆柱状 Cylindrical	无 Absent	有 Present	有 Present	倾斜 Oblique	分散 Scattered	单根 One	有 Present	有 Present	有 Present	Scheltinga, 2002
尾蟾科 Ascaphidae	圆锥状 Conical	有 Present	有 Present	有 Present	倾斜 Oblique	分散 Scattered	单根 One	有 Present	无 Absent	有 Present	Jamieson et al., 1993
滑趾蟾科 Leiopelmatidae	七角形 Heptagonal	有 Present	有 Present	有 Present	相邻 Adjacent	分散 Scattered	单根 One	有 Present	有 Present	有 Present	Scheltinga, 2002
龟蟾科 Myobatrachidae	圆锥状 Conical	有 Present	有 Present	有 Present	倾斜 Oblique	分散 Scattered	单根 One	有 Present	无 Absent	有 Present	Scheltinga, 2002
蟾蜍科 Bufonidae	圆锥状 Conical	有 Present	有 Present	有 Present	垂直和倾斜 Perpendicular and oblique	分散 Scattered	单根 One	有 Present	有或无 Present and absent	有 Present	Scheltinga, 2002
雨蛙科 Hylidae	圆锥状 Conical	有 Present	有 Present	有 Present	倾斜和垂直 Oblique and perpendicular	分散 Scattered	单根 One	有或无 Present and absent	有或无 Present and absent	有或无 Present and absent	Lin et al., 1999; Meyer, 1997
蛙科 Ranidae	圆盘状 Disc	无 Absent	无 Absent	有 Present	垂直 Perpendicular	分散 Scattered	单根 One	无 Absent	无 Absent	无 Absent	Scheltinga, 2002
合附蟾科 Pelodytidae	圆锥状 Conical	有 Present	有 Present	有 Present	垂直 Perpendicular	分散 Scattered	单根 One	有 Present	无 Absent	有 Present	Scheltinga, 2002
角蟾科 Megophryidae	圆锥状 Conical	有 Present	有 Present	无 Absent	平行 Parallel	两排 Two	两根 Two	无 Absent	无 Absent	无 Absent	This study

表 3 角蟾科精子结构比较
Tab. 3 Comparison of sperm structure in Megophryidae

种名 Species	顶体与细胞核的距离 Space of nucleus and acrosome	轴丝排列 Range of axoneme	线粒体分布 Distribution of mitochondrion	线粒体位置 Location of mitochondrion	液泡位置 Location of vacuole	轴丝数 Axoneme number of end piece	资料来源 Reference source
峨眉髭蟾 <i>Vibrissaphora bornigii</i>	短 Short	相邻 Adjacent	分散到两排 Scattered to two rows	轴丝旁 Side of axoneme	中段, 大 Midpiece, large	单根 One	This study
东南亚拟髭蟾指名亚种 <i>Leptobrachium aff. Hasselti</i>	短 Short	分开 Separate	两排 Two rows	轴丝旁 Side of axoneme	主段, 小 Principal piece, small	两根 Two	Scheltinga, 2002
尊氏掌突蟾 <i>Leptolalax dringi</i>	长 Long	分开 Separate	两排 Two rows	轴丝间 Between axoneme	主段, 小 Principal piece, small	两根 Two	Scheltinga, 2002

致谢：中国科学院成都生物研究所李建帮助绘

图，刘炯宇和王燕协助处理图片，在此一并致谢。

参考文献：

- Costa GC, Garda AA, Teixeira RD, Colli GR, B ao SN. 2004. Comparative analysis of the sperm ultrastructure of three species of *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae) [J]. *Acta Zool* (Stockholm), **85**: 257 – 262.
- Dubois A. 1980. Notes sur la systematique et la repartition ea amphibiens anoures de Chine et des regions avoisinantes. Classification generique des supragenerique des Pelobatidae Megophryinae [J]. *Bull Mens SocLinnLyon*, **49**: 469 – 482.
- Dubois A, Ohler A. 1998. A new species of *Leptobranchium* (*Vibrissaphora*) from northern Vietnam, with a review of the taxonomy of the genus *Leptobranchium* (Pelobatidae, Megophryinae) [J]. *Dumerilia*, **4** (1): 1 – 32.
- Forst DR. 2004. Amphibian Species of the World [EB/OL]: An online reference. Version 3.0 (22 August, 2004). Electronic Database Accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Fei L, Ye CY, Jiang JP. 1995. Study of the classification and phylogenetic relationship of *Vibrissaphora* (Amphibia, Pelobatidae) [J]. *Cultum Herpetologica Sinica*, **4** – **5**: 65 – 71. [费梁, 叶昌媛, 江建平. 1995. 髭蟾属的分类及其系统发育的研究. 两栖爬行动物学研究, **4** – **5**: 65 – 71.]
- Fei L, Ye CY, Huang YZ, Jiang JP, Xie F. 2005. An Illustrated Key to Chinese Amphibians [M]. Chengdu: Sichuan Publishing Group, Sichuan Publishing House of Science and Technology, 55 – 87. [费梁, 叶昌媛, 黄永昭, 江建平, 谢锋. 2005. 中国两栖动物检索及解鉴. 成都: 四川出版集团·四川科学技术出版社, 55 – 87.]
- Huang YZ, Fei L, Ye CY. 1991. Studies on internal oral structures of tadpoles of Chinese Pelobatidae [J]. *Acta Biologica Plateau Sinica*, **10**: 71 – 99. [黄永昭, 费梁, 叶昌媛. 1991. 中国锄足蟾科 (Pelobatidae) 蝌蚪口内部结构的研究. 高原生物学集刊, **10**: 71 – 99.]
- Jamieson BGM, Lee MSY, Long K. 1993. Ultrastructure of the spermatozoon of the internally fertilizing frog *Ascaphus truei* (Ascaphidae: Anura: Amphibia) with phylogenetic considerations [J]. *Herpetologica*, **49** (1): 52 – 65.
- Kuramoto M. 1996. Generic differentiation of sperm morphology in treefrogs from Japan and Taiwan [J]. *J Herpetol*, **30** (3): 437 – 443.
- Kuramoto M. 1997. Further studies on sperm morphology of Japanese salamanders, with special reference to geographic and individual variation in sperm size [J]. *Jpn J Herpetol*, **17** (1): 1 – 10.
- Kuramoto M. 1998. Spermatozoa of several frog species from Japan and adjacent regions [J]. *Jpn J Herpetol*, **17** (3): 107 – 116.
- Lee MSY, Jamieson BGM. 1992. The ultrastructure of the spermatozoa of three species of myobatrachid frogs (Anura, Amphibia): With phylogenetic considerations [J]. *Acta Zool* (Stockholm), **73**: 213 – 222.
- Lee MSY, Jamieson BGM. 1993. The ultrastructure of the spermatozoa of bufonid and hylid frogs (Anura, Amphibia): Implications for phylogeny and fertilization biology [J]. *Zool Scripta*, **22**: 309 – 323.
- Liu CC. 1945. New frogs from west China [J]. *West China Border Res Soc*, **15** (B): 28 – 43, 3 plates.
- Liu CC, Hu SQ, Zhao EM. 1980. Preliminary study genus *Vibrissaphora* (Amphibia: Sinica) and discussion on problems of amphibian classification [J]. *Acta Herpetol Sin*, **3** (1): 1 – 9. [刘承钊, 胡淑琴, 赵尔宓. 1980. 髭蟾属 *Vibrissaphora* 和种的初步探讨 及其与分类学有关问题的讨论. 两栖爬行动物学报, **3** (1): 1 – 9.]
- Lin DJ, You YL, Zhong XY. 1999. The structure of the spermatozoon of *Hyla chinensis* and its bearing on phylogeny [J]. *Zool Res*, **20** (3): 161 – 167. [林丹军, 尤永隆, 钟秀容. 1999. 中国雨蛙精子结构及其在系统发育上的意义. 动物学研究, **20** (3): 161 – 167.]
- Lin DJ, You YL. 2000. Spermiogenesis in *Hyla chinensis* [J]. *Acta Zool Sin*, **46** (4): 376 – 384. [林丹军, 尤永隆. 2000. 中国雨蛙精子形成的研究. 动物学报, **46** (4): 376 – 384.]
- Meyer E, Jamieson BGM, Scheltinga DM. 1997. Sperm ultrastructure of six Australian hylid frogs from two genera (*Litoria* and *Cyclorana*): Phylogenetic implications [J]. *J Submicro Cyt Pathol*, **29**: 443 – 451.
- Scheltinga DM. 2002. Ultrastructure of the spermatozoa of the Amphibia: Phylogenetic and taxonomic implications [D]. Australia: University of Queensland, Australia, 320.
- Wang S, Zhao EM. 1998. China Red Book of Endangered Animals Amphibia & Reptilia [M]. Beijing: Beijing Science Press, 59 – 61. [汪松, 赵尔宓. 1998. 中国濒危动物红皮书——两栖类和爬行类. 北京: 科学出版社, 59 – 61.]
- Zhao EM, Wu GF, Yang WM. 1983. Studies on genus *Vibrissaphora* (Amphibia: Pelobatidae) 5: A comparative study of the karyotypes of genus *Vibrissaphora* [J]. *Acta Herpetol Sin*, **2** (1): 15 – 20. [赵尔宓, 吴贵夫, 杨文明. 1983. 髭蟾属 *Vibrissaphora* 的研究 5. 染色体组型的比较. 两栖爬行动物学报, **2** (1): 15 – 20.]
- Zheng YC, Mo BH, Liu ZJ, Zeng XM. 2004. Phylogenetic relationships of *Megophryid* genera (Anura: Megophryidae) based on partial sequences of mitochondrial 16S rRNA gene [J]. *Zool Res*, **25** (3): 205 – 213. [郑渝池, 莫邦辉, 刘志君, 曾晓茂. 2004. 基于 16S rRNA 基因序列的角蟾科部分属间系统关系. 动物学研究, **25** (3): 205 – 213.]
- Zheng ZH, Fei L, Ye CY. 2000. Study on morphology of spermatozoa of *Megophrys* (Amphibia: Pelobatidae) from China [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, **6** (2): 161 – 165. [郑中华, 费梁, 叶昌媛. 2000. 中国角蟾属精子的形态学研究. 应用与环境生物学报, **6** (2): 161 – 165.]
- Zheng ZH, Fei L, Ye CY, Xie F, Jiang JP. 2002. Comparative study on sperm morphology of Chinese Megophryinae and its taxonomical sense (Amphibia: Pelobatidae) [J]. *Acta Zootax Sin*, **27** (1): 167 – 172. [郑中华, 费梁, 叶昌媛, 谢锋, 江建平. 2002. 中国角蟾亚科精子形态比较及分类讨论. 动物分类学报, **27** (1): 167 – 172.]
- Zheng ZH, Jiang JP, Xie F. 2005. Ultrastructure of the spermatozoa in Longdong stream salamander *Batrachuperus longdongensis* (Urodela: Hynobiidae) [J]. *Acta Zool Sin*, **51** (4): 703 – 709. [郑中华, 江建平, 谢锋. 2005. 龙洞山溪鲵精子的超微结构. 动物学报, **51** (4): 703 – 709.]