

不同取样方式下大凉螈精子形态变化

程明阳^{①②} 张勘^③ 梁福轩^① 何流洋^③ 朱玉东^③

虞皓琦^{①②} 肖璐瑶^{①②} 郑普阳^{①②④} 谢锋^{①*}

① 中国科学院成都生物研究所 成都 610041; ② 中国科学院大学 北京 100049;

③ 四川栗子坪国家级自然保护区 雅安 625400; ④ 四川大学生命科学学院 成都 610041

摘要: 精子形态在精子竞争和精子进化中具有重要地位。体内受精有尾两栖类雌性和雄性均具有复杂的泄殖腺体, 都可能对精子形态进行进一步包装和修饰, 但这些过程对精子形态特征和功能的影响目前所知甚少。本研究以体内受精的大凉螈 (*Liangshantriton taliangensis*) 为研究对象, 系统观察了破碎睾丸、雄性自然排精和冲洗雌性泄殖腔 3 种方法所收集精子的形态变化; 同时, 分别利用了 *t* 检验、*t'* 检验或 *U* 检验, 探究了其定量变化。结果显示: 取自精子囊和雌性泄殖腔的精子可观察到明显的颈部, 而破碎睾丸取样的精子仅观察到胞质小团结构, 无明显颈部结构, 故推测睾丸中精子尚未成熟; 精子在由睾丸到排出体外过程中顶体显著缩短, 尾部所占比例显著增加 (*U* 检验或 *t* 检验, $P < 0.05$), 而精子在由精子囊到进入雌性体内的过程中未发生形态或量度上的显著变化 (*U* 检验或 *t* 检验, $P > 0.05$), 仅表现为顶体的进一步缩短 (*t* 检验, $P < 0.05$)。本研究提示, 精子由睾丸到排出体外的过程中可能因其经历的修饰过程而展现出形态和量度上的差异, 为精子生物学研究和精子保存提供了选择依据。

关键词: 大凉螈; 精子取样方式; 精子形态; 精子修饰

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 04-554-09

Sperm Morphological Change of *Liangshantriton taliangensis* Under Different Sampling Methods

CHENG Ming-Yang^{①②} ZHANG Kan^③ LIANG Fu-Xuan^① HE Liu-Yang^③ ZHU Yu-Dong^③
YU Hao-Qi^{①②} XIAO Lu-Yao^{①②} ZHENG Pu-Yang^{①②④} XIE Feng^{①*}

① Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041; ② University of Chinese Academy

of Sciences, Beijing 100049; ③ Sichuan Liziping National Nature Reserve, Ya'an 625400;

④ College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: [Objectives] Sperm morphology is important in sperm competition and sperm evolution. The complex cloacal glands in both males and females of caudate amphibians with internal fertilization may be

基金项目 国家重点研发计划重点专项 (No. 2017YFC0505202), 四川省科技重大专项 (No. 2018SZDZX0036), 生态环境部生物多样性保护专项 (No. 2111101), 四川栗子坪国家级自然保护区物种保护项目 (No. 2022);

* 通讯作者, E-mail: xiefeng@cib.ac.cn;

第一作者介绍 程明阳, 男, 硕士研究生; 研究方向: 两栖类生态学; E-mail: 1046232332@qq.com。

收稿日期: 2022-12-06, 修回日期: 2023-04-04 DOI: 10.13859/j.cjz.202304008

responsible for further packaging and modification of spermatogenesis, but little is known about the effects of these processes on sperm morphology and function. **[Methods]** In this study, the species *Liangshantriton taliangensis* which practices internal fertilization by transferring a spermatophore was studied. The morphological changes of the features of spermatozoa collected by 3 kinds of sampling methods (testes crashing, spermatophore, and female cloaca flushing) were systematically compared. Using *t*-test, *t*'-test, or Mann-Whitney *U* test, we analyzed the sperm morphological changes, and significant differences were set at $P < 0.05$. **[Results]** The sperm from the spermatophore and female cloaca flushing had a distinct neck, while the sperm from the testes had no such structure, but with cytoplasmic masses around the sperm head (Fig. 1). In addition, sperm shortens the acrosome and increases the proportion of sperm tail in the process of being passed out of the body by the testes (Mann-Whitney *U* test or *t*-test, $P < 0.05$) (Table 1), no significant change (Mann-Whitney *U* test or *t*-test, $P > 0.05$) in sperm morphology and measurement during the process from spermatophore to female body except for the further shortening of acrosome (*t*-test, $P < 0.05$) (Table 2). **[Conclusion]** These results suggest that sperm samples from the testis, spermatophore, or female ejaculatory cavity may show morphological and functional differences due to modification processes, which provide great options for the sampling method for the sperm biology or sperm conservation studies.

Key words: *Liangshantriton taliangensis*; Sperm sampling methods; Sperm morphology; Sperm modification

精子细胞被认为是进化最快、形态最多样的细胞类型之一 (Pitnick et al. 2009)。与体外受精的物种相比, 体内受精物种的精子所处环境更复杂, 其精子长度通常也 longer, 形态更复杂, 进化差异更大 (Evans et al. 2013, Lüpold et al. 2013)。精子作为精子竞争中的最直接武器, 其形态特征与精子质量相关并影响了精子的竞争力 (Pitnick et al. 2009), 是精子研究的重要性状。

除小鲵科 (Hynobiidae) 和隐鳃鲵科 (Cryptobranchidae) (可能还有鳗螈科 Sirenidae) 外, 绝大多数有尾类进行体内受精 (Wells 2010)。雄性泄殖腔腺体打包精子于精子囊 (spermatophore) 中, 精子囊被排出体外后由雌性利用泄殖腔口主动接收完成精子传递 (Kühnel et al. 2010)。雌性接收精子后将其储存在泄殖腔顶部的特殊储精腺体中 (spermathecae), 精子会在其中储存几天至数月直至雌性产卵 (Sever 1991)。

有尾类的精子在睾丸中已初步形成。Selmi 等 (1997) 对睾丸中精子观察发现蝾螈科 (Salamandridae) 物种精子由圆柱形的头部和

长尾组成, 头部具有顶体, 尾部具波动膜, 尾部末段为游离的轴丝。精子在睾丸中形成后, 从支持细胞释放, 经过一系列导管被转运至泄殖腔中 (Williams et al. 1984)。蝾螈科中, 从睾丸中转运精子的导管系统相对复杂, 包括输精管 (vasa efferentia)、Bidder's 管、附睾传入管 (afferent epididymal ducts) 和附睾传出管 (efferent epididymal ducts) 等, 该导管游离面具有分泌细胞, 参与精子的进一步成熟。在精子被排出体外前, 雄性将其储存在这些导管中 (Williams et al. 1984, Sperone et al. 2009), 储精腺可能在不同类群中有或简单或复杂的结构 (Sever 1994, 2013)。

精子进入雄性泄殖腔后, 被进一步打包成精子囊, 雄性泄殖腔中的一系列腺体参与了精子囊的打包, 包括盆腔腺 (pelvic glands) 和 Kingsbury's 腺分泌形成精子囊帽盖 (cap) 部分, 腹前腺 (anterior ventral glands) 分泌形成精子囊基部 (base), 盆腔腺和腹后腺 (posterior ventral gland) 分泌形成帽盖和基部的连接部分 (Sever et al. 1985, 1990)。

在研究有尾类精子形态时, 常用的取样方

法有 4 种: 1) 解剖雄性直接破碎睾丸进行取样, 得到的是未经精子转运导管系统和泄殖腔腺体修饰的精子; 2) 挤压雄性腹部或冲洗雄性泄殖腔进行取样, 得到的精子经过了精子转运导管系统的进一步修饰; 3) 收集自然排出的精子囊进行取样, 得到的精子不仅经过了精子转运导管系统的修饰, 还经过了雄性泄殖腔腺体的修饰; 4) 冲洗雌性泄殖腔进行取样, 得到的精子已经过所有精子转运导管系统和泄殖腔腺体修饰, 甚至还可能经过了雌性泄殖腔腺体的更进一步修饰。

多项研究运用不同的取样方法描述了蝾螈科多个物种的精子形态, Selmi 等 (1997) 解剖来自体内受精的蝾螈科 4 个物种的睾丸和输精管并研究了其精子形态, 结果显示 4 个被研究物种的精子形态相似, 其精子主要由头部和尾部组成, 其中头部带有顶体, 尾部带有波动膜, 但未发现和提及可明显区分的精子颈部; Kuramoto 等 (1997) 通过挤压雄性腹部收集精子的方式取样, 发现琉球棘螈 (*Echinotriton andersoni*) 的精子具有明显的颈部; 郑中华等 (2004) 对镇海棘螈 (*Echinotriton chinhaiensis*) 精子的超微结构进行研究时, 收集交配行为中自然排出的精子囊, 同样观察到其精子具有明显的颈部; 而 Kuramoto (1995) 通过挤压雄性腹部收集精子并研究了蝾螈属 (*Cynops*) 2 个物种的精子形态并观察到了颈部, 但长度较短。以上有关蝾螈科的研究中, 通过不同方法收集得到的精子在形态、尤其是颈部的判断结果上较为模糊, 这进一步提示不同的取样方法所得到的结果会有所不同。

推测在有尾类精子形态的研究中, 不同的取样方法可能忽略了精子由睾丸到排出体外的进一步成熟过程, 睾丸中未完全成熟的精子形态并不能代表最终进入雌性体内的精子状态。为探究不同取样方法对精子形态的影响, 本研究选取我国西南地区特有的、全球受胁的、国家二级重点保护野生动物大凉螈 (*Liangshantriton taliangensis*) 为研究对象,

通过对比并检验解剖雄性睾丸、收集雄性自然排出精子囊和冲洗雌性泄殖腔 3 种不同精子取样方法所收集精子的形态结构差异和量度差异, 揭示精子由睾丸到排出体外并进入雌性体内全过程中的重要形态变化, 以期能为有尾类精子比较生物学研究和精子保存中最佳取样方式的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物的获取

破碎睾丸取样样本由郑中华等人于 1998 年 7 月采集自四川石棉种群, 本文仅对其制备得到的精子涂片样品进行重新观察、拍照、测量和分析, 所用样品 1 号雄性, 为“大凉螈-4” (郑中华等 2000)。

用于其他精子采样的大凉螈 3 尾雌性和 3 尾雄性个体均于 2019 和 2020 年的 5 至 7 月期间采集于四川石棉栗子坪国家级自然保护区公益海保护站的大凉螈自然繁殖场 (29°01'13" N, 102°23'24" E)。用抄网捕捉出现于繁殖场中的繁殖个体, 并收集其精子进行测量分析, 全程无损伤, 动物取样后原地放归。

1.2 精子涂片的制备

收集精子囊取样样本时, 为诱导大凉螈排精, 将收集得到的 3 尾雄性被试分别投入配有 1 尾雌性的长 × 宽 × 高为 42 cm × 30 cm × 23 cm 的方形白色不透明塑料水盆中, 并在盆内设置 10 cm 深水, 盆底铺设粗糙的石板, 方便动物爬行和精子囊粘附。约 24 h 后可观察到明显可见的精子囊在盆底附着或漂浮于水中, 此时取出配对动物, 滤出被试雄性所排出的未被雌性利用的精子囊后, 立即将动物放归自然繁殖场地。将收集的精子囊剪碎, 并涂于载玻片上, 待其自然干燥后, 用甲醇浸泡固定 10 min, 再经 0.25% 苯胺蓝染色液染色 10 ~ 15 s, 最后用蒸馏水冲洗残余染色液, 再次干燥后得到精子涂片样本。

收集雌性泄殖腔取样样本时, 捕捉在繁殖场内出现的处于繁殖期的 3 尾雌性, 利用滴管

吸取蒸馏水冲洗泄殖腔以收集其储精腺中储存的精子，将冲出的液体涂片，精子涂片制备方法同上。

1.3 精子观察与测量

睾丸来源的精子历史涂片和精子囊来源的精子涂片分别从各 1 尾雄性个体的精子样品中挑选 20 条进行测量分析，用于比较精子在排出体外前后的差异。为比较精子在进入雌性体内前后的差异，考虑到雌性的多次交配行为，从雌性泄殖腔中冲出的精子可能来自于多个雄性个体，故测量并比较采集自 3 尾被试雌性个体泄殖腔的 3 份样品和采集自 3 尾被试雄性个体（精子囊）的 3 份样品，每份样品各挑选 20 条精子。利用 Nikon E200 光学显微镜观察涂片，挑选形态完整且清晰的精子，在 400 倍放大下拍摄。将图像导入 Image J version 1.52 (NIH, Bethesda, MD) 中测量每条精子的顶体长 (acrosome length, AL)、头长 (head length, HL)、颈长 (neck length, NL)、尾长 (tail length, TL, 尾长不含游离的轴丝)、头宽 (head width, HW, 头部最宽处宽度) 等 5 项形态参数。最后根据头长、颈长和尾长之和计算精子全长 (total sperm length, TSL); 考虑到精子大小的个体间变异 (Iwata et al. 2011, Hirohashi et al. 2016, Apostólico et al. 2018, 程明阳等 2021), 计算精子各部分占该精子全长的比例 (相对长度), 以反映精子进一步成熟时各部分结构是否有相对增长或缩短的量度变化。另外, 鉴于郑中华等 (2004) 测得大凉蠊精子的轴丝长度 (axoneme length) 变异较大 [$(54.4 \pm 20.0) \mu\text{m}$], 是长度很不稳定的一个部分, 故本次不测量和比较轴丝长度。软件测量数值精确到 $0.1 \mu\text{m}$ 。为减少系统误差, 所有测量工作均由同一人完成。

1.4 数据分析

首先根据形态观察, 判断 3 种来源的精子在形态上的结构性差异。之后, 为进一步判断量度和相对比例差异, 按照精子由睾丸排出到体外并被雌性接收的顺序, 两两比较从睾丸

到精子囊、精子囊到雌性体内前后精子各部分的绝对长度和相对比例有无显著性差异; 而睾丸来源和精子囊来源的 2 种样品中, 每份样品都可确定为仅产自 1 尾雄性个体, 故比较这 2 种样品各部分的绝对量度差异, 用于判断大凉蠊精子各部分的变化情况。睾丸来源和精子囊来源的精子属于小样本的情况 ($n=20$), 利用 Shapiro-Wilk test 检验 2 组数据的正态性; 雌性泄殖腔来源的精子样品中共有 60 条精子被分析, 使用 Kolmogorov-Smirnov test 检验数据的正态性。根据正态性检验结果, 分别选用参数或非参数检验的方法进行差异显著性检验。对于利用参数检验比较的数据组, 根据 Levene's test 检验数据的方差齐性, 并根据结果选用 t -test、 t' -test 或 Mann-Whitney U test。所有检验为双尾, 显著性水平 (α) 选择 0.05, 数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 的形式表示。

2 结果

2.1 不同取样方法下精子的结构变化

3 种不同取样方法的精子形态对比见图 1。大凉蠊精子主要分为头部和尾部, 头部具有顶体, 尾部末端是游离的轴丝, 睾丸来源的精子无明显颈部, 取而代之的是胞质小团 (cytoplasmic) 结构 (郑中华等 2000) (图 1a); 收集精子囊和冲洗雌性泄殖腔取样的精子形态相同, 均观察到明显的颈部 (图 1b, c)。

2.2 精子从睾丸到排出雄性体外的变化及个体间变异

睾丸和精子囊来源的精子样品各部分测量结果如图 1a 和 b 所示; 各部分量度的差异分析结果见表 1。睾丸来源的精子没有明显颈部, 其在进一步成熟过程中分化为头部和颈部, 因此与精子囊来源精子的头部和颈部长度合并数据进行比较。二者精子各部相对长度均存在显著差异, 而绝对长度中, 除头长 (HL) 外均存在显著性差异, 考虑到个体间精子大小的变异情况, 且两组数据来源于不同个体, 在下文讨论各部分的变异时结合每部分的相对

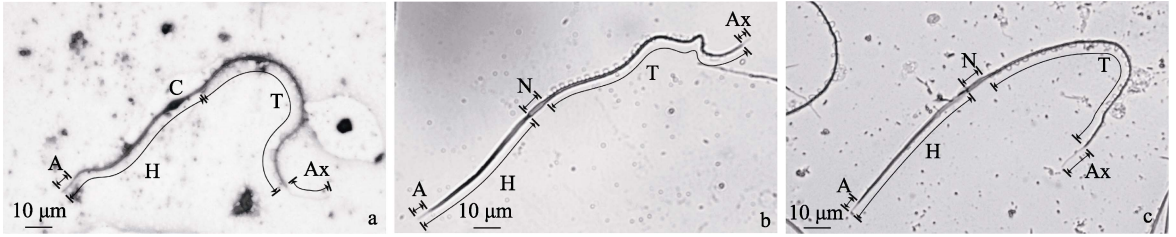


图 1 不同取样方式下大凉蟾精子形态 (× 400)

Fig. 1 Sperm morphology of *Liangshantriton taliangensis* from different sampling methods

a. 睾丸; b. 精子囊; c. 雌性泄殖腔。A. 顶体; Ax. 轴丝; C. 胞质小团; H. 头部; N. 颈部; T. 尾部

a. From testis; b. From spermatophores; c. From female cloaca. A. Acrosome; Ax. Axoneme; C. Cytoplasmic; H. Head; N. Neck; T. Tail

表 1 不同取样方式的大凉蟾精子涂片中精子量度的比较

Table 1 Comparison of the spermatozoa of *Liangshantriton taliangensis* under different sampling methods

精子量度 Spermatozoa	睾丸 Testis (n = 20)	精子囊 Spermatophore (n = 20)	检验类型 Statistic test	t, t', Z	P
顶体长 Acrosome length, AL (μm)	8.53 ± 0.89	7.83 ± 0.76	Mann-Whitney U	Z = - 2.95	0.003
相对顶体长 Relative acrosome length, RAL	0.040 ± 0.005	0.035 ± 0.004	t	t = - 4.03	< 0.001
头长 Head length, HL (μm)	92.77 ± 8.95	82.18 ± 1.91	Mann-Whitney U	Z = - 1.54	0.127
颈长 Neck length, NL (μm)	9.94 ± 0.44	9.94 ± 0.44			
相对头长 Relative head length, RHL	0.436 ± 0.036	0.413 ± 0.011	Mann-Whitney U	Z = - 2.76	0.006
尾长 Tail length, TL (μm)	119.85 ± 8.14	131.06 ± 5.03	t	t = 5.24	< 0.001
相对尾长 Relative tail length, RTL	0.564 ± 0.036	0.587 ± 0.011	Mann-Whitney U	Z = - 2.76	0.006
全长 Total sperm length, TSL (μm)	212.62 ± 7.46	223.18 ± 5.26	t	t = 5.17	< 0.001
头宽 Head width, HW (μm)	3.75 ± 0.89	2.94 ± 0.28	t'	t' = - 3.84	0.001

相对长度为精子该部分长度占精子全长的比例。

The relative length means the proportion of each part length relative to total sperm length.

长度进行讨论。

与睾丸中的精子相比, 精子囊中精子顶体的绝对长度 (AL) 和相对长度 (RAL) 均显著减小, 说明精子转运导管系统和泄殖腔腺体对精子顶体存在一定的修饰并缩短了其长度。

精子全长 (TSL) 是精子头长 (HL, 此处包括颈长) 和精子尾长 (TL) 的和 (图 1), 一部分的相对增加即代表另一部分的相对缩短。非参数检验的结果显示相对头长 (RHL) 和相对尾长 (RTL) 均展现出显著变化, 表明精子进入转运导管系统和泄殖腔腺体的过程对精子长度的修饰作用主要表现为加长了尾部而收缩了头部 (表 1)。

精子头部的绝对长度 (HL) 在不同来源的样品中没有表现出显著变化; 而尾部的绝对长度 (TL) 则表现出显著的变化。绝对长度比较的结果体现了不同个体间精子头部长度变异较小, 而尾部长度变异较大。

2.3 精子从排出雌性体外到进入雌性泄殖腔后的变化

比较精子囊取样和冲洗雌性泄殖腔取样的精子样品, 精子各部分相对长度和差异分析结果见表 2。这 2 种样品之间, 仅雌性泄殖腔来源的精子相对顶体长度 (RAL) 显著短于精子囊来源的精子, 精子头部 (RHL)、颈部 (RNL) 和尾部 (RTL) 相对长度均不存在显著性差异。

表 2 精子囊中和雌性泄殖腔中大凉螈精子量度比较

Table 2 Comparison of the spermatozoa of *Liangshantriton taliangensis* in spermatophore and female cloaca

精子量度 Spermatozoa	精子囊 Spermatophore (n = 60)	雌性泄殖腔 Female cloaca (n = 60)	检验类型 Statistic test	t, Z	P
相对顶体长 Relative acrosome length, RAL	0.035 ± 0.003	0.030 ± 0.004	t	t = 7.98	< 0.001
相对头长 Relative head length, RHL	0.377 ± 0.013	0.379 ± 0.012	t	t = - 0.52	0.602
相对颈长 Relative neck length, RNL	0.045 ± 0.003	0.045 ± 0.004	t	t = 0.53	0.595
相对尾长 Relative tail length, RTL	0.578 ± 0.013	0.577 ± 0.013	Mann-Whitney U	Z = - 0.08	0.933

相对长度为精子该部分长度占精子全长的比例。

The relative length means the proportion of each parts length relative to total sperm length.

3 讨论

3.1 精子从睾丸排出到雌性精子储存过程中的形态结构变化

早期研究发现，大凉螈睾丸来源的精子无明显颈部，取而代之的是具有胞质小团结构(郑中华等 2000)；本研究发现收集精子囊和冲洗雌性泄殖腔取样的精子形态相同，均观察到明显的颈部。这与在同科其他物种中通过挤压雄性腹部收集、从雌性泄殖腔中收集或从精子囊中收集得到的精子所展现的形态类似(Kuramoto 1995, Kuramoto et al. 1997, 郑中华等 2000, 2004)。该结果说明了体内繁殖的有尾类精子由睾丸到排出体外过程中存在进一步成熟的过程，发育出了可明显区分的颈部，而精子在进入雌性体内后则无明显的结构变化。

关于睾丸来源的精子所拥有的胞质小团结构，Selmi 等(1997)在蝾螈科 4 个物种的睾丸和输精管的精子采样中，也发现了该结构。王宏元等(2007)解剖西藏山溪鲵(*Batrachuperus tibetanus*)睾丸进行精子形态研究中同样观察到了此结构，但不同于原先胞质小团为精子活动提供能量的设想(郑中华等 2005)，该研究未发现胞质小团含有线粒体，推测该结构在精子进一步成熟的过程中消失，不能代表成熟精子的结构(王宏元等 2007)。本研究在来自大凉螈精子囊和雌性泄殖腔的进一步成熟的精子中未发现胞质小团结构的结果也进一步验证了该推测。

有尾类精子的颈部通常被认为与精子在雌性泄殖腔中的储存有关(McGregor 1899, Barker et al. 1970, van der Horst et al. 1995, 郑中华等 2004)；体外受精的小鲵科物种没有或仅有较短的颈部(王宏元等 2007, Bulakhova et al. 2013)。在体内受精的蝾螈科物种中，精子颈部应普遍存在，且具有高度的同源性。本文推测 Selmi 等(1997)在部分蝾螈科物种未发现该结构，应为采用睾丸和输精管取样方式所导致。本研究结果揭示了在有尾两栖类中(尤其是体内受精的两栖类类群)直接利用睾丸精子取样进行精子生物学的局限性。

3.2 精子从睾丸、排出雄性体外到雌性精子储存过程中的形态量度变化

本研究发现大凉螈睾丸中的精子在排出体外到雌性精子储存的过程中经过进一步的成熟和修饰，缩短了顶体长度，丢失了胞质小团，降低头宽并发育出颈部，收缩头长而增加了尾长，最终参与受精过程。

精子尾部贡献了大凉螈精子 50% 以上的长度(表 1)，而精子长度是影响精子质量的重要指标(Pizzari et al. 2009)；同时，精子尾部具有丰富的线粒体，通常也被认为能为精子带来更快的运动速度，进而提高精子质量，因而受到精子竞争的选择作用(Byrne et al. 2003)。程明阳等(2021)讨论了大凉螈不同雄性个体的精子质量，其结果发现雄性增加对精子的投资偏向于产生尾部更长的高质量精子。本研究进一步验证了其精子的成熟过程中增长尾部，且

精子尾部在不同个体间可能受到精子竞争的选择作用表现出长度的差异。这体现了精子在进入雌性泄殖腔后（可能还有参与精子竞争时）尾部的重要性，应在精子竞争研究中被重点关注。

在两栖动物中，顶体钩仅在有尾类类群中出现，但该结构在有尾类中的功能意义尚不清楚，推测可能具有锚定位置的功能（Sperone et al. 2009）；而在对小林姬鼠（*Apodemus sylvaticus*）的研究中发现，数百个精子会通过顶体钩，在射精后进行二次聚集形成精子链，并且游动速度超过单个精子（Moore et al. 2002）。本研究推测顶体钩在大凉螈中拥有类似的功能，并且在精子排出后通过减短顶体长度，可使精子在二次聚集时拥有更高的密度从而在精子竞争中获得优势。大凉螈精子在排出体外前和进入雌性泄殖腔储存后，不断地缩短顶体，这与精子从睾丸排出体外形成精子囊时的变化一致，该结果支持了精子缩短顶体以备精子竞争的推测。

3.3 有尾类精子保存和精子生物学研究中取样方法

两栖动物受威胁程度和灭绝风险日益增高（Alroy 2015, Catenazzi 2015, Tietje et al. 2018）。在该类群的保护中，建设精子银行并利用低温保存精子的辅助人工繁殖技术在近年来受到了广泛关注（Pollock et al. 2018, Rivera-Pacheco et al. 2021）。对于无尾类动物来说，由于其缺少泄殖腺体（Norris 1987），因此不存在对精子的打包和储存等修饰作用，研究发现其睾丸来源的精子与自然排精的精子在超微结构和运动性上均不存在显著差异（Poirier et al. 1971, Sliwa 1983），从睾丸中收集得到的精子已拥有成熟的功能，且可直接被保存和应用用于人工繁殖（Byrne et al. 2000, Dziminski et al. 2008）。与之相反，本研究结果揭示了在以大凉螈为例的体内受精有尾类中，从睾丸中收集的精子尚未完全成熟，将其利用到人工受精实验中将不可避免地影响结果。因此，在对该类群物种的精子进行保存和利用时，

应考虑收集雄性排出体外的、发育成熟的精子囊进行利用。

值得注意的是，Sperone 等（2009）观察了意大利滑螈（*Lissotriton italicus*）储存在输精管中的精子形态，发现储存在 Wolffian 管中的精子具有顶体钩、轴丝和波动膜等可区分的结构，但精子处于不动或不活跃的状态；对高山欧螈（*Triturus alpestris*）的研究也显示，精子在进入雌性体内后的转运需要雌性的诱导（Osikowski 2007）。这些结果暗示，在有尾类中精子可能需要在雌性泄殖腔内经过进一步活化才能表现出完整功能。未来对有尾类的体外人工受精技术进行研究时，应确认收集雄性排出体外的精子囊中成熟的精子是否能达到使卵受精的目的，在现阶段来看雌性活体的参与是必要的。

体内受精的有尾类类群复杂的交配系统迫切需要更加深入的研究。本研究未检测精子在进入雌性体内前后的运动性差异，在未来的研究中应对精子完整的发生、修饰、排出、直到进入雌性身体的全过程中精子形态和精子活力变化进行更加系统和全面的关联分析，以促进对体内受精有尾类精子发育成熟和受精过程的全面认知。

致谢 感谢四川栗子坪国家级自然保护区公益海保护站以及站上工作人员对野外工作的支持和配合。

参 考 文 献

- Alroy J. 2015. Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(42): 13003–13008.
- Apostólico L H, Marian J E A R. 2018. Dimorphic male squid show differential gonadal and ejaculate expenditure. *Hydrobiologia*, 808(1): 5–22.
- Barker K R, Baker C L. 1970. Urodele spermateleosis: A Comparative Electron Microscope Study // Baccetti B. *Comparative Spermatology*. New York: Academic Press, 81–84.
- Bulakhova N A, Berman D I. 2013. Reproductive system of the

- Schrenckii Salamander (*Salamandrella schrenckii*, Amphibia, Caudata, Hynobiidae) in spring and fall. *Biology Bulletin*, 40(8): 664–677.
- Byrne P G, Robert J D. 2000. Does multiple paternity improve fitness of the frog *Crinia georgiana*? *Evolution*, 54(3): 968–973.
- Byrne P G, Simmons L W, Roberts J D. 2003. Sperm competition and the evolution of gamete morphology in frogs. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1528): 2079–2086.
- Catenazzi A. 2015. State of the world's amphibians. *Annual Review of Environment and Resources*, 40(1): 91–119.
- Dziminski M A, Roberts J D, Simmons L W. 2008. Fitness consequences of parental compatibility in the frog *Crinia georgiana*. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(4): 879–886.
- Evans J P, Sherman C D H. 2013. Sexual selection and the evolution of egg-sperm interactions in broadcast-spawning invertebrates. *The Biological Bulletin*, 224(3): 166–183.
- Hirohashi N, Tamura-Nakano M, Nakaya F, et al. 2016. Sneaker male squid produce long-lived spermatozoa by modulating their energy metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 291(37): 19324–19334.
- Iwata Y, Shaw P, Fujiwara E, et al. 2011. Why small males have big sperm: Dimorphic squid sperm linked to alternative mating behaviours. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1): 1–9.
- Kühnel S, Reinhard S, Kupfer A. 2010. Evolutionary reproductive morphology of amphibians: An overview. *Bonn Zoological Bulletin*, 57(2): 119–126.
- Kuramoto M, Tanaka S. 1997. Sperm morphology of *Echinotriton andersoni* (Caudata: Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, 18(3): 308–313.
- Kuramoto M. 1995. Scanning electron microscopic studies on the spermatozoa of some Japanese salamanders (Hynobiidae, Cryptobranchidae, Salamandridae). *Japanese Journal of Herpetology*, 16(2): 49–58.
- Lüpold S, Pitnick S, Berben K S, et al. 2013. Female mediation of competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(26): 10693–10698.
- McGregor J H. 1899. The spermatogenesis of *Amphiuma*. *Journal of Morphology*, 15(Suppl.): 55–105.
- Moore H, Dvorakova K, Jenkins N, et al. 2002. Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature*, 418(6894): 174–177.
- Norris D O. 1987. *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles*. New York: Plenum Press, 327–354.
- Osikowski A. 2007. Sperm transport after insemination in the Alpine Newt (*Triturus alpestris*, Caudata, Salamandridae). *Folia Biologica*, 55(3/4): 109–114.
- Pitnick S, Hosken D J, Birkhead T R. 2009. *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. London: Academic Press, 69–149, 207–245.
- Pizzari T, Parker G A. 2009. Sperm competition and sperm phenotype // Birkhead TR, Hosken D, Pitnick S. *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. London: Academic Press, 207–245.
- Poirier G R, Spink G C. 1971. The ultrastructure of testicular spermatozoa in two species of *Rana*. *Journal of Ultrastructure Research*, 36(3): 455–465.
- Pollock K, Gosálvez J, López-Fernández C, et al. 2018. Amphibian sperm chromatin structure and function and its relevance to sperm preservation. *Journal of Herpetology*, 52(4):487–492.
- Rivera-Pacheco J, Herrera-Barragán J, León-Galván M, et al. 2021. Criopreservación espermática de *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798). *Abanico Veterinario*, 11(1): 2020–80.
- Selmi M G, Brizzi R, Bigliardi E. 1997. Sperm morphology of salamandrids (Amphibia, Urodela): implications for phylogeny and fertilization biology. *Tissue and Cell*, 29(6): 651–664.
- Sever D M. 1991. Comparative anatomy and phylogeny of the cloacae of salamanders (Amphibia: Caudata). I. Evolution at the family level. *Herpetologica*, 47(2): 165–193.
- Sever D M. 1994. Observations on regionalization of secretory activity in the spermathecae of salamanders and comments on phylogeny of sperm storage in female amphibians. *Herpetologica*, 50(4): 383–397.
- Sever D M. 2013. Cloacae, cloacal glands and female sperm storage in giant salamanders. *Advances in Zoology Research*, 5(1): 1–40.
- Sever D M, Houck L D. 1985. Spermatophore formation in *Desmognathus ochrophaeus* (Amphibia: Plethodontidae). *Copeia*, 1985(2): 394–402.
- Sever D M, Verrell P A, Halliday T R, et al. 1990. The cloaca and

- cloacal glands of the male Smooth Newt, *Triturus vulgaris* (Linnaeus), with especial emphasis on the dorsal gland. *Herpetologica*, 46(2): 160–168.
- Sliwa L. 1983. Effect of chlorpromazine on sperm motility in the frog, *Rana temporaria*. *Folia Biologica*, 31(3): 259–263.
- Sperone E, Bonacci A, Brunelli E, et al. 2009. Male reproductive system in the Italian Newt *Lissotriton italicus* (Peracca 1898) (Amphibia, Urodela): Ultrastructural and morphological study with description of spermiogenesis, spermatozoon and spermatophore. *Zoomorphology*, 128(2): 183–195.
- Tietje M, Rödel M O. 2018. Evaluating the predicted extinction risk of living amphibian species with the fossil record. *Ecology Letters*, 21(8): 1135–1142.
- van der Horst G, Wilson B, Channing A. 1995. Amphibian sperm: Phylogeny and fertilization environment // Jamieson B G M. *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. Paris: Editions du Muséum National d'Histoire Naturelle, 333–342.
- Wells K D. 2010. The ecology and behavior of amphibians. *Austral Ecology*, 34(1): 116–116.
- Williams A A, Brandon R A, Martan J. 1984. Male genital ducts in the salamanders *Eurycea lucifuga* and *Eurycea longicauda*. *Herpetologica*, 40(3): 322–330.
- 程明阳, 束潇潇, 张勤, 等. 2021. 小个体大凉蟾增加精子质量投入获得交配后竞争优势. *应用与环境生物学报*, 27(4): 831–836.
- 王宏元, 张育辉. 2007. 北方山溪鲵精子发生不同阶段的显微与超微结构. *动物学杂志*, 42(5): 136–140.
- 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.
- 郑中华, 谢锋, 费梁, 等. 2000. 镇海棘螈和大凉疣螈精子形态研究 // 中国动物学会两栖爬行动物学分会, 遵义医学院, 中国科学院成都生物研究所, 等. *两栖爬行动物学研究* (第 8 辑)——亚洲两栖爬行动物学第四届国际学术会议专辑. 贵阳: 贵州科技出版社, 244–248.
- 郑中华, 谢锋, 江建平, 等. 2004. 镇海棘螈的精子结构. *动物学报*, 50(4): 622–629.

(上接第 553 页)



图 1 吉林发现的八哥 (左: 陈德锋摄于吉林农业大学, 右: 摄于吴家村)

Fig. 1 Crested Myna (left: photo by CHEN De-Feng at Jilin Agricultural University; right: photo by YAO Ji-Yuan at Wujia Village)

检索中国观鸟记录中心网站中吉林邻省的八哥观测记录数据发现, 辽宁省自 2015 年 5 月 11 日至 2019 年 8 月 25 日有 19 条观测记录, 分别在大连、锦州、盘锦; 黑龙江省自 2015 年 2 月 11 日至 2016 年 2 月 9 日有 6 条观测记录, 均在双鸭山市; 吉林省未检索到有八哥观测记录数据。本次在吉林长春和吉林市发现八哥均没有观测到其繁殖巢, 因此其在吉林省的居留型还有待进一步观察。

姚纪元^① 姜云垒^{①*} 尚伟平^① 陈德锋^②

① 吉林农业大学动物科学技术学院 长春 130118; ② 吉林农业大学宣传部 长春 130118