

# 中华大蟾蜍蝌蚪变态过程中脊椎骨化次序

桑洲娴 王宏元 王秋梦 梁刚\*

陕西师范大学生命科学院 西安 710062

**摘要:** 两栖动物在幼体变态即由水栖到陆栖的环境转变中, 骨骼系统会发生重塑。本文采用茜素红和阿利新蓝的双染色技术对不同发育阶段中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*) 蝌蚪变态过程中(Gosner 38 ~ 46) 脊椎骨的发育进程进行了形态学研究。结果显示, 在中华大蟾蜍蝌蚪 Gosner 39 期, 椎板中线处发生融合; 荐前椎 II - VIII 和荐椎的椎体、椎弓起始骨化发生在 Gosner 42 期; 其次荐前椎 II - VIII 和荐椎的横突、底索和荐后椎 I 开始骨化; 荐后椎 II 骨化最晚; 在 Gosner 46 期, 尾杆骨最终形成。荐后椎愈合形成尾杆骨反映无尾类幼体由水栖环境转变为陆生环境中骨骼系统的机能适应。

**关键词:** 中华大蟾蜍; 蝌蚪; 脊椎; 骨化

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2014)01-87-07

## Ossification Sequence of the Vertebrae during Metamorphosis of *Bufo gargarizans* Tadpoles

SANG Zhou-Xian WANG Hong-Yuan WANG Qiu-Meng LIANG Gang\*

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** Skeletal system remodeling of tadpoles, which occurs during amphibian metamorphosis, adapts them to the change from aquatic habitat to land habitat. In this study, the vertebrae skeletons of *Bufo gargarizans* tadpole at different stages (Gosner 38 - 46) were investigated using double staining with alcian blue and alizarin red. The results showed that the neural arch laminae fused at the midline at gosner stage 39. The centra and neural arch of presacrals I - VIII and sacral started to ossify at gosner stage 42, then the transverse processes of presacrals I - VIII, sacrum, hypochord, postsacral I and postsacral II began to ossify; finally the urostyle formed at gosner stage 46. The formation of the urostyle by the fusion of the postsacral vertebrae reflects the functional adaptation of anuran larval skeletal system for transformation from aquatic to terrestrial environment.

**Key words:** *Bufo gargarizans*; Tadpole; Vertebrae; Ossification

变态是无尾两栖动物生活史的一个重要环节。水中栖息生活的蝌蚪经变态后, 成为适应陆生环境的成体。在变态过程中, 蝌蚪会进行组织和器官的重构, 其中包括骨骼系统的重构、四肢的生长和尾部的退化。在无尾目发育的早期, 存在脊索。脊索作为纤维结缔组织棒, 位于消化系统背侧并紧临近脊髓腹侧的中轴。在两栖动物幼体变态过程中, 脊索逐渐被脊椎所替代。脊椎是一个位于躯干背侧、分节、半柔韧

的、弓形棒, 由一系列椎骨形成。脊椎为四肢骨架提供悬器, 并保护脊神经索。在经典的两栖动物形态学分类中, 成体椎骨的形态特征被广

基金项目 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(No. SJ08C101), 陕西师范大学勤助科研创新基金项目(No. QZZD12073);

\* 通讯作者, E-mail: lianggang@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 桑洲娴, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水生动物发育细胞学; E-mail: sangzx1012@163.com。

收稿日期: 2013-05-30, 修回日期: 2013-08-20

泛应用于系统进化研究。例如, Nicholls (1916) 提出无尾目脊椎椎体形态是研究系统进化分类的最基本依据。另外, 荐骨和尾杆骨之间的融合可作为无尾目的判断特征 (Báez et al. 2003, Frost et al. 2006)。另一方面, 国外学者已研究过许多两栖类幼体的骨骼系统骨化过程, 如豹蛙 (*Rana pipiens*, Kemp et al. 1969)、苏里南角蛙 (*Ceratophrys cornuta*, Wild 1997)、东方铃蟾 (*Bombina orientalis*, Maglia et al. 1998)、非洲牛箱头蛙 (*Pyxicephalus adspersus*, Haas 1999)、北蝗蛙 (*Acris crepitans*, Pugener et al. 2009), 而中国广布种中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 蝌蚪骨骼系统的骨化还未见文献报道。无尾两栖类变态过程中骨骼的骨化, 目的是为了增强骨密度来支撑由水生到陆栖的身体重量。本研究拟以中华大蟾蜍蝌蚪 Gosner 不同发育分期的脊椎骨骼进行双染色, 来探究其椎骨各部分骨化程度和骨化顺序, 旨在推演无尾两栖类由水生到陆栖变态过程中脊椎的生态适应和系统进化历程。

## 1 材料与方法

中华大蟾蜍蝌蚪采自秦岭北坡西安市长安区大峪水库周围的小水潭 (N 34°01'00", E109°06'52", 海拔 700 ~ 730 m)。样本采用 Gosner 对无尾目蝌蚪发育分期方法 (Gosner 1960) 进行发育时期划分。取中华大蟾蜍各时期 (G38 ~ G46) 蝌蚪各 6 尾样本进行骨骼染色。蝌蚪骨骼染色采用改良后 Taylor 等 (1985) 的方法进行骨骼双染色——茜素红 (Alizarin red) 和阿利新蓝 (Alcian blue) 染色, 再经甘油透明, 硬骨呈紫红色, 软骨呈蓝色。用 Zeiss Discovery V12 型体式显微镜观察, 佳能 7D 数码相机进行图像采集。本实验中脊椎骨骼名称均采用 Pugener 等 (2009) 的骨骼术语进行描述。

## 2 结果

中华大蟾蜍蝌蚪脊柱由 8 个荐前椎 (presacral)、1 个荐椎 (sacral) 与荐后椎 (postsacral) 三部分组成。荐前椎椎骨由背侧的椎弓 (neural arch) 和腹侧的椎体 (centrum)

两个部分组成。椎弓由 1 对椎弓根 (pedicel) 和 1 对椎板 (neural arch laminae) 构成 (图 1)。其中, 椎弓根短窄, 其上无骨突, 与腹侧的椎体直接相连接。前后两个相邻的椎弓根围成椎间孔 (intervertebral foramen), 椎管 (spinal canal) 内的脊神经经由椎间孔伸出。椎板则位于椎弓根的背侧, 其上有 3 个骨突, 包括 2 个前后关节突 (zygapophyses) 和 1 个横突 (transverse processes) (图 1)。横突位于椎板与椎弓根的交汇和分界处 (图 1)。两个左右椎板的中线末端处融合, 被覆脊髓背侧, 封闭椎管 (图版 I)。

荐前椎 I, 即寰椎 (atlas), 横突和前关节突缺失, 前部关节面与枕骨髁相接。荐前椎 II 和 III 的横突指向前外侧, 荐前椎 IV 和 V 的横突指向后外侧。荐前椎 III 的横突最长, 其次为荐前椎 II、荐前椎 IV, 荐前椎 VI ~ VIII 的横突极短, 呈结节状。荐椎为一块单独的椎骨, 其外部形态与荐前椎相似。荐椎横突短宽, 基部近端略窄于远端。荐后椎是由 2 对背部椎弓和腹侧的底索 (hypochord) 组成, 蝌蚪变态完成后荐后椎形成尾杆骨 (urostyle) (图版 I)。

Gosner 38 期中华大蟾蜍蝌蚪脊柱背面可见, 荐前椎 II ~ V 的横突较长, 荐椎横突略短但较宽。荐前椎 I ~ III 的椎板在背侧中线处未发生融合; 荐前椎 IV ~ VIII 和荐椎的椎板已融合 (图版 I:1a)。腹面观可见, 荐前椎 I ~ VIII 和荐椎椎体均为软骨, 未发生骨化 (图版 I:1b)。从脊柱侧面观中可见, 底索已经出现, 其为长杆状软骨, 位于脊索的腹侧, 且平行于脊索。荐后椎 I 出现在脊索的背侧。由腹侧至背侧依次可见底索、脊索和荐后椎 I。荐后椎 I 无横突和前后关节突, 其椎板在背侧中线处未发生融合。此时, 荐后椎 II 还未出现 (图版 I:1c)。

与 Gosner 38 期比较可见, Gosner 39 期的中华大蟾蜍蝌蚪的荐前椎 I ~ III 的椎板在背侧中线处融合。此时, 荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎板均已完全融合 (图版 I:2a)。另外, 荐前椎 III 的横突末端指向由 Gosner 38 期的前外侧转变为后方, 横突末端呈钩状弯曲 (图版 I:2a, b)。此时荐后椎 II 的椎板成对出现, 侧面观呈“V”

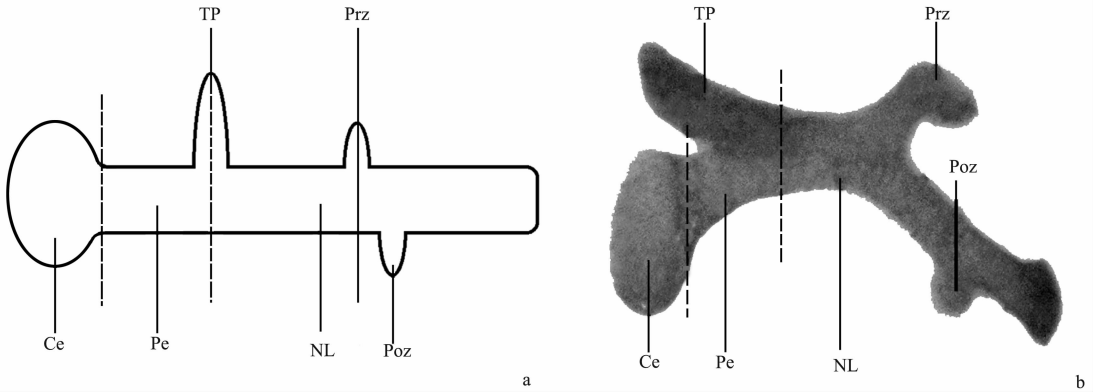


图 1 中华大蟾蜍蝌蚪脊椎椎骨形态

Fig. 1 Morphology of larval vertebrae of *Bufo gargarizans*

a. 脊椎椎骨模式图; b. 单侧脊椎椎骨拆分图。

a. A schematic drawing illustrating the pattern of vertebrae; b. Single lateral vertebrae after dissected.

Ce. 椎体; NL. 椎板; Pe. 椎弓根; Prz. 前关节突; Poz. 后关节突; TP. 横突。

Ce. Centrum; NL. Neural arch laminae; Pe. Pedicel; Prz. Prezygapophyses; Poz. Postzygapophyses; TP. Transverse processes.

字型,其位于荐后椎 I 的后部(图版 I:2c)。在 Gosner 40 期的蝌蚪中,荐后椎 II 的椎弓根形成,其向前延伸,与荐后椎 I 椎弓根基部的后端融合。在 Gosner 41 期,荐后椎 I 的椎板上出现一对后突,其向后延伸,与荐后椎 II 的椎板靠近。荐后椎 II 的椎弓根基部向后延伸,成短尾状,此时荐后椎 II 的侧面观由“V”字型变成“Y”字型。至此荐后椎 I、II 左右两侧椎骨已明显彼此靠近,同时,腹侧的底索与背侧的荐后椎也逐渐靠近。

在 Gosner 42 期的中华大蟾蜍蝌蚪中,荐前椎 I ~ VIII 和荐椎开始骨化(表 1)。从该期蝌蚪脊椎的背面观可见,骨化最先起始于荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎板与横突连接处。然后,骨化中心由椎板的两侧向背部中央延伸(图版 I:3a)。从腹面观可见,荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎弓根骨化也起始于其与横突连接处,骨化由两侧向腹侧中央处延伸,此时椎体与椎弓根连接处的两侧缘也有骨化迹象(图版 I:3b)。荐后椎 I 的后突与荐后椎 II 背侧的椎板融合(图版 I:3a,c)。从侧面观可见,荐后椎 I ~ II 完全融合,形成了 1 对近似三角形的尾椎骨(coccyx),此时的尾椎骨尚为软骨(图版 I:3c)。在 Gosner 43 期的蝌蚪中,荐前椎 I ~ VIII

和荐椎的椎弓骨化继续向背腹侧中线处延伸,前后关节突的骨化继续向末端延伸(图版 I:4a)。此时,荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎体已完全骨化(图版 I:4b)。另外,荐前椎 II ~ VIII 和荐椎的横突骨化起始,荐前椎 II 横突近端与中段骨化,长度约占整体长度的 50%,远端处未见骨化;而荐前椎 III ~ VIII 和荐椎的横突只是近端骨化,中段和远端处未骨化(图版 I:4a,b)。底索前端的腹面也出现了骨化;但尾椎骨的骨化速度较慢,除前端两侧平行的骨体,其他部分仍为软骨(图版 I:4c)。在 Gosner 44 期,脊椎骨化程度进一步加深。荐前椎 II ~ IV 横突骨化部分已超过其整体的 60%(图版 I:5a ~ 5c)。在 Gosner 46 期,脊椎已完全骨化(图版 I:6a,b)。尾椎骨与腹侧的底索融合并完全骨化,形成尾杆骨。尾杆骨背部前端形成一个高耸的脊,向后渐低而消失;在纵向脊的基部,脊神经孔穿透了尾杆骨的侧面;尾杆骨的长度超过荐前椎部分的 60%(图版 I:6c)。

### 3 讨论

非洲牛箱头蛙蝌蚪的荐前椎 I ~ VIII 和荐椎椎弓在 Gosner 33 期开始骨化(Haas 1999)。北蝗蛙蝌蚪在 Gosner 34 期荐前椎 I 的椎体首先

表 1 中华大蟾蜍蝌蚪脊椎的发育与骨化

Table 1 Development and ossification of larval vertebrae of *Bufo gargarizans*

	Gosner 分期 Gosner stage							
	38	39	40	41	42	43	44	46
椎弓 Neural arch	IV-VIII 和 S: NL 融合	I-III: NL 融合			骨化起始			骨化 100%
椎体 Centrum					骨化起始	骨化 100%		
横突 Transverse processes						II 骨化约 50% III-VIII 和 S: 基部骨化	II-IV 骨化约 60% V-VIII 和 S: 基部骨化	骨化 100%
底索 Hypochord	成杆状				骨化起始			
荐后椎 I Postsacral I	成对出现		与 PS II 腹侧融合		形成尾 椎骨	骨化起始		骨化 100% 形成尾杆骨
荐后椎 II Postsacral II		成对出现	与 PS I 腹侧融合					

I-VIII: 荐前椎 I-VIII; NL: 椎板; PS I: 荐后椎 I; PS II: 荐后椎 II; S: 荐椎。

I-VIII: Presacral I-VIII; NL: Neural arch laminae; PS I: Postsacral I; PS II: Postsacral II; S: Sacrum.

骨化,随后荐前椎 II ~ IV 的椎体和椎弓骨化 (Pugener et al. 2009)。本文结果可见,中华大蟾蜍蝌蚪的荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎体、椎弓起始骨化发生在 Gosner 42 期。综上所述,以 Gosner 分期为时间标准,中华大蟾蜍蝌蚪脊椎骨化起始明显晚于非洲牛箱头蛙和北蝗蛙。在脊椎起始骨化的发育时期上,各个物种之间差异明显。但是,无尾类脊椎起始骨化的部位基本一致,都是发生在荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎体或椎弓上。

非洲牛箱头蛙椎板于 Gosner 38 期在背侧中线处融合 (Haas 1999)。北蝗蛙荐前椎 IV ~ VIII 和荐椎椎板在 Gosner 37 期融合;到 Gosner 38 期,除荐后椎外,所有椎骨的椎板都在中线处融合 (Pugener et al. 2009)。豹蛙椎板中线处的融合也呈尾-头顺序 (Kemp et al. 1969)。本文结果显示,中华大蟾蜍荐前椎 IV ~ VIII 和荐椎的椎板在 Gosner 38 期融合,而荐前椎 I ~ III 椎板融合是在 Gosner 39 期。综上所述,无尾两栖类背部成对椎弓中线融合可能均呈尾-头顺序模式,会增强脊椎的支撑能力。此外,椎弓的融合发生在临近变态期,可能为蝌蚪登陆做前期准备。

非洲牛箱头蛙蝌蚪的骨化顺序为荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎弓首先骨化,荐前椎 I ~ VIII 椎

体其次骨化,随之荐椎椎体和荐后椎 I 骨化,底索和荐后椎 II 最晚骨化 (Haas 1999)。豹蛙的椎弓和椎体同时开始骨化 (Kemp et al. 1969)。北蝗蛙蝌蚪的骨化顺序为荐前椎 I ~ IV 的椎体最先骨化,其次荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎弓、荐前椎 II ~ IV 横突、荐前椎 V ~ VIII 和荐椎的椎体和荐后椎 I 骨化,最后底索、荐后椎 II 和 III、荐前椎 V ~ VIII 和荐椎横突骨化 (Pugener et al. 2009)。中华大蟾蜍蝌蚪的骨化首先发生在荐前椎 I ~ VIII 和荐椎的椎弓和椎体,其次发生在荐前椎 II ~ VIII 和荐椎的横突、底索和荐后椎 I 上,最后荐后椎 II 才骨化。综上所述,中华大蟾蜍与非洲牛箱头蛙、豹蛙的骨化顺序基本一致,即椎弓的骨化不晚于椎体,而底索和荐后椎最后骨化。而北蝗蛙的骨化顺序则与中华大蟾蜍有明显差异,椎体稍早于椎弓的骨化,并且在荐前椎的横突并未全部开始骨化之前,底索和荐后椎即发生骨化。古生代迷齿亚纲 (Labyrinthodonts) 的椎弓先于椎体软骨化和骨化 (Carroll et al. 1999),这与大多数无尾目中所观察到的情况类似。中华大蟾蜍和非洲牛箱头蛙椎弓和椎体骨化的顺序类似于古生代的迷齿亚纲;北蝗蛙椎弓和椎体骨化的顺序则与迷齿亚纲相悖。这表明现存的无尾两栖类动物脊椎

骨化呈多样性,无尾类起源于迷齿亚纲的依据并不充分。

蛙类蝌蚪中荐后椎的出现,是对其水生生活的一种适应(Handrigan et al. 2007)。有尾类具有荐后椎,但是它们荐后椎的数量差异很大(Wake 1966),从 20 个到 100 个左右不等(Duellman et al. 1994)。马达加斯加早三叠世的无尾目 *Triadobatrachus massinoti*,其作为无尾目姊妹群,具有 6 个荐后椎(Griffiths 1963, Estes et al. 1973, Rage et al. 1989)。角蟾属(*Megophrys*)的蝌蚪通常具有 11 ~ 15 个荐后椎(Handrigan et al. 2007)。北蝗蛙和非洲牛箱头蛙均有 3 对荐后椎(Haas 1999, Pugener et al. 2009)。本文结果显示,中华大蟾蜍蝌蚪只有 2 对荐后椎。综上可见,在无尾类蝌蚪中的荐后椎数目多样,经变态后,多数荐后椎消失或与底索融合形成尾杆骨(Ročková et al. 2005)。在蝌蚪变态中尾部荐后椎融合形成尾杆骨是无尾目演化中决定性的一步,这一步标志着无尾目的进化开始背离 *Triadobatrachus* 和其现存的姊妹群有尾目,同时标志着无尾类由水生到陆生栖息环境的转换。

北蝗蛙在 Gosner 46 期由 3 对荐后椎发育而来的尾椎骨与底索融合(Pugener et al. 2009)。非洲牛箱头蛙 3 对荐后椎融合而成的尾椎骨在 Gosner 45 期与底索融合形成尾杆骨(Sheil 1999)。中华大蟾蜍有 2 对荐后椎合并成尾椎骨后,在变态末期(Gosner 46 期)与底索融合形成尾杆骨。尾杆骨的主要作用是后肢提供支撑(Pugener et al. 2009)。在变态末期,无尾两栖类尾椎骨与底索愈合形成尾杆骨,目的是适应陆生生活方式。虽然无尾两栖类蝌蚪荐后椎的数目是多样的,但在变态过程中,荐后椎愈合形成尾杆骨体现了无尾类成体骨骼发育的保守性,以及由水栖到陆栖环境转换的骨骼系统形态重塑和生态适应特征。

## 参 考 文 献

Búez A M, Pugener L A. 2003. Ontogeny of a new Palaeogene pipid frog from southern South America and xenopodinomorph

evolution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 139 (3): 439 - 476.

Carroll R L, Kuntz A, Albright K. 1999. Vertebral development and amphibian evolution. *Evolution & Development*, 1(1): 36 - 48.

Duellman W E, Trueb L. 1994. *Biology of Amphibians*. 2nd ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.

Estes R, Reig O A. 1973. The early fossil record of frogs, a review of the evidence // Vial J L, editor. *Evolutionary Biology of the Anurans, Contemporary Research on Major Problems*. Columbia, Missouri: University of Missouri Press, 11 - 63.

Frost D R, Grant T, Faivovich J, et al. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297: 1 - 371.

Gosner K L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16 (3): 183 - 190.

Griffiths I. 1963. The phylogeny of the Salientia. *Biological Reviews*, 38(2): 241 - 292.

Haas A. 1999. Larval and metamorphic skeletal development in the fast-developing frog *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Zoomorphology*, 119(1): 23 - 35.

Handrigan G R, Haas A, Wassersug R J. 2007. Bony-tailed tadpoles: The supernumerary caudal vertebrae in larval megophryids (Anura). *Evolution & Development*, 9(2): 190 - 202.

Kemp N E, Hoyt J A. 1969. Sequence of ossification in the skeleton of growing and metamorphosing tadpoles of *Rana pipiens*. *Journal of Morphology*, 129(4): 415 - 443.

Maglia A M, Pugener A. 1998. Skeletal development and adult osteology of *Bombina orientalis* (Anura: Bombinatoridae). *Herpetologica*, 54(3): 344 - 363.

Nicholls G C. 1916. The structure of the vertebral column in anura phaneroglossa and its importance as a basis of classification. *Proceedings of the Linnean Society of London*, 128(1): 80 - 92.

Pugener L A, Maglia A M. 2009. Skeletal morphogenesis of the vertebral column of the miniature hyloid frog *Acris crepitans*, with comments on anomalies. *Journal of Morphology*, 270 (1): 52 - 69.

Rage J C, Roček Z. 1989. Redescription of *Triadobatrachus massinoti* (Piveteau, 1936), and anuran amphibian from the Early Triassic. *Palaeontographica*, 206(1/3): 1 - 16.

Ročková H, Roček Z. 2005. Development of the pelvis and posterior part of the vertebral column in the Anura. *Journal of Anatomy*, 206(1): 17 - 35.

- Sheil C. A. 1999. Osteology and skeletal development of *Pyxicephalus adspersus* (Anura: Ranidae: Raninae). *Journal of Morphology*, 240(1): 49 – 75.
- Taylor W R., van Dyke G C. 1985. Revised procedure for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*, 9(2): 107 – 111.
- Wake D B. 1966. Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, Family Plethodontidae. *Memoirs of the Southern California Academy of Sciences*, 4: 1 – 111.
- Wild E R. 1997. Description of the adult skeleton and developmental osteology of the hyperossified horned frog, *Ceratophrys cornuta* (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Morphology*, 232(2): 169 – 206.

## 图 版 说 明

中华大蟾蜍蝌蚪 Gosner 38 ~ 46 期脊椎骨骼双染图

1. 38 期; 2. 39 期; 3. 42 期; 4. 43 期; 5. 44 期; 6. 46 期。a. 背面观; b. 腹面观; c. 侧面观。

## Explanation of Plate

Double staining of larval vertebral skeleton of *Bufo gargarizans* at stage 38-46

1. Stage 38; 2. Stage 39; 3. Stage 42; 4. Stage 43; 5. Stage 44; 6. Stage 46. a. Dorsal view; b. Ventral view; c. Lateral view.

I ~ VIII. 荐前椎 I ~ VIII; H. 底索; PS. 荐后椎; S. 荐椎。

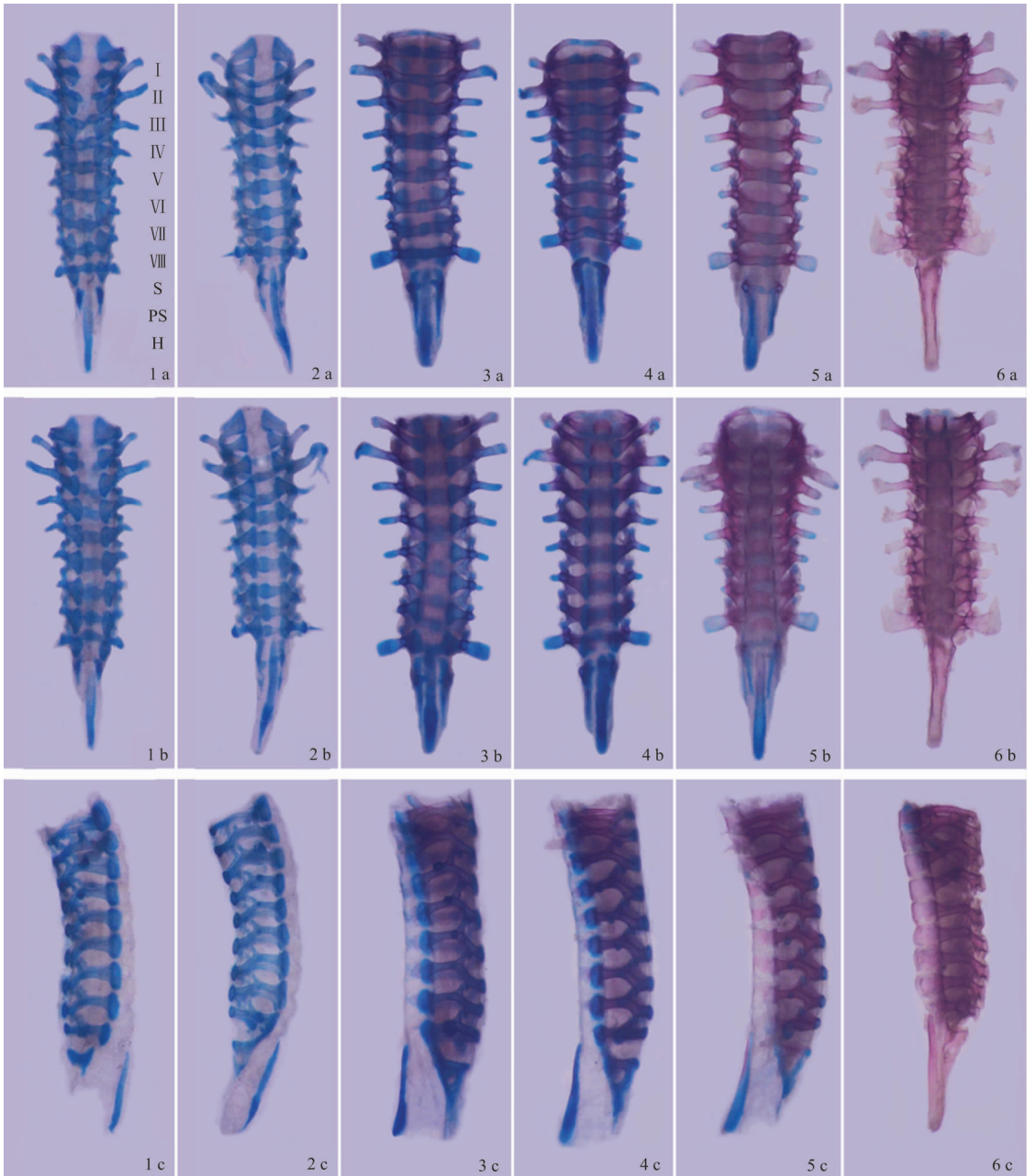
I - VIII. Presacral I - VIII; H. Hypochord; PS. Postsacral vertebrae; S. Sacrum.

桑洲娴等:中华大蟾蜍蝌蚪变态过程中脊椎骨化次序

图版 I

SANG Zhou-Xian *et al.*: Ossification Sequence of the Vertebrae during Metamorphosis in *Bufo gargarizans* Tadpoles

Plate I



图版说明见文后