



## 金乌贼纳精囊组织结构及其精子的储存和利用

王 展<sup>1</sup>, 王林龙<sup>1</sup>, 李文涛<sup>1</sup>, 张秀梅<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266072)

**摘要:** 为揭示金乌贼精子进入纳精囊及产卵过程中的精子利用方式, 丰富金乌贼繁殖生物学研究内容, 本研究利用实验生态学和组织切片技术, 检测了交配后不同时间段雌性口膜表面精子囊和纳精囊中精子数量的变化, 观察分析了雌性金乌贼纳精囊的组织结构。结果显示, 金乌贼纳精囊位于繁殖期雌性个体口膜腹面的突起处, 共1对。纳精囊开口于口膜内表面, 通过一根中央管连通整个纳精囊。中央管内壁含有大量褶皱和纤毛。在中央管两端, 有12~20个储精小囊与之相连。储精小囊四周具有发达的环肌, 其中储存有大量精子, 并且大部分精子头部均朝向腔室内壁。完成一次交配后, 雌性金乌贼对精子囊和纳精囊中精子的利用可以分为三个阶段, 主要利用精子囊中的精子(交配后1~2 d); 由利用精子囊中的精子向纳精囊中的精子过渡(交配后2~3 d); 主要利用纳精囊中的精子(交配后3 d以上)。研究表明, 从精子囊释放出的精子进入雌性口膜表面的褶皱中, 通过自身运动到达纳精囊。进入纳精囊的精子通过自身运动及中央管内壁纤毛的摆动进入储精小囊, 其中大部分精子头部朝向储精小囊内壁有规律地分布。在产卵过程中, 雌性优先利用精子囊中的精子, 而在精子囊中精子不足时, 纳精囊通过肌肉收缩以及纤毛摆动将其中的精子逐渐释放出来, 卵子在雌性口膜附近完成体外受精。

**关键词:** 金乌贼; 纳精囊; 精子储存; 精子利用; 转运机制

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

头足类在繁殖期通常具有明显的求偶、争斗、交配和产卵等行为, 在交配过程中, 雄性个体通过茎化腕将精荚转移给雌性<sup>[1]</sup>。此时, 精荚会发生放射反应形成精子囊并吸附在雌性个体的口膜表面<sup>[2-3]</sup>。随后, 雌性个体会将精子囊中的精子部分储存在纳精囊(一个精子储存器官)中, 但精子进入纳精囊及其在纳精囊中储存的方式尚不明确。为揭示交配后精子在纳精囊中的储存和在产卵过程中的利用方式, 了解精子囊中精子的释放过程, 解析雌性纳精囊组织结构十分必要。目前, 国外学者相继报道了福氏枪乌贼(*Loligo forbesi*)<sup>[4]</sup>、欧洲横纹乌贼(*Sepia officinalis*)<sup>[5]</sup>、澳大利亚巨乌贼(*S. apama*)<sup>[6]</sup>、玄妙

微鳍乌贼(*Idiosepius paradoxus*)<sup>[7]</sup>等十足目(Decapoda)头足类纳精囊的组织结构, 而国内学者仅对曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)进行过相关报道<sup>[8]</sup>。金乌贼(*S. esculenta*)属软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、乌贼目(Sepioidea)、乌贼科(Sepiidae)、乌贼属(*Sepia*), 俗称墨鱼、乌鱼等, 广泛分布于我国沿海, 是我国北方海域中经济价值最高的乌贼<sup>[9-10]</sup>。关于金乌贼的研究主要集中在繁殖行为<sup>[10-11]</sup>、亲体驯养<sup>[12]</sup>、胚胎发育<sup>[13]</sup>、资源增殖养护<sup>[14-16]</sup>等方面。也有研究发现, 交配后单独暂养的雌性金乌贼至少可以连续10 d产出受精卵<sup>[17]</sup>, 而黏附在雌性口膜表面精子囊中的精子如何转运、储存并保

收稿日期: 2019-04-18 修回日期: 2019-06-07

资助项目: 国家自然科学基金(41676153)

通信作者: 张秀梅, E-mail: xiumei1227@163.com

证卵子受精等尚未见相关报道。

因此,本研究利用实验生态学和组织切片技术,检测了交配后不同时间段雌性口膜表面精子囊和纳精囊中精子数量的变化,观察分析了雌性金乌贼纳精囊的组织结构,以期揭示精子进入纳精囊的转运过程及其在产卵过程中的利用方式,为金乌贼繁殖生物学研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用金乌贼于2018年6—7月取自青岛胶南周边海域。选取健康状况良好(体色鲜亮、活性较强、胴背部无明显伤痕)的成熟雄性[平均胴长(16.84±1.21) cm; 平均体质量(620.25±74.49) g]和雌性[平均胴长(15.17±0.54) cm; 平均体质量(501.68±57.71) g]金乌贼于长方形水泥池(4 m×2 m×1 m)中分开暂养5 d以上(所用金乌贼均为海捕个体,有可能在自然海区已交配),尽量降低雌性个体在实验前因交配对实验产生的影响。暂养期间水池内海水循环流动,采用自然光照,海水盐度31~32,温度21℃~25℃,全天连续充氧;水池中放置长方形网片(45 cm×20 cm)作为产卵附着基,每日8:00投喂鲜活斑节对虾(*Penaeus monodon*)。

### 1.2 实验设计

交配实验在0.8 m×0.8 m×0.8 m的正方形网箱中进行。实验开始前,将隔离暂养后的1只雄性和1只雌性放入实验网箱中适应12 h,并用隔板将雌雄个体分开。实验开始后,将隔板打开,让雄性个体与雌性个体进行交配,确认交配成功后,移除雌性个体单独喂养,同时关闭隔板。每个雄性个体最多与两个雌性个体交配(防止雄性交配过于频繁对交配过程中输送精荚的数量产生影响)。重复上述步骤直至30个雌性全部完成1次交配。分别在交配后的第0~10天逐日进行取样,每次随机取3只雌性个体用于后续分析。同时设置未将雄性个体从正方形网箱中取出的3个组作为对照(雌雄个体可以随时交配)。

### 1.3 平均日产卵量和受精率的计算

每天15:00将附着卵的网片取出统计当日的产卵量,同时将未附着卵的新网片置于网箱中,用于统计次日的产卵量。将统计完产卵量的网片做好标记后放入长方形水泥池中单独孵化(孵化期间水池内海水循环流动,采用自然光照,

海水盐度31~32,温度21℃~25℃,全天连续充氧),直至可肉眼区分卵是否受精(卵中出现胚胎即为受精卵)。随机取40~50粒卵统计受精率,其计算公式:

$$\text{受精率}(\%) = \frac{\text{受精卵数}}{\text{卵总数}} \times 100\%$$

### 1.4 精子囊形态观察及其精子数量的计算

将每日随机抽取的3只雌性个体麻醉后置于冰上,统计黏附在口膜表面精子囊的数量并描述精子囊的形态特征。随后用镊子小心取下精子囊,将精子囊剪碎后放入500 μL海水中,振荡后静置,充分释放其中的精子。待精子全部释放后再加入等量4%的甲醛溶液并振荡混匀。用滴管吸取少量精子悬液于细胞计数板的凹槽内,盖上盖玻片,在显微镜下观察并记录细胞计数板中精子的数量。

### 1.5 纳精囊的组织学观察及其精子体积的计算

将取下的纳精囊组织置于Davidson氏固定液中固定24 h后,用70%酒精冲洗后保存,用于后期切片观察。将固定后的样品经梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,莱卡切片机进行横向、纵向连续切片,切片厚度7 μm,苏木精-伊红(H.E)染色,中性树胶封片。从包含纳精囊的第1张切片开始,用Nikon E600显微镜进行拍照。每隔5张切片拍摄1次,直至切片中不再包含纳精囊。照片用Image J软件进行测量,首先分别测量出每张切片上纳精囊及其中精子的面积,然后再乘以切片厚度,分别计算出每张切片中纳精囊和精子的体积,最后将所有切片的体积求和,即可估算出整个纳精囊及其中精子的体积。

### 1.6 数据分析

所有数据均用SPSS 19.0软件进行统计分析,并用平均值±标准差(mean±SD)表示。交配后不同天数纳精囊中精子体积的差异显著性用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和Duncan氏多重比较进行分析。

## 2 结果

### 2.1 雌性金乌贼日产卵量的变化

交配后1~2 d实验组雌性平均日产卵量由87粒上升至123粒,呈显著上升趋势;2~7 d平均日产卵量趋于稳定,在101~123粒之间波动;7~8 d平均日产卵量显著下降(107~60粒);8 d后平均日

产卵量处于较低水平, 在43~60粒之间波动(图1)。对照组雌性亲本的平均日产卵量变化趋势与实验组相似, 同样呈现先升后稳再降再稳的变化趋势。

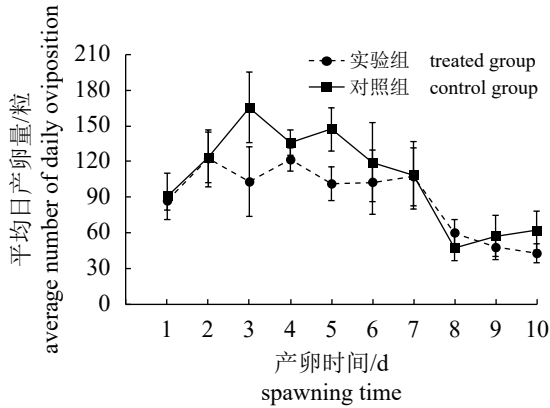


图1 雌性亲本的平均日产卵量随时间变化曲线

Fig. 1 Dynamics of daily oviposition of the female parents

### 2.2 雌性金乌贼产卵受精率的变化

交配后1~2 d, 实验组平均受精率维持在90%左右, 处于较高水平, 且与对照组无显著差异( $P>0.05$ ); 2~3 d平均受精率由88%迅速下降至62%, 且第3天受精率显著低于对照组( $P<0.05$ ); 3~4 d平均受精率显著升高, 且第4天受精率与对照组无显著差异; 4 d后平均受精率呈现逐渐下降的趋势, 且从第5天开始显著低于对照组( $P<0.05$ ) (图2)。1~8 d对照组平均受精率维持在较高水平, 均在77%以上; 8 d以后呈现逐渐下降的趋势。

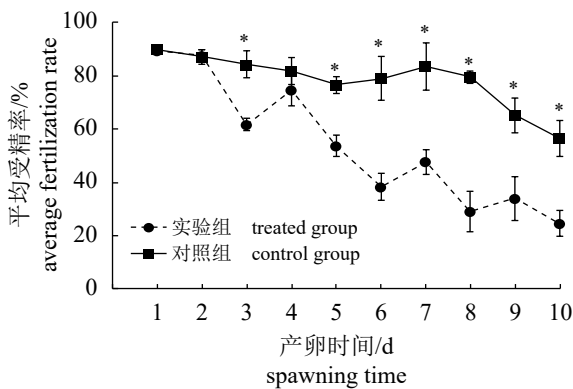


图2 实验组和对照组平均受精率随时间变化曲线

\*表示相同产卵时间实验组和对照组差异显著 ( $P<0.05$ )

Fig. 2 Dynamics of fertilization rate of treated and control groups

\* represents significant differences between treated group and control group at the same spawning time( $P<0.05$ )

### 2.3 精子囊形态的变化

刚交配后, 雌性口膜表面精子囊呈簇状排列且十分紧密, 区分非常明显, 呈乳白色, 精子充满整个精子囊。通过统计黏附在口膜表面精子囊的数量发现, 雄性一次交配通常传递7~13个精荚给雌性; 交配1 d后, 精子囊区分明显, 大部分呈乳白色, 部分呈透明状, 其中的部分精子被消耗; 交配2 d后, 精子囊区分较明显, 大部分呈透明状, 部分呈浅乳白色, 其中的精子数量显著减少; 交配3 d后, 精子囊相对较完整, 但其中的精子几乎全部消失, 只剩下透明的囊壁; 交配4 d后, 精子囊开始糜烂, 囊壁开始变得模糊, 其中已不再有精子出现; 交配5 d后, 精子囊呈糜烂状, 几乎无法区分甚至消失。

### 2.4 纳精囊组织结构

金乌贼纳精囊位于繁殖期雌性个体口膜腹面的突起处, 乳白色, 形似一串葡萄, 共1对。每个纳精囊上端仅具有1个开口, 位于口膜内表面, 通过一根中央管(central duct)连通整个纳精囊(图版-1, 2)。在中央管两端, 有12~20个细长储精小囊(sperm storage bulbs)与之相连(图版-2), 储精小囊腔室长( $563.6\pm 132.6$ )  $\mu\text{m}$ 、宽( $256.9\pm 77.5$ )  $\mu\text{m}$ 。在口膜表面纳精囊开口附近有大量黏液细胞(mucus cell)(图版-3)。中央管壁由立方纤毛上皮细胞(cuboidal ciliated epithelial cell)组成, 细胞核呈椭圆形, 表面含有大量黏膜褶皱(mucus drop)和纤毛(ciliate)(图版-4, 5)。储精小囊由单层上皮细胞(simple epithelium cell)和发达的环肌(circular muscle)组成, 其底部出现大量液泡(vacuole), 其中部液泡较少, 而在其上上部、与中央管连接处以及中央管中则不再有液泡出现(图版-6, 7)。储精小囊中的精子主要分布在腔室四周贴近内壁处, 并且大部分精子头部均朝向腔室内壁, 腔室中央亦有精子出现, 但其精子头部并没有固定朝向(图版-5, 7)。随着精子数量的不断增加, 精子开始由腔室四周向中央扩散, 并逐渐充满整个腔室, 腔室中央精子头部的朝向也开始变得有规律(图版-8, 9)。

### 2.5 受精率与雌性口膜精子囊和纳精囊中精子量的关系

交配后1~2 d, 口膜精子囊中精子量显著下

降,而纳精囊中精子量显著上升,但卵的受精率却无显著变化;2~3 d精子囊中精子量和受精率均显著下降,但纳精囊中精子量却无显著变化;3~4 d精子囊和纳精囊中精子量均显著下降,

但受精率却显著上升;4 d以后纳精囊中精子量和受精率显著下降,精子囊中已经不再有精子出现(图3)。

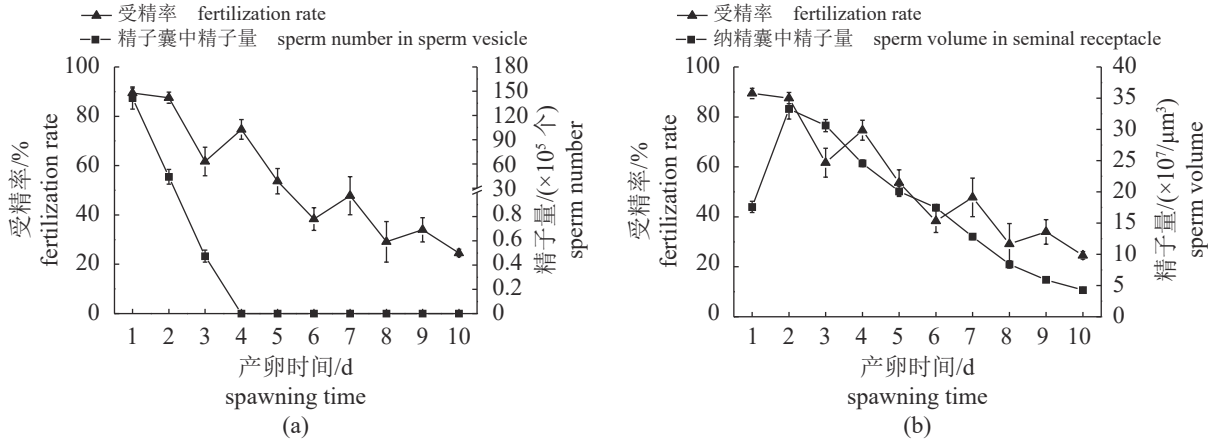


图3 精子囊(a)和纳精囊(b)中精子量及受精率随时间变化的曲线

Fig. 3 Dynamics of sperm quantity and fertilization rate in sperm vesicle (a) and seminal receptacle (b) with time

### 3 讨论

#### 3.1 纳精囊的形态特征

纳精囊是头足类雌性个体储存精子的重要器官,其形态特征常因种而异。福氏枪乌贼的纳精囊呈簇状,是典型的复合泡状腺<sup>[4]</sup>;玄妙微鳍乌贼的纳精囊呈分支状,形似一串香蕉,具有几个区分明显的小囊<sup>[7]</sup>;茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)的纳精囊从口膜表面突起,形似一座突起的火山<sup>[18]</sup>;欧洲横纹乌贼的纳精囊则形似一串葡萄,通过一根中央管连通整个纳精囊<sup>[5]</sup>;金乌贼的纳精囊则与欧洲横纹乌贼十分相似,通过中央管连接各个储精小囊形成“葡萄状”的结构。纳精囊的位置在不同种类中也会有很大的变化。对于大部分头足类而言,纳精囊位于雌性个体口膜腹面,如欧洲横纹乌贼<sup>[5]</sup>、玄妙微鳍乌贼<sup>[7]</sup>和金乌贼。也有少数种类的纳精囊位于其他部位,如狼乌贼(*Lycoteuthis lorigera*)位于胴体背面<sup>[19]</sup>,异鱿乌贼(*Heteroteuthis dispar*)位于内脏团末端<sup>[20]</sup>,而嘉庚蛸(*Octopus tankahkeei*)则位于输卵管腺内部<sup>[21]</sup>。纳精囊的数量同样存在种间差异,皮氏枪乌贼(*L. pealii*)和贝氏深海乌贼(*Bathyteuthis berryi*)仅具有1个纳精囊<sup>[22-23]</sup>;欧洲横纹乌贼和澳大利亚巨乌贼均具有2个纳精囊<sup>[5-6]</sup>;太平洋褶柔鱼(*Todarodes pacificus*)有多达20个纳精囊<sup>[24]</sup>;而茎柔鱼口膜上则布满纳精囊,数量多达260多个<sup>[25]</sup>;

金乌贼与欧洲横纹乌贼和澳大利亚巨乌贼相似,有2个纳精囊。头足类纳精囊形态、数量和位置的差异可能与不同种类的繁殖习性有关。雌性太平洋褶柔鱼在未达到性成熟时便开始与达到性成熟的雄性个体交配,当雌性开始产卵时早已不再与雄性交配,这就导致雌性个体产卵前需要将精子在纳精囊中储存很长一段时间。而口膜周围大量的纳精囊不仅能够为精子的长期储存提供可能,同时还能为雌性个体在产卵过程中提供充足的精子进行受精<sup>[24]</sup>。对于金乌贼而言,其交配和产卵过程同时进行,整个繁殖期雌雄可多次交配。因此,雌性个体口膜精子囊中的精子足以维持较高的受精率,而不需要动用纳精囊中的精子。其纳精囊可能仅在外界精子来源不足时作为精子的应急来源使用,因此与太平洋褶柔鱼相比,金乌贼纳精囊数量显著减少。纳精囊形态的多态性可能还与交配后的性选择有关,如雌性的隐秘选择、雌性和雄性生殖器官的拮抗进化等<sup>[26]</sup>。Arnqvist等<sup>[27]</sup>在研究雌雄水虱(*Aquarium paludum*)形态拮抗进化时发现,在交配过程中反抗越激烈的种类,其雄性个体越善于抓住雌性。在交配过程中,头足类雄性个体的茎化腕并未伸入到雌性的纳精囊中,因此,茎化腕和纳精囊之间可能并不会发生拮抗进化。另外,头足类普遍具有多次交配的现象,这就导致了精子竞争的产生,纳精囊

形态的不同为其中精子的选择性利用提供了可能。雌性个体可能有选择地动用不同小囊中的精子来控制后代的父系<sup>[7]</sup>,但金乌贼能否选择性地动用纳精囊中的精子还有待进一步研究。

### 3.2 纳精囊的结构特征

头足类具有不同的繁殖习性,导致其纳精囊结构也会产生种间特异性。枪乌贼(*L. vulgaris*)纳精囊开口附近由立方上皮细胞组成,其中含有大量具有分泌功能的杯状细胞<sup>[28]</sup>;欧洲横纹乌贼的黏液细胞则位于储精小囊内<sup>[5]</sup>;玄妙微鳍乌贼的纳精囊中没有黏液细胞,仅在每个储精小囊底部有液泡出现<sup>[7]</sup>,这些黏液细胞的功能也存在显著差异。Sato等<sup>[7]</sup>认为玄妙微鳍乌贼储精小囊底部液泡的功能与黏液细胞的功能类似,具有吸引精子的作用。van Oordt<sup>[28]</sup>研究发现,纳精囊内壁杯状细胞分泌的物质具有固化和营养精子而不是吸引精子的作用。Hanlon等<sup>[5]</sup>认为黏液细胞分泌的物质具有吸引和纯化纳精囊中精子的作用。本研究发现,金乌贼纳精囊开口附近口膜表面具有大量褶皱,其内部还含有大量黏液细胞,同时在褶皱底部还有大量精子出现,推测金乌贼黏液细胞的功能与欧洲横纹乌贼类似,具有吸引精子的作用。除黏液细胞的分布及功能不同以外,储精小囊的结构也存在种间差异。茎柔鱼的储精小囊内壁由立方纤毛上皮细胞和环肌组成<sup>[25]</sup>。而澳大利亚巨乌贼的储精小囊则是由单层柱状上皮细胞和环肌组成<sup>[6]</sup>。金乌贼的储精小囊与澳大利亚巨乌贼十分相似,也是由单层柱状上皮细胞和环肌组成。储精小囊中有大量精子出现,并且精子头部大部分朝向腔室内壁,推测其内壁细胞能够分泌某些吸引精子的物质。

### 3.3 精子进入纳精囊的方式

交配后,精子囊会黏附在雌性身体的不同部位,精子囊的开口并不与纳精囊开口直接相连,二者间有一段距离,精子囊中的精子需寻找到纳精囊开口并进入纳精囊,但关于精子的转运方式还尚未有定论。

雌性个体对精子囊的移动可能对精子的转运起到了积极的作用。如雌性加勒比珊瑚乌贼(*Sepioteuthis sepioidea*)在交配后用腕抓住精子囊并将其输送至纳精囊附近<sup>[1]</sup>。Kasugai<sup>[29]</sup>研究发

现,雌性玄妙微鳍乌贼在交配后会通过口膜的扩张来收集黏附在其头部、颈部和腕上的精子囊,并且通过该方式将精子囊中的精子输送到纳精囊中。也有学者认为,雌性个体对精子囊的移动仅仅是交配后的某种繁殖行为,并没有在精子从精子囊到纳精囊的转运过程中起到积极作用。如玄妙微鳍乌贼则通过一种“拾取”行为来移除和吃掉精子囊<sup>[7]</sup>。繁殖期的雌性澳洲后耳乌贼(*Sepiadarium austrinum*)则会吃掉部分雄性传递的精荚来为自身和卵母细胞的发育提供营养<sup>[30]</sup>。本研究中,并未观察到交配后的雌性金乌贼口膜扩张和用腕“拾取”精子囊的行为,如果精子囊中的精子是被雌性个体通过以上行为输送进纳精囊的,那么纳精囊中精子的排列就会像灰眼雪蟹(*Chionoecetes opilio*)一样,出现分层的现象<sup>[31-32]</sup>。但是,金乌贼纳精囊中大部分精子头部均朝向储精小囊的内壁,并未出现分层的现象。以上结果表明,金乌贼的精子并不是通过雌性口膜扩张和用腕“拾取”精子囊等方式进入纳精囊的。

除了雌性个体积极移动精子囊以外,纳精囊肌肉的收缩也是精子进入纳精囊的方式之一。van Oordt<sup>[28]</sup>研究发现,枪乌贼纳精囊开口处附近杯状细胞分泌的物质已经让到达纳精囊开口的精子变得不活跃,同时在纳精囊中还出现大量肌纤维。由此认为,精子是通过纳精囊肌肉的收缩而进入。本研究发现,纳精囊中大部分精子头部均朝向其储精小囊的内壁,如果精子是被纳精囊吸入,其中精子的分布应该是杂乱无章而不是规律分布,推测精子并不是依靠纳精囊肌肉收缩而进入。

精子还能通过自身的运动进入纳精囊。Fernández-Álvarez等<sup>[18]</sup>研究发现,在精子囊和纳精囊之间雌性口膜表面上有大量精子出现,由此认为,精子是通过自身的运动进入纳精囊的。在体内受精的线状箭虫(*Sagitta hispida*)中,其精子也是有目的性的从黏附在雌性体表的精荚向其精子储存器官运动<sup>[33]</sup>。本研究发现,在精子囊和纳精囊开口之间口膜表面含有大量褶皱,在褶皱底部有大量精子出现,并且精子在储精小囊中的分布具有一定的规律(精子头部朝向储精小囊的内壁),以上结果均表明金乌贼精子是通过自身运动进入纳精囊的。纳精囊中央管中具有大量纤毛,推测纳精囊通过纤毛的摆动协助

精子的运动以减少精子的能量消耗。金乌贼储精小囊中的精子至少可以存活10 d<sup>[17]</sup>, 推测其上皮细胞能够分泌抑制精子运动的物质以降低精子能量的消耗, 同时这些物质可能还具有营养精子的作用, 为精子在纳精囊中长期储存提供了可能。在一夫多妻繁殖模式的种类中, 如太平洋褶柔鱼<sup>[34]</sup>、长枪乌贼(*L. bleekeri*)<sup>[35]</sup>, 精子通常聚集成群共同运动。精子的聚集行为可能与其体外受精方式有关, 或者仅仅是具有不同繁殖习性的种类中弱势雄性个体在精子竞争中展现出来的竞争优势<sup>[34-35]</sup>。由于大部分头足类具有多次交配的繁殖习性, 因此精子的聚集行为可能与一种重要的性选择形式—精子竞争有关。成群的精子在运动过程中产生的机械力可能会导致之前储存的精子被迫移动到较不利的位置, 导致纳精囊中精子向外释放时最后交配雄性的精子具有很大的优势。金乌贼也具有多次交配的繁殖习性, 并且属于最后精子竞争优势的种类<sup>[17]</sup>, 但金乌贼精子是否同样聚集成群从精子囊向纳精囊运动还有待进一步研究。

### 3.4 精子囊和纳精囊中精子的利用方式

交配后, 雌性金乌贼精子的储存场所主要有两个, 一个是黏附在雌性口膜表面的精子囊, 另一个则是位于口膜腹面的纳精囊<sup>[11]</sup>。本研究发现, 交配1次后单独暂养的雌性个体能够连续10 d产出受精卵, 并且黏附在口膜表面的精子囊已在交配后的4~5 d完全消失, 表明雌性个体动用了纳精囊中的精子进行受精。在交配后的1~2 d, 精子囊中精子量迅速减少, 纳精囊中精子量反而迅速增加, 产出卵的受精率也能维持在较高水平, 表明该阶段主要利用精子囊中大量的精子进行受精, 同时还能将过量的精子储存在纳精囊中。2~3 d时, 精子囊中精子量继续迅速减少, 纳精囊中精子量略微减少, 受精率开始显著下降, 表明该阶段精子囊中的精子已经被大量消耗, 其中的精子不足以维持较高的受精率, 而此时纳精囊中的精子还未被大量动用, 因此受精率开始显著下降。3~4 d时, 精子囊中的精子量虽然继续减少, 已不足以维持较高的受精率。此时纳精囊中的精子开始被大量动用, 因此受精率开始显著上升。而在4 d以后, 精子囊中不再有精子出现, 而纳精囊中的精子量迅速减少, 因此受精率也开始迅速下

降。实验进行至10 d时, 产出卵的受精率仍然能维持在25%左右, 表明在缺乏外界精子的来源时, 其纳精囊中的精子能够逐渐地释放出来维持产出卵的受精率, 类似的现象在澳大利亚巨乌贼的研究中也有报道<sup>[6]</sup>。此外, 雌性金乌贼单次交配并不能获得足够的精子来长期维持较高的受精率。因此, 其多次交配的繁殖行为能够有效补充雌性可利用精子的数量, 确保产出卵的受精率, 以增加更多的补充后代。

### 3.5 受精方式

头足类的受精方式主要分为两种, 一种为体内受精, 如真蛸(*O. vulgaris*)<sup>[36]</sup>、长蛸(*O. variabilis*)<sup>[37]</sup>等; 另一种为体外受精, 如澳大利亚巨乌贼<sup>[38]</sup>、异鱿乌贼<sup>[20]</sup>、新僧头乌贼(*Neorossia caroli*)<sup>[39]</sup>等。本研究通过组织学观察发现, 金乌贼纳精囊仅在口膜内表面开口, 是一个位于体外相对独立的结构。如果金乌贼的受精方式是体内受精, 那么精子囊以及纳精囊中的精子需要越过整个口膜, 穿过漏斗, 进入外套腔, 最后到达输卵管与其中的卵子结合形成受精卵。要完成此过程, 精子则需要消耗大量的能量, 同时还会面临大量损失的风险, 以致到达输卵管精子的活性和数量下降, 无法维持较高的受精率甚至不能完成受精。Wada等<sup>[11]</sup>研究发现, 雌性金乌贼会用腕抱住由漏斗排出的卵细胞在口膜附近停留一段时间。由此判断, 金乌贼的受精方式为位于口膜附近的体外受精。

## 4 结论

金乌贼纳精囊位于繁殖期雌性口膜腹面的凸起处, 共1对。交配过程中, 雄性个体通常一次传递7~13个精荚给雌性。在此过程中, 精荚发生放射反应形成精子囊黏附在雌性口膜表面。精子囊中的精子从其开口处逐渐释放出来, 部分精子进入口膜表面的褶皱中, 通过自身运动到达纳精囊。进入纳精囊的精子通过自身运动及中央管内壁纤毛的摆动进入储精小囊, 进入储精小囊的精子大部分头部朝向储精小囊内壁有规律的分布。在产卵过程中, 雌性个体优先利用精子囊中的精子进行受精, 而在精子囊中精子不足时, 纳精囊通过肌肉的收缩以及纤毛的摆动将其中的精子逐渐释放出来, 卵在口膜附近完成体外受精(图4)。

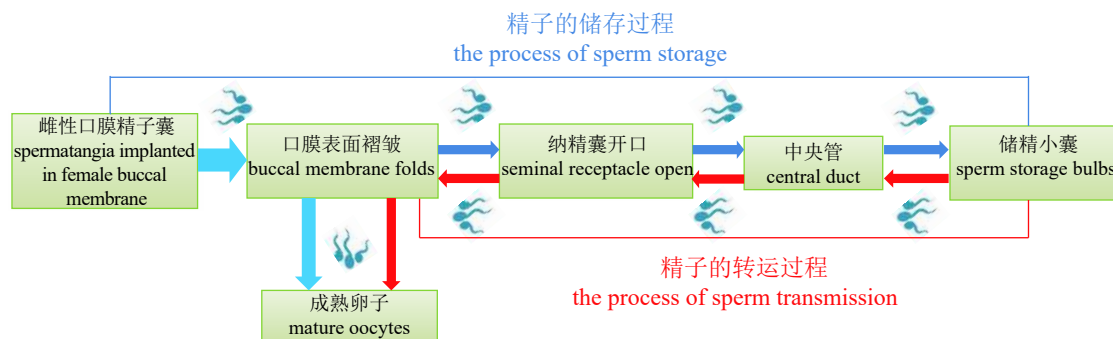


图 4 金乌贼精子储存、转运和利用过程模式图

Fig. 4 Diagram of sperm storage, transmission and utilization of *S. esculenta*

## 参考文献:

- [ 1 ] Hanlon R T, Messenger J B. Cephalopod behaviour[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- [ 2 ] Iwata Y, Sakurai Y. Threshold dimorphism in ejaculate characteristics in the squid *Loligo bleekeri*[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2007, 345: 141-146.
- [ 3 ] Takahama H, Kinoshita T, Sato M, *et al.* Fine structure of the spermatophores and their ejaculated forms, sperm reservoirs, of the Japanese common squid, *Todarodes pacificus*[J]. *Journal of Morphology*, 1991, 207(3): 241-251.
- [ 4 ] Lum-Kong A. A histological study of the accessory reproductive organs of female *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae)[J]. *Journal of Zoology*, 1992, 226(3): 469-490.
- [ 5 ] Hanlon R T, Ament S A, Gabr H. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda)[J]. *Marine Biology*, 1999, 134(4): 719-728.
- [ 6 ] Naud M J, Shaw P W, Hanlon R T, *et al.* Evidence for biased use of sperm sources in wild female giant cuttlefish (*Sepia apama*)[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 272(1567): 1047-1051.
- [ 7 ] Sato N, Kasugai T, Ikeda Y, *et al.* Structure of the seminal receptacle and sperm storage in the Japanese pygmy squid[J]. *Journal of Zoology*, 2010, 282(3): 151-156.
- [ 8 ] 叶德锋. 曼氏无针乌贼精子包装、传递及储存研究[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2011.
- Ye D F. Sperm packaging, transmitting and storing in *Sepiella maindroni*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2011(in Chinese).
- [ 9 ] 雷舒涵. 金乌贼胚胎与幼体发育生物学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- Lei S H. Studies on embryonic and larval development of golden cuttlefish (*Sepia esculenta*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013(in Chinese).
- [10] 王亮, 张秀梅, 丁鹏伟, 等. 金乌贼繁殖行为与交配策略[J]. *生态学报*, 2017, 37(6): 1871-1880.
- Wang L, Zhang X M, Ding P W, *et al.* Reproductive behavior and mating strategy of *Sepia esculenta*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(6): 1871-1880(in Chinese).
- [11] Wada T, Takegaki T, Mori T, *et al.* Sperm displacement behavior of the cuttlefish *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae)[J]. *Journal of Ethology*, 2005, 23(2): 85-92.
- [12] 刘长琳, 庄志猛, 陈四清, 等. 金乌贼亲体驯养与繁殖特性研究[J]. *渔业现代化*, 2009, 36(2): 34-37, 42.
- Liu C L, Zhuang Z M, Chen S Q, *et al.* Study on the broodstock domestication and propagation characteristics of *Sepia esculenta* Hoyle[J]. *Fishery Modernization*, 2009, 36(2): 34-37, 42(in Chinese).
- [13] 陈四清, 刘长琳, 庄志猛, 等. 金乌贼胚胎发育的研究[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(5): 1-7.
- Chen S Q, Liu C L, Zhuang Z M, *et al.* Observations on the embryonic development of *Sepia esculenta* Hoyle[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(5): 1-7(in Chinese).
- [14] Fujita T, Hirayama I, Matsuoka T, *et al.* Spawning behavior and selection of spawning substrate by cuttlefish *Sepia esculenta*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1997, 63(2): 145-151.
- [15] 牛超, 杨超杰, 黄玉喜, 等. 金乌贼新型产卵附着基的实验研究[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1234-1244.
- Niu C, Yang C J, Huang Y X, *et al.* The efficacy of new spawning substrates for *Sepia esculenta* oosperm

- adhesion[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1234-1244(in Chinese).
- [16] 赵厚钧, 魏邦福, 胡明, 等. 金乌贼受精卵孵化及不同材料附着基附卵效果的初步研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2004(3): 64-68.
- Zhao H J, Wei B F, Hu M, *et al.* Preliminary study on *Sepia esculenta* oosperm hatching and effects of different adhesion substrates[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004(3): 64-68(in Chinese).
- [17] 王亮. 金乌贼繁殖行为和繁殖策略研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2016.
- Wang L. Reproductive behavior and reproductive strategy of *Sepia esculenta*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2016(in Chinese).
- [18] Fernández-Álvarez F Á, Villanueva R, Hoving H J T, *et al.* The journey of squid sperm[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2018, 28(1): 191-199.
- [19] Hoving H J T, Lipinski M R, Roeleveld M A C, *et al.* Growth and mating of southern African *Lycoteuthis lorigera* (Steenstrup, 1875) (Cephalopoda; Lycoteuthidae)[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2007, 17(2-3): 259-270.
- [20] Hoving H J T, Laptikhovskiy V, Piatkowski U, *et al.* Reproduction in *Heteroteuthis dispar* (Rüppell, 1844)(Mollusca: Cephalopoda): a sepiolid reproductive adaptation to an oceanic lifestyle[J]. *Marine Biology*, 2008, 154(2): 219-230.
- [21] 焦海峰, 彭小明, 尤仲杰, 等. 嘉庚蛸雌性生殖系统组织学观察[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(6): 88-95.
- Jiao H F, Peng X M, You Z J, *et al.* Histological study of reproductive system of the female *Octopus tankahkeei*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2011, 46(6): 88-95(in Chinese).
- [22] Bush S L, Hoving H J T, Huffard C L, *et al.* Brooding and sperm storage by the deep-sea squid *Bathyteuthis berryi* (Cephalopoda: Decapodiformes)[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2012, 92(7): 1629-1636.
- [23] Drew G A. Sexual activities of the squid, *Loligo pealii* (Les.) I. Copulation, egg-laying and fertilization[J]. *Journal of Morphology*, 1911, 22(2): 327-359.
- [24] Ikeda Y, Sakurai Y, Shimazaki K. Fertilizing capacity of squid (*Todarodes pacificus*) spermatozoa collected from various sperm storage sites, with special reference to the role of gelatinous substance from oviducal gland in fertilization and embryonic development[J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 1993, 23(1): 39-44.
- [25] 许泓民, 陈新军, 管卫兵. 茎柔鱼精荚与纳精囊的结构与功能[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(10): 199-202.
- Xu H M, Chen X J, Guan W B. The structure and function of spermatophore and seminal receptacle of *Dosidicus gigas*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(10): 199-202(in Chinese).
- [26] Hosken D J, Stockley P. Sexual selection and genital evolution[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2004, 19(2): 87-93.
- [27] Arnqvist G, Rowe L. Correlated evolution of male and female morphologies in water striders[J]. *Evolution*, 2002, 56(5): 936-947.
- [28] van Oordt G J. The spermatheca of *Loligo vulgaris*. I. Structure of the spermatheca and function of its unicellular glands[J]. *Journal of Cell Science*, 1938, s2-80: 593-599.
- [29] Kasugai T. Reproductive behavior of the pygmy cuttlefish *Idiosepius paradoxus* in an aquarium[J]. *Venus*, 2000, 59(1): 37-44.
- [30] Wegener B J, Stuart-Fox D, Norman M D, *et al.* Spermatophore consumption in a cephalopod[J]. *Biology Letters*, 2013, 9(4): 20130192.
- [31] Sainte-Marie G, Sainte-Marie B, Jean-Marie S. Ejaculate-storage patterns and the site of fertilization in female snow crabs (*Chionoecetes opilio*; Brachyura, Majidae)[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2000, 78(11): 1902-1917.
- [32] Urbani N, Sainte-Marie B, Sévigny J M, *et al.* Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae)[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1998, 55(5): 1104-1113.
- [33] Reeve M R, Walter M A. Observations and experiments on methods of fertilization in the chaetognath *Sagitta hispida*[J]. *Biological Bulletin*, 1972, 143(1): 207-214.
- [34] Hirohashi N, Iida T, Sato N, *et al.* Complex adaptive traits between mating behaviour and post-copulatory sperm behaviour in squids[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2016, 26(3): 601-607.
- [35] Hirohashi N, Alvarez L, Shiba K, *et al.* Sperm from sneaker male squids exhibit chemotactic swarming to CO<sub>2</sub>[J]. *Current Biology*, 2013, 23(9): 775-781.
- [36] Di Cosmo A, Di Cristo C, Paolucci M. Sex steroid



- hormone fluctuations and morphological changes of the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris* throughout the annual cycle[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 289(1): 33-47.
- [37] 李来国. 长蛸生殖系统组织学和精卵发生的细胞学研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2010.
- Li L G. Studies on histology of reproductive system and cell biology on spermatogenesis and oogenesis of *Octopus variabilis*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2010(in Chinese).
- [38] Naud M J, Havenhand J N. Sperm motility and longevity in the giant cuttlefish, *Sepia apama* (Mollusca: Cephalopoda)[J]. *Marine Biology*, 2006, 148(3): 559-566.
- [39] Cuccu D, Mereu M, Cannas R, *et al.* Egg clutch, sperm reservoirs and fecundity of *Neorossia caroli* (Cephalopoda: Sepiolidae) from the southern Sardinian Sea (western Mediterranean)[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2007, 87(4): 971-976.

## Histological structure of the seminal receptacle, sperm storage and utilization in the golden cuttlefish (*Sepia esculenta*)

WANG Zhan<sup>1</sup>, WANG Linlong<sup>1</sup>, LI Wentao<sup>1</sup>, ZHANG Xiumei<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

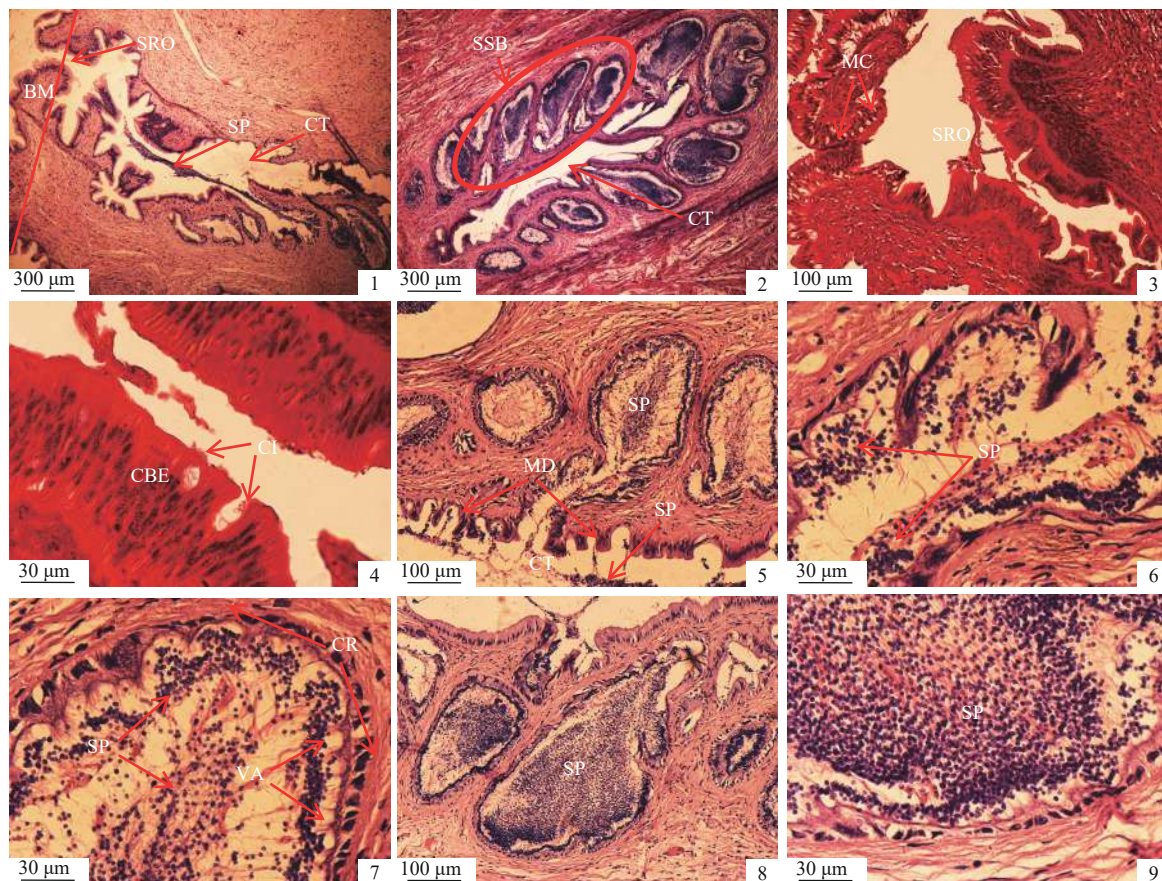
2. Functional Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Process, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266072, China)

**Abstract:** The changes in the spermatozoa number in spermatangia and seminal receptacles at different times after copulation, and the structure of the seminal receptacle were examined by using experimental ecology and tissue section techniques to reveal the mechanism of sperm storage in seminal receptacle and sperm utilization during oviposition. The results showed that paired seminal receptacles were located in the raised ventral portion of the buccal membrane, and opened inside the buccal membrane. The entire seminal receptacle was connected by a central duct, which had many folds and cilia on its inner surface. Each seminal receptacle had 12-20 sperm storage bulbs surrounded by circular muscles. A large number of spermatozoa were stored in sperm storage bulbs, and the heads of most spermatozoa faced toward the inner surface of sperm storage bulbs. After one copulation, the utilization of spermatozoa in spermatangia and seminal receptacles could be divided into three stages: ① the utilization of spermatozoa mainly from spermatangia (1-2 d after copulation); ② the transition from the utilization of spermatozoa in spermatangia to spermatozoa in seminal receptacles (2-3 d after copulation); ③ the utilization of spermatozoa mainly from seminal receptacles (more than 3 d after copulation). These results suggest that spermatozoa released from the spermatangia reached the seminal receptacles through the folds on the surface of the female buccal membrane. Spermatozoa entered the sperm storage bulbs through self-movement and cilia fluttering on the inner surface of the central duct. The distribution of spermatozoa inside the sperm storage bulbs was highly regular, and the heads of most spermatozoa faced toward the inner surface of the sperm storage bulbs. During spawning, females preferred to use spermatozoa from spermatangia to fertilize their eggs. When spermatozoa in spermatangia were insufficient, spermatozoa in seminal receptacles were released gradually by muscle contraction and cilia fluttering, and ova were fertilized externally near the female buccal membrane.

**Key words:** *Sepia esculenta*; seminal receptacle; sperm storage; sperm utilization; transmission mechanism

**Corresponding author:** ZHANG Xiumei. E-mail: xiumei1227@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41676153)



图版 纳精囊的组织结构

1. 纳精囊纵切, 示开口和中央管( $\times 40$ )。其中虚线左侧为口膜表面; 2. 纳精囊纵切, 示中央管和储精小囊( $\times 40$ ); 3. 纳精囊开口纵切, 示黏液细胞( $\times 100$ ); 4. 中央管纵切, 示立方纤毛上皮细胞和纤毛( $\times 400$ ); 5. 纳精囊纵切, 示中央管褶皱( $\times 100$ ); 6. 储精小囊开口纵切, 示精子分布情况( $\times 400$ ); 7. 储精小囊基部纵切, 示环肌、液泡及精子较少时的分布情况( $\times 400$ ); 8. 储精小囊纵切, 示精子较多时的分布状况( $\times 100$ ); 9. 储精小囊基部纵切, 示精子较多时的分布情况( $\times 400$ )。BM. 口膜; CBE. 立方纤毛上皮细胞; CI. 纤毛; CR. 环肌; CT. 中央管; MC. 黏液细胞; MD. 黏膜褶皱; SP. 精子; SRO. 纳精囊开口; SSB. 储精小囊; VA. 液泡

#### Plate Structure of the seminal receptacle

1. longitudinal section of the seminal receptacle, showing the opening and the central duct( $\times 40$ ). The left side of the broken line indicates the surface of the buccal membrane; 2. longitudinal section of the seminal receptacle, showing the central duct and sperm storage bulbs( $\times 40$ ); 3. longitudinal section through the opening of seminal receptacle, showing mucus cells( $\times 100$ ); 4. longitudinal section of the central duct, showing cuboidal ciliated epithelial cells and cilia( $\times 400$ ); 5. longitudinal section of the seminal receptacle, showing central duct folds( $\times 100$ ); 6. longitudinal section through the opening of sperm storage bulb, showing the distribution of spermatozoa( $\times 400$ ); 7. longitudinal section through the base of the sperm storage bulb, showing circular muscles, vacuoles and the distribution of spermatozoa( $\times 400$ ); 8. longitudinal section of the sperm storage bulb, showing the distribution of spermatozoa( $\times 100$ ); 9. longitudinal section through the base of the sperm storage bulb, showing the distribution of spermatozoa( $\times 400$ ). BM. buccal membrane; CBE. cuboidal ciliated epithelial cell; CI. cilium; CR. circular muscle; CT. central duct; MC. mucus cell; MD. mucus drap; SP. sperm; SRO. seminal receptacle open; SSB. sperm storage bulb; VA. vacuole