

金乌贼(*Sepia esculenta*)精子超微结构 和低温损伤电镜观察*

韩 松 郑小东 李 琪 于瑞海

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

提要 利用扫描和透射电镜技术研究了金乌贼成熟精子的超微结构,以及超低温冷冻对精子超微结构和形态的影响。结果表明,金乌贼精子为鞭毛型精子,外部附有光滑的裙边状被膜,分为头部、中部和尾部三部分。头部由顶体和细胞核组成,顶体位于细胞核前端,呈“囊”状。细胞核为长纺锤状。中部是由线粒体和垂直的中心粒构成,线粒体大小不一,多层分布。尾部细长,轴丝为典型的“9+2”结构。经超低温冷冻的精子被膜上出现很多凹陷;头部顶体破裂,大量的内容物流出,细胞核膜分离;线粒体解离,嵴变形;尾部缠绕在一起,少数鞭毛出现脱落。

关键词 金乌贼,精子,超微结构

中图分类号 Q954.43

精子的形态结构具有种的特异性,其结构差异可作为分类的依据。关于软体动物精子超微结构和精子发生的研究较多,多集中在双壳纲、腹足纲动物(柯才焕等, 2003; 侯林等, 2006; 王卫军等, 2009), 近几年对于头足类种类的精子超微结构、核形态、顶体生理功能的研究呈增加趋势(Fields *et al*, 1976; Enric *et al*, 2002; 竺俊全等, 2006; Martínez- Soler *et al*, 2007)。

金乌贼(*Sepia esculenta*)隶属软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、鞘亚纲(Coleoidea)、乌贼目(Sepiida)、乌贼科(Sepiidae),分布区域广泛,营养价值高,是我国重要经济头足类(董正之, 1988; 齐钟彦, 1998)。近年来,为解决不断增长的市场需求和因过度捕捞导致资源量严重衰退的矛盾,有关金乌贼繁殖行为、遗传多样性和人工繁育等工作已逐步开展起来(周维武等, 2006; Zheng *et al*, 2009)。精子超微结构研究可为金乌贼的人工育苗、增殖放流提供基础资料,也有助于从生殖生物学角度研究头足纲的系统进化过程。

本文研究了超低温对金乌贼精子超微结构的影

响,以寻求更科学有效的精子保存方式,为下一步人工操控下的体外授精提供基础数据。

1 材料与方法

2008年5—6月,于山东青岛东部海区捕获性成熟金乌贼(*Sepia esculenta*)个体,胴体长约为217mm,体重约479g。

扫描电镜样品固定:触动金乌贼精英的弹器,将精包从精英中释放出来,用3%戊二醛固定精包4h,0.1mol/L磷酸缓冲液漂洗。在30%、50%、70%、80%、100%的酒精中依次梯度脱水,其中100%酒精2次,每次10min。乙酸异戊脂置换,50%一次,100%两次。Eiko公司XD-1型二氧化碳临界点干燥器干燥,Eiko公司IB-3型离子镀金仪喷金镀膜,用JEOL公司JSM-840扫描电镜观察。

透射电镜样品固定:直接将精英用2.5%戊二醛4固定4h,然后用PBS缓冲液冲洗3次,每次10min,再用1%锇酸4后固定2h。PBS缓冲液冲洗3次,每次10min。乙醇系列梯度脱水,30%、50%、70%、90%、

* 国家自然科学基金项目资助, 30600463号; 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题资助, 2009008号; 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目, 2010AA10A404号。韩松, 中国海洋大学硕士研究生, E-mail: hans198701@126.com

通讯作者: 郑小东, E-mail: xdzheng@ouc.edu.cn

收稿日期: 2009-09-09, 收修改稿日期: 2010-01-09

100%的乙醇每次 10min, 其中 100%两次。Epon812 环氧树脂包埋, 37、45、65 温箱固化, 每级温度 24h。UltracutE 超薄切片机半薄切片, 甲苯胺蓝染色, 半薄定位。再用醋酸双氧铀硝酸铅染色。最后用 JEOL 公司生产的 JEM-1200EX 透射电镜观察。

2 结果

2.1 精英的结构(图 1a, b)

金乌贼的精英呈现长椭圆形, 外部包有被膜, 被膜内部包裹着三部分: 弹射装置(图 1c)、接合部(图 1d)和精团(图 1e)。弹射装置位于精英的最前端, 有个锥形的“头”部, 具条纹结构(图 1g), 锥状体向前延伸出具膜包裹着的“鞭毛”, 弯曲缠绕形成精英的最尖端(图 1f)。在锥状体前段还有一些丝状物垂直于“鞭毛”。弹射装置的后端是结合部, 结合部呈现“花瓶”状, 中段直径较两端大。精团位于精英末端, 占整体的 2/3 左右, 在结合部和精核之间还有连接两者的“管”状通道(图 1h), 精团末端与精英质膜还有一段

空隙, 里面充满了液体(图 1i)。当头中部包裹的质膜破损, 精团就会被释放出来, 精团中含有大量的精子。

2.2 金乌贼精子外部形态和超微结构(图 2a—f)

精子在精英内聚集成簇(图 2a), 通过交配将其储存在雌体金乌贼口球下方的纳精囊处。精子全长 50—70 μm , 表面光洁、无凹陷和破裂。精子分为头部(Head)、中部(Middle piece)、尾部(Tail)(图 2b)。头部和中部呈现长椭圆型, 尾部呈现细丝状。

2.2.1 精子头部 长约 8—10 μm , 主要由顶体和细胞核构成。顶体位于头部的最前边, 呈倒“U”状, 顶体内含有大量的顶体颗粒, 结构均一(图 2c)。这些顶体颗粒是在精子发生过程中, 由高尔基体分泌。这些顶体颗粒逐渐融合、发育形成了前顶体囊, 最终形成顶体。顶体外部包被双层的裙边状质膜。顶体后面的是细胞核, 呈长柱状, 上端较下端细窄, 核内物质分布均匀, 电子密度很高。核前端有一凹陷包围着顶体, 称为顶体窝(Acrosome fossa)或核前窝(Anterior nuclear fossa), 内含电子密度物质, 较为疏松。核后端的“V”字型浅沟为植入窝(Implantation fossa)或核后窝(posterior nuclear fossa), 往往核后窝内镶嵌着很多的线粒体(图 2d)。

2.2.2 精子中部 由线粒体围绕两个垂直的中心粒形成。其中一个中心粒位于细胞核后端的植入窝内, 称为近端中心粒。其长轴垂直于精子的长轴方向, 精子的纵切发现, 近端中心粒的横截面是有 9 组微管排列成的圆形结构(图 2e)。近端中心粒的下方是远端中心粒, 长轴的走向与精子走向一致, 远端中心粒向尾部伸出轴丝贯穿整个精子的尾部。通过透射观察到精子线粒体的构造, 呈卵圆形, 有内外双层膜构成, 内有明显的长条形和连续弯曲形髓样嵴结构。横切面上能看到多个线粒体重叠排列, 大小不一, 数目大概在 9—12 个(图 2d)。

2.2.3 精子尾部 长约 35—60 μm , 占精子全长的大部。尾部包被着质膜, 内部是远端中心粒延伸出的轴丝, 贯穿整个尾部, 形成典型的“9+2”结构。尾基部结构不对称, 相对厚的一面聚集着大量的线粒体, 为精子尾部的摆动提供动力支持。“9+2”轴丝结构和与精子尾部走向平行的 9 条粗纤维形成了“9+9+2”特有的轴丝结构(图 2e)。鞭毛自基部到末端, 直径逐渐变小。线粒体并非完全贯穿尾部, 尾部末端线粒体和粗纤维消失, 只剩下了“9+2”轴丝和质膜(图 2f)。轴丝结构和裙边状质膜之间以及线粒体群的空隙中存在很多游离的颗粒状物质(图 2e、f)。

图 1 金乌贼精英结构

Fig.1 Structure of a *S. esculenta* spermatophore

a. 精英($\times 10$); b. 精英示意图; c. 弹射装置($\times 25$); d. 结合部($\times 25$); e. 精团($\times 25$); f. 弹射装置的前端(箭头示鞭毛) ($\times 32$); g. 弹射装置中段($\times 32$); h. 结合部和精团间的连接(箭头示连接部) ($\times 32$); i. 精团末端($\times 25$)。C、D、E 分别表示 c、d、e 在精英中的位置

2.3 金乌贼精子低温冷冻后的外部形态和超微结构(图 2g—l)

通过电镜对 - 80 °C 冷冻保存的金乌贼精英中的精子进行观察, 发现精子头部、中部和尾部细胞器的超微结构都发生不同程度的变化和损伤。

2.3.1 头部 通过扫描电镜发现, 冷冻后的精子的头部质膜变得粗糙、弯曲、出现很多的凹痕(图 2g)。经透射电镜观察, 顶体肿胀甚至脱落, 细胞核与核膜分离(图 2h, i), 与液膜之间的腔隙变大, 甚至分离, 质膜断裂(图 2j)。

2.3.2 中部 中段包含的线粒体和中心粒复合体也出现了线粒体的双层膜结构破坏, 外层膜缺失。线粒体基质密度降低, 脱落或解体(图 2k)。线粒体内膜上的嵴间隙变大, 线粒体之间的间隙扩大, 均呈现空泡状结构。

2.3.3 尾部 精子冷冻后, 尾部最明显的变化就是部分精子鞭毛无规则的缠绕, 扭曲。鞭毛基部和中间出现断裂, 甚至脱落(图 2l)。

3 讨论

不同种精子的超微结构上的差别, 可以作为确定不同种之间亲缘关系的工具, 也可以作为形态鉴定方法上的一部分(Healy, 1990)。这些差别主要体现在精子顶体、精核、轴丝等的结构, 线粒体的排列数目, 内含物等方面。

3.1 顶体形态

头足类顶体可以为笔直的, 平行于精子纵轴, 表面布有等距螺旋形突起(如 *O. vulgaris*); 也可以是不具亚结构的“球”状的, 与精子纵轴保持一定角度。金乌贼精子的顶体钝圆, 呈“囊”状, 具有“弓”亚顶体腔, 顶体腔内电子密度均匀, 含顶体泡和“棒”状和“板”状的结构,

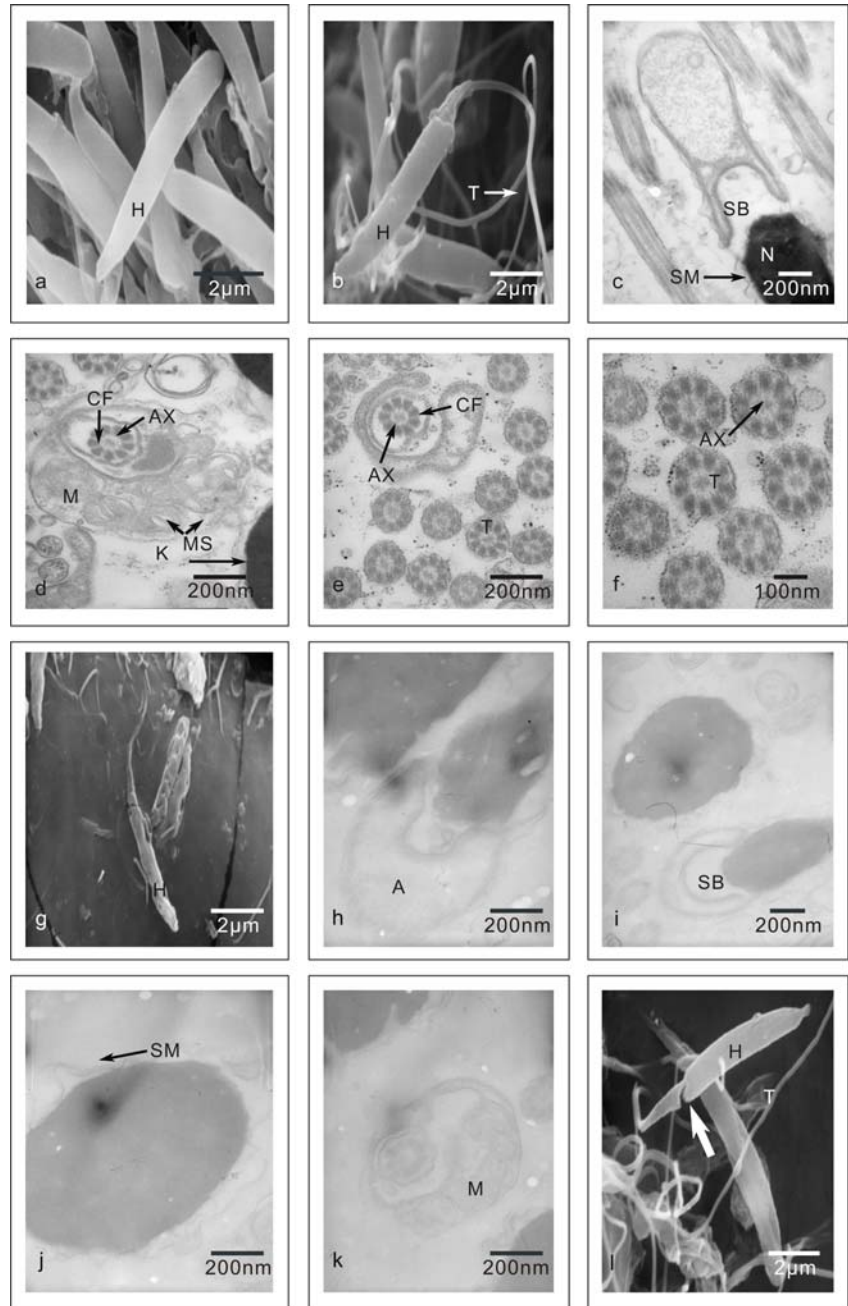


图 2 金乌贼精子超微结构及 - 80 °C 低温冷冻后的形态差别

Fig.2 Ultrastructures of *S. esculenta* spermatozoa before and after the storage at the low temperature of - 80 °C

a. 示精子鞭毛缠绕在一起, 以精团的方式存在; b. 单一的精子结构, 示单一精子外部形态; c. 示精子的“囊”状顶体和“弓”状的亚顶体腔, 细胞核及包被头部的裙边状质膜; d. 示尾基部线粒体和轴丝“9+2”结构; e. 示尾部轴丝并非位于中央, 尾部是不对称的结构, 相对厚的一侧聚集着线粒体; f. 示尾部的轴丝结构; g. 示冷冻后的精子头部质膜粗糙, 多坑洞; h. 示冷冻后的精子顶体膨大, 变形, 亚顶体腔增大; i. 示顶体部分脱落, 亚顶体腔增大; j. 示细胞核膜分离, 膜脱落; k. 尾部轴丝与线粒体群之间的空隙增大; l. 示冷冻后的尾部断裂, 脱落; 白色箭头表示断裂面。A, 顶体; AX, 轴丝; CF, 粗纤维; H, 头部; K, 核膜; M, 线粒体; MS, 线粒体距; N, 细胞核; SB, 亚顶体腔; SM, 裙边状质膜; T, 尾部; S, 精子

这些结构通常与精子纵轴保持一定角度(图 2c), 与 *Rossia pacifica*、*Sepiella maindroni* 等乌贼类较为相似 (Fields *et al*, 1976), 顶体内都具有大的泡状结构, 这些结构作为顶体腔内部的支持物(Healy, 1990), 而与八腕类精子差异显著, 如嘉庚蛸 *Octopus tankahkeei*、短蛸 *O. ocellatus*、*O. dofleini martini*、*Eledone cirrhosa*、*E. moschata* 等种类的精子顶体被拉长, 形成倒“V”形或长纺锤状, 而且顶体表面由一些电子不透明物质周期性的堆积形成垂直于精子纵轴的螺纹, 这些螺纹均为双层螺纹等距螺旋横纹(竺俊全等, 2006; Martin *et al*, 1970; Selmi, 1996; Yang *et al*, 2010¹⁾)。另外, 八腕类 *Bathypolypus bairdii*、*B. sponsalis* 精子的顶体和精核之间没有明显空间, 相连处顶体和精核横截面的直径相等(Roura *et al*, 2009)。可见, 头足类顶体等距螺旋横纹结构的有无(八腕类)、顶体腔泡状结构的有无(乌贼类)等可以作为物种目、科的分类依据。

3.2 精核形态

头足类动物精核的形成源于核外周微管和凝集染色质的相互作用(Mart í nez-Soler *et al*, 2007), 通常认为营体外受精的物种, 精子顶体钝圆, 细胞核较短, 线粒体围绕中心粒复合体形成中段。而体内受精的种类则顶体和精核均被拉长, 线粒体拉长形成线粒体鞘。前者为原生型精子, 后者为修饰型精子(Maxwell, 1983)。金乌贼的精核并非规则的长椭圆状, 属于原生型精子(图 2i)。嘉庚蛸、短蛸的精核明显细长(竺俊全等, 2006; Yang *et al*, 2010¹⁾), 这一点与体内受精的机制相符合。双壳类的贻贝为体外受精, 精核宽而扁, 为“桶”状。顶体长度较小, 为“锥”状(Gladyshev *et al*, 2002), 腹足类 *Pontohedyle milaschewitchii* 精核明显被拉长, 核前端呈现“钻头”状, 核表面有很多的螺旋状突起, 精核从基部到前端直径逐渐较小(Jörger *et al*, 2009)。精核长度的差异与受精机制有一定关系, 也可作为物种鉴定的依据之一。精核结构与其生理功能是相适应的, 如表面的螺旋状突起能增强精子的运动能力, “钻头”状的前端能够帮助精子更有效的通过雌性身体上的孔道, 是对栖息地, 迫于受精压力而产生的一种进化适应(Jörger *et al*, 2009)。

头足类精核形态主要分“弯”核和“直”核两种,

其差异既可作为物种鉴别的依据, 又可研究物种间的进化关系。乌贼和枪乌贼类的精核主要是“弯”核, 八腕类为“直”核, 一般认为“直”核是由“弯”核发展而来的(Healy, 1990)。幽灵蛸 *Vampyroteuthis infernalis* 隶属幽灵蛸目, 其精核是“直”核, 首尾两端均为“钻头”状, 但是其顶体腔呈现金乌贼一样的“囊”状, 被认为是介于十腕类与八腕类之间的过渡类型, 但形态上更接近于八腕类(Healy, 1989)。

3.3 线粒体数目和排列形态

线粒体作为精子运动的供能细胞器, 其大小和数量与精子的运动、穿透能力息息相关。线粒体与垂直的一对中心粒构成了精子中部。金乌贼精子中部切片上既发现了部分精核, 又可看见 9 条清晰的粗纤维, 部分线粒体可能嵌入精核的凹入部分(图 2d), 线粒体在中部多层分布, 大小不等, 数目大约为 9—12 个, 较大的线粒体直径可达 0.35 μm (图 2d)。*B. bairdii*、*B. sponsalis* 的精子中部发现了线粒体鞘, 具有 9 个“豆”形线粒体, 这些线粒体形成的线粒体鞘平行于粗纤维延伸的方向(Roura *et al*, 2009)。短蛸线粒体数目多集中在 9—10 个(Yang *et al*, 2010¹⁾)。幽灵蛸有 3—4 个线粒体, 均发现一种围绕精子鞭毛的线粒体“套筒”, 这种结构未被证实对精子形成有实际作用(Healy, 1989)。金乌贼精子中未发现上述的结构, 线粒体在鞭毛上的分布并不均匀, 主要分布在粗纤维一侧较厚的区域, 形成线粒体团。而双壳类和腹足类的线粒体数目多集中在 3—6 个(焦海峰等, 2002; Johnson *et al*, 1996)。

精子内部线粒体数目和排列方式与受精方式、物种进化程度有一定相关性(Ribes *et al*, 2002)。头足类中, 线粒体排列方式和数目与精子的运动能力、受精机制之间的相关性等尚需深入研究。

3.4 内含物

金乌贼精子的顶体腔、亚顶体腔、裙边状质膜和细胞器之间存在很多内含物。这些内含物在营养、顶体反应、受精等生理方面起着重要的作用。十腕类顶体腔中存在的很多“棒”状和“盘”状结构(Olson *et al*, 1980)。金乌贼的顶体腔中也发现了上述的结构, 还发现了顶体泡(图 2c), 这些结构可能对顶体系统有一定支撑作用。在尾部的裙边状质膜和轴丝之间还存在一些糖原颗粒, 对精子尾部的摆动提供营养(Anderson

1) Yang J M, Wang W J, Zheng X D *et al*, 2010. The ultrastructure of the spermatozoon of *Octopus ocellatus* Gray, 1849 (Cephalopoda: Octopoda). Chinese Journal of Oceanology and Limnology (in print)

et al, 1970; 叶素兰等, 2009)。

Ribes 等(2002)认为自然选择在影响 *Eledone* 和 *Octopus* 的成熟精子的形态时, 在细胞内含物的低水平上同时也在发生着转变。在对哺乳动物的精子发生过程的研究中, 发现伴随着精子的发生过程, 一种原生质小体一直在移动, 从精子的颈部移动到精子尾部中段稍后的位置。原生质小体可能是一种淀粉颗粒, 通过代谢为精子活动提供能量。这些原生质小体位于精子颈部的时候, 精子的游动和受精能力均较差。也就是说这些原生质小体移动到精子中段稍后的位置时, 精子才算成熟(Bloom et al, 1961)。

这些内含物保证了精子有完整的形态结构、极强的运动能力和受精能力。精子超微结构中内含物的种类和功能尚未明确。

3.5 冷冻损伤机理和冷冻保存方法

经 - 80 °C 冷冻保存的金乌贼精子外层质膜具多空洞, 甚至尾部的质膜和轴丝均断裂, 整体粗糙不光滑。顶体内容物流出, 细胞核膜分离, 线粒体内部双层膜结构遭到破坏(图 2g—l), 上述现象证实了低温冷冻对精子超微结构的损伤集中在膜损伤。饱满的精英和精子中充斥着组织液, 可能对于精子间的粘连, 物质间的传递和运输起着重要的作用。胞内外冰晶, 进而造成对膜的机械损伤。大而稳定的胞内冰晶造成膜的机械损伤。冷冻脱水导致胞内物质浓缩, pH 值、酶活性变化引起膜的自身消化, 电荷和离子强度的变化等, 导致局部结构的破裂, 造成一系列局部损伤, 细胞膜首当其冲(邓道贵等, 2001)。

由于我国对乌贼等头足类资源修复的迫切需要, 规模化养殖成为可能, 安全有效的精子保存技术对生产养殖尤为重要。甲壳类精子冷冻保存最常采用的方式是投放冷冻剂, 如脯氨酸、果糖、海藻糖和乙烯甘油等(管卫兵等, 2002; 柯亚夫等, 1996), 利用两种或者两种以上的抗冻剂可以明显提高精子的存活率(Jeyalectumie, 1989)。未添加防冻剂情况下, 低温直接保存金乌贼精英会使精子超微结构遭受不可逆的损失。超低温条件下, 直接保存性成熟雄体或精英释放出的精团以及添加冷冻剂等方面的可行性研究亟需开展。

致谢 中国水产科学研究院黄海水产研究所陈四清研究员在采集样品过程中给予了大力协助, 电镜样品的制备和观察得到青岛大学医学院谭金山高级工程师的指导和帮助, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王卫军, 杨建敏, 刘志鸿等, 2009. 异源精子诱导栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 雌核发育二倍体早期胚胎的细胞学研究及 GISH 鉴定. 海洋与湖沼, 40(3): 325—329
- 邓道贵, 谈奇坤, 2001. 褶纹冠蚌精子的超微结构研究. 水生生物学报, 25(5): 481—485
- 齐钟彦, 1998. 中国经济软体动物. 北京: 农业出版社, 284—303
- 周维武, 郑小东, 宋宗岩等, 2006. 金乌贼产卵规律及室内人工孵化培育方法探索与研究. 渔业现代化, (3): 36—38
- 柯才焕, 周时强, 田越等, 2003. 三种鲍精子超微结构的比较. 海洋学报, 25(3): 138—142
- 柯亚夫, 蔡难儿, 1996. 中国对虾精子超低温保存的研究. 海洋与湖沼, 27(2): 187—193
- 侯林, 高岩, 邹向阳等, 2006. 香螺精子发生及精子超微结构. 动物学报, 52(6): 746—754
- 董正之, 1988. 中国动物志——头足纲. 北京: 科学出版社, 111—114
- 焦海峰, 尤仲杰, 竺俊全, 2002. 软体动物精子的超微结构及其分类学意义. 宁波大学学报, 17(4): 414—418
- 管卫兵, 王桂忠, 李少菁等, 2002. 锯缘青蟹精子低温冷藏及精子活力的染色法评价. 台湾海峡, 21(4): 457—463
- Anderson W A, Personne P, 1970. The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. J Cell Biol, 44: 42—51
- Bloom G, Nicander L, 1961. On the ultrastructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa. Cell Tissue Res, 55: 833—844
- Enric R, Pepita G B, Maria J Z et al, 2002. Evolution of Octopoda Sperm II: comparison of acrosomal morphogenesis in *Eledone* and *Octopus*. Mol Reprod Dev, 62: 363—367
- Fields W G, Thompson K A, 1976. Ultrastructure and functional morphology of spermatozoa of *Rossia pacifica* (Cephalopoda, Decapoda). Can J Zool, 54: 908—932
- Gladyshev E A, Drozdov A L, 2002. Sperm ultrastructure of two mollusk species *Geukensia demissa* and *Modiolus modiolus* (Mytilidae, Bivalvia). Russ J Mar Biol, 28(6): 422—426
- Healy J M, 1989. Spermatozoa of the deep-sea cephalopod *Vampyroteuthis infernalis* chun: ultrastructure and possible phylogenetic significance. Phil Trans R Soc Lond B, 323: 589—600
- Healy J M, 1990. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in *Spirula spirula* (L.): systematic importance and comparison with other cephalopods. Helgoland Mar Res, 44: 109—123
- Jeyalectumie C, 1989. Subramoniam cryopreservation of sperm atmospheres and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. Biol Bull, 177: 347—253
- Johnson M J, Casse N, Pennee M L, 1996. Spermatogenesis in the endosymbiont-bearing bivalve *Loripes lucinalis* (Veneroidea: Lucinidae). Mol Reprod Dev, 45(4): 476—484
- Jörger K M, He M, Neusser T P et al, 2009. Sex in the beach: spermatophores, dermal insemination and 3D sperm ultra-

- structure of the aphyllid mesopsammic *Pontohedyle milaschewitchii* (Acochlidia, Opisthobranchia, Gastropoda). *Mar Biol*, 156: 1159—1170
- Mart í nez-Soler F, Kurtz K, Chiva M, 2007. Sperm nucleomorphogenesis in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Tissue and Cell*, 39: 99—108
- Martin A W, Jun, Thiersch J B *et al*, 1970. Spermatozoa of the giant octopus of the north pacific *Octopus dofleini martini*. *Proc Roy Soc Lond B*, 175: 63—68
- Maxwell W L, 1983. Spermatogenesis and sperm function (Mollusca). In: Adiyodi K G, Adiyodi R G ed. *Reproductive biology of invertebrates*. New York, John Wiley and Sons, 2: 275—319
- Olson G E, Linck R W, 1980. Membrane differentiations in spermatozoa of the squid, *Loligo pealeii*. *Gamete Res*, 3: 329—342
- Ribes E, Bonafe P G, Zamora M *et al*, 2002. Evolution of octopod sperm II: comparison of acrosomal morphogenesis in *Eledone* and *Octopus*. *Mol Reprod Dev*, 62: 363—367
- Roura A, Guerra A, Gonzalez A F *et al*, 2009. Sperm ultrastructure in *Bathypolypus bairdii* and *B. sponsalis* (Cephalopoda: Octopoda). *J Mor*, 1: 1—9
- Selmi M G, 1996. Spermatozoa of two *Eledone* species (Cephalopoda, Octopoda). *Tissue and Cell*, 28(5): 613—620
- Zheng X D, Ikeda M, Kong L F *et al*, 2009. Genetic diversity and population structure of the golden cuttlefish, *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae) indicated by microsatellite DNA variations. *Mar Ecol*, 30(4): 448—454

ULTRASTRUCTURE OF *SEPIA ESCULENTA* (CEPHALOPODA: SEPIIDA) SPERMATOZOEA AND ITS DAMAGE BY LOW TEMPERATURE

HAN Song, ZHENG Xiao-Dong, LI Qi, YU Rui-Hai

(The Key Laboratory of Mariculture of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Electron microscopy was used to study the morphologies and ultrastructures of the spermatozoa of golden cuttlefish *Sepia esculenta* before and after low temperature treatment. The flagellum-like sperm of *S. esculenta*, covered by a smooth membrane, consisted of a head, a middle piece and a tail. The head comprised a bubble-shaped acrosome and an ellipse nucleus, with the acrosome located in the front of the nucleus. The middle piece contained many mitochondria and vertical central granules. The mitochondria were uneven in size and overlappingly arrayed. The tail was long and thin, with the typical “9+2” structure. After the storage at the low temperature of -80°C , there were many holes on the membrane of the head of spermatozoa. The acrosome was fractured, losing its inclusion. Karyotheca was separated from the nucleolus. Mitochondria dropped off, and the inside membrane became deformed. Sperm tails were intertwined together; and some flagella were broken and cast off.

Key words *Sepia esculenta*, Spermatozoon, Ultrastructure