

青斑蝶雄成虫内生殖器官的形态与发育

刘微芬, 廖怀建*, 刘宏屏*, 石雷, 杜婷, 周成理, 邓疆

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 昆明 云南 650224; 2. 云南森林自然中心)

摘要: [目的] 研究雄青斑蝶内生殖器官的形态与发育, 可以为青斑蝶的人工繁殖提供理论指导。[方法] 采用生殖系统解剖的方法, 观察了1~12日龄青斑蝶雄成虫内生殖器官的结构组成, 测定了内生殖器官的数值特征参数, 并根据内生殖器官各组成部分的特征对雄性内生殖器官的发育进行了分级, 以期系统了解青斑蝶雄成虫内生殖器官的形态与发育。[结果] 1) 雄性青斑蝶的内生殖器官包括1个精巢、2个贮精囊、1对输精管、1对复射精管、1条单射精管和附腺; 2) 复射精管的直径和单射精管的长度都随日龄的增大而增大; 3) 随着成虫日龄的增加, 精巢中精子束的长度持续变长, 贮精囊中的精子束长度在7日龄前快速变长且之后长度趋于稳定; 4) 随着日龄的增长, 雄蝶精巢中精子束的数量逐渐减少, 贮精囊中的精子束数量在1~7日龄时逐渐增加, 之后维持稳定; 复射精管中精子束数量则随着日龄的增长而逐渐增多; 5) 根据贮精囊和复射精管的发育特征, 雄虫的内生殖器官的发育可分为: 乳白透明期、精子束输送生长期、精子束大量输送成熟期、精子束补充期。[结论] 雄青斑蝶内生殖器官的结构组成与其他蝴蝶相同; 精子束在成虫6日龄时发育成熟, 并依次释放至贮精囊、复射精管中; 青斑蝶雄性内生殖器官的发育可划分为四个发育阶段。

关键词: 青斑蝶; 精巢; 精子发生; 发育分级

中图分类号: S763.42

文献标识码: A

Morphology and Development of Reproductive System of Male Adult *Tirumala limniace* (Cramer)

LIU Wei-fen, LIAO Huai-jian, LIU Hong-ping, SHI Lei, DU Ting, ZHOU Cheng-li, DENG Jiang

(1. Research Institute of Resources Insects of the Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Resource Insects, State Forestry Administration, Kunming 650224, China; 2. Yunnan Forest Nature Center, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] To study the morphology and development of internal reproductive organs of *Tirumala limniace* so that to provide theoretical guidance for the artificial breeding of *T. limniace*. [Methods] By anatomy method, the morphologies of internal reproductive organs of male *T. limniace* with ages from one-to twelve-day-old were observed, in the meanwhile, the numerical characteristic parameters were measured, and the development of internal reproductive organs was graded according to the characteristics of each organ so as to understand the morphologies and development of internal reproductive organs of male *T. limniace* systematically. [Results] (1) The internal reproductive organs of male *T. limniace* contain one testis, two vesicula seminalis, a pair of vas deferens, a pair of ejaculatory duct duplex, an ejaculatory duct simplex and accessory gland. (2) With the increase of age, the diameter of ejaculatory duct duplex and the length of ejaculatory duct simplex increased. (3) The length of sperm bundles in testis sustainable increased with the age increased, the length of sperm bundles in vesicula seminalis increased constantly before 7-day-old and tended to stability then. (4) With age increasing, the number of sperm bundles in

收稿日期: 2016-06-17

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费(201504305); 云南省技术创新人才培养计划(2012HB054).

作者简介: 刘微芬(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事蝴蝶行为生理生态学研究.

* 通讯作者: 廖怀建, 刘宏屏.

testis decreased gradually, that in vesicula seminalis increased gradually from 1-to 7-day-old and maintained stability after 7 days, and that in ejaculatory duct duplex increased gradually. (5) The development of internal reproductive organs of male *T. limniace* could be divided into 4 grades, i. e. milky and translucent stage, transporting and growing of sperm bundle stage, mass transporting and maturing of sperm bundles stage, and replenishing of sperm bundle stage, based on the developmental characteristics of vesicula seminalis and ejaculatory duct duplex. [Conclusion] The internal reproductive organs of male *T. limniace* were the same as that of other butterflies; the sperms matured at 6-day-old, and were released to vesicula seminalis and ejaculatory duct duplex in turn, then joined in fertilization. In this study, the developmental process of the internal reproductive organs of male *T. limniace* was divided into 4 grades for the first time.

Keywords: *Tirumala limniace*(Cramer); testis; spermatogenesis; development grading

目前有关鳞翅目昆虫的内生殖器官的结构和发育研究得比较深入。对于蛾类,雌性内生殖器官已经有相关的结构分析、卵巢发育分级以及迁飞型害虫居留与迁飞种群判别方面的研究^[1]。而对于雄蛾,大多数均停留在内生殖器官的结构组成分析上^[2-3]。对于蝶类,雄性内生殖系统的发育分级研究较少,研究主要聚焦于内生殖器官的结构组成^[4-5]。另外,除鳞翅目昆虫外,半翅目、双翅目和鞘翅目昆虫的内生殖器官结构与发育的相关研究也较多^[6]。

对鳞翅目雄性昆虫的研究也聚焦于精子发育与转移,包括多态性、形态、分布和转移等^[4, 7-12]。蛾类和蝶类雄性均能产生有核和无核两种形态的精子^[13-14],有核精子包含父本遗传物质,参与授精;无核精子不参与授精,为有核精子束发育与转移提供必要的能量。无核精子以分散的精子形式从精巢通过基膜转移到输精管中,有核精子则以精子束的形式转移到雌性的受精囊中,在受精囊内有核精子束继续成熟和分离^[12]。

青斑蝶(*Tirumala limniace*(Cramer))属于鳞翅目(Lepidoptera)斑蝶科(Danaidae),翅面深棕色,有若干半透明天青色色斑,成虫大中型。雌雄同型,雄蝶后翅反面Cu₂室中部有一个突出成耳状的香鳞袋,在翅正面呈现为一小块灰黑色印记;青斑蝶具有较高的观赏价值和经济价值^[15],因此常被用于节庆放飞、工艺品制作和观赏旅游的优秀品种^[16]。青斑蝶等蝴蝶的规模化养殖成为农民增加经济收入的一种有效方式,不过,目前还未有雄青斑蝶内生殖器官相关研究。因此,系统研究青斑蝶雄性内生殖器官,可以为青斑蝶的人工繁殖提供理论指导。本文通过解剖1~12日龄的青斑蝶雄成虫,并分别观察和测量了雄蝶内生殖器官形态和组成结构大小,同时根

据各组成结构形态学特征和尺寸大小对雄蝶内生殖器官的发育进行了分级。

1 材料与方法

1.1 虫源准备

青斑蝶蛹购于昆明中林观赏昆虫科技开发有限公司,蝴蝶羽化后在实验室饲养(温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度70%~80%,光周期L:D=14:10)。将蛹悬挂于固定在圆柱形罩网(高:65 cm,直径:50 cm)顶部毛巾上羽化,以方便其羽化后展翅。羽化后,将雄成虫挑出饲养在正方体养虫笼(50 cm×50 cm×50 cm)内,每天用15%的洋槐蜂蜜喂两次。1~12日龄雄成虫作为供试虫源。

1.2 内生殖器官解剖方法

上午9:30将成虫浸泡于40%乙醇中,使成虫晕厥后,置于0℃蒸馏水中备用。解剖时利用昆虫解剖针将蝴蝶固定于自制的圆形蜡盘(直径:15 cm)中,然后倒入0.7%的生理盐水直至完全没过成虫腹部。将固定有成虫的蜡盘置于体视显微镜(Leica MZ16A, Leica有限公司,德国)的载物台上,在10×目镜和1×物镜下进行解剖。雄成虫8日龄前,每日龄解剖了10~15头;8日龄后由于成虫数量减少,每日龄解剖了6~8头。

1.3 雄蝶内生殖器官图片采集

将雌雄成虫内生殖器官置于超景深三维显微镜(VHX-1000,KEYENCE,日本)载物台下进行拍照采集图片。由于青斑蝶雌雄成虫内生殖器官较大,所以采集到的是内生殖器官的不同组成结构的局部图片。利用显微镜的实时2D图像合成功能,在放大20倍的情况下,将局部图片合成为内生殖器官的完整图片。然后,利用显微镜自带的XY测量系统,在合成的内生殖器官完整图片上测量各结构的物理

参数。

1.4 雄蝶内生生殖器官特征参数测定

在本研究中,测量了雄蝶内生生殖器官复射精管中部直径、单射精管长度,实验过程中舍弃器官结构破损的雄蝶。测量复射精管直径和单射精管长度的成虫数为3~11头。

1.5 雄蝶精巢、贮精囊、复射精管与单射精管内精子束计数及长度测量

参照 Liao 等^[17]的方法,对精巢、贮精囊和复射精管中的精子进行染色并制成玻片。将晾干后的玻片置于 VHX-1000 超景深三维显微镜 50×目镜下,采集局部图片、合成完整图片,再对完整图片上的精子束进行计数。由于精巢中精子束数量较多,故将精巢精子束涂片平均分成8份,统计其中1份中的精子束数量,然后乘以8,作为精巢中精子束总数量。贮精囊与复射精管精子束涂片则分成4份,进行计数。不同器官中精子束数量统计的成虫样本数为3~12头;测量不同日龄精巢内精子束长度的样本数为24~61,测量3~12日龄贮精囊和复射精管中精子束长度时的样本数为8~48。

1.6 数据分析

复射精管直径、单射精管长度及精巢、贮精囊、复射精管中精子束的数目和长度随日龄的变化用非线性回归进行分析,数据拟合在 MATLAB 2016a 中进行,每个参数的拟合模型见表1。

表1 针对雄蝶内生生殖器官及其内生生殖器官中精子束的数量和长度的非线性回归分析

参数	非线性回归模型
复射精管直径	$y = ae^{bx} + c$
单射精管长度	$y = a + b \ln x$
精巢中精子束数量	$y = \frac{b}{ae^{x+c}}$
贮精囊中精子束数量	$y = \frac{1}{a + be^{-x}}$
复射精管中精子束数量	$y = \frac{1}{a + be^{-x}}$
精巢中精子束长度	$y = ax^3 + bx^2 + cx + d$
贮精囊中精子束长度	$y = ax^3 + bx^2 + cx + d$
复射精管中精子束长度	$y = ax^3 + bx^2 + cx + d$

2 结果分析

2.1 雄性内生生殖器官

雄性青斑蝶的内生殖器官由1个精巢、2个贮精囊、1对输精管、1对复射精管、1条单射精管和附

腺组成,如图1示。精巢由2个睾丸融合而成,在其腹面与交叉呈S型的贮精囊相连接,贮精囊与复射精管通过1对输精管相连接;连接点右侧1对较细的是附腺的汇入处;1对复射精管向下合并成1条单射精管,其末端开口于阴茎。

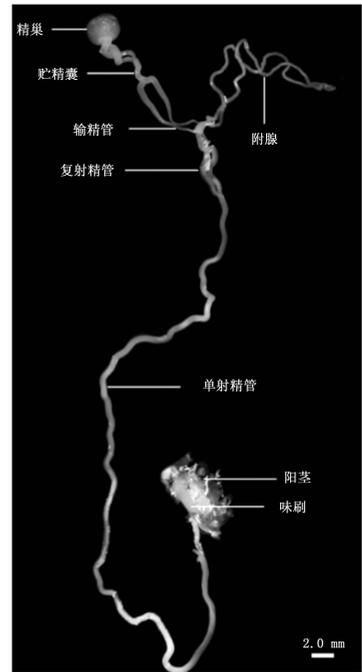


图1 雄性青斑蝶的内生殖器官

2.2 1~12日龄雄青斑蝶复射精管与单射精管大小

1~12日龄雄青斑蝶复射精管的直径和单射精管的长度分别见图3、图4,随日龄的变化关系的拟合结果分别为 $y = 0.08744e^{0.1399x} + 0.3298$ ($R^2 = 0.9455$)、 $y = 49.94 + 18.71 \ln x$ ($R^2 = 0.9133$)。复射精管的直径和单射精管的长度都随日龄的增大而增大,但其变化速率有所不同,复射精管直径的增大速率为先慢后快表现为1~3日龄的增长速度小于4~7日龄间,8~10日龄间的增长速度又大于3~7日龄间,11~12日龄间的增长速度最大;而单射精管长度的增大速率恰恰相反,为先快后慢,增长速度由大到小排列为1~2日龄间、3~6日龄间、7~10日龄间、11~12日龄间。

2.3 1~12日龄雄青斑蝶成虫精子释放

雄青斑蝶的精巢、贮精囊与复射精管内的精子束长度随日龄的变化关系符合多项式模型(图4),拟合结果分别为 $y = 0.0001433x^3 - 0.0001272x^2 + 0.007587x + 1.262$, $y = 0.001737x^3 - 0.04668x^2 + 0.4204x - 0.1701$, $y = 0.001113x^3 - 0.03005x^2$

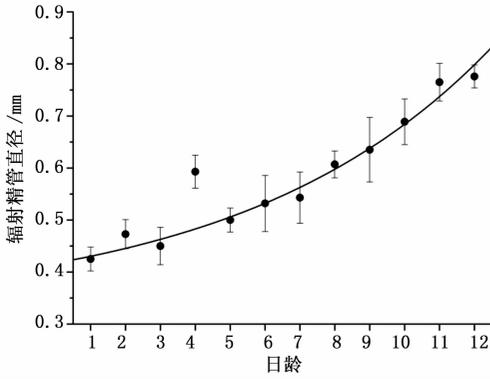


图2 1~12日龄雄青斑蝶复射精管的直径

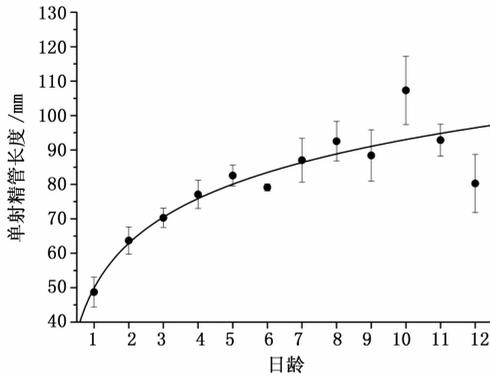


图3 1~12日龄雄青斑蝶单射精管的长度

+0.273 6x+0.279 2, 拟合度分别为 $R^2 = 0.729 2$, $R^2 = 0.618 5$, $R^2 = 0.644 1$ 。三个器官中精子束的长度均呈现增长的趋势,其中,精巢中精子束的长度在5日龄前增长较慢、趋于平稳,5日龄后增长速度加快;贮精囊、复射精管中精子束的长度均在3~7日龄间快速增长,8~10日龄趋于平稳,11~12日龄时又有缓慢增长的趋势。在1和2日龄时,雄青斑蝶的贮精囊与复射精管中均未发现有精子束存在,说明此时精子还未从精巢释放出。

对精巢、贮精囊、复射精管中精子束数量随日龄变化用非线性回归进行拟合,拟合结果分别为 $y = 166.9e^{\frac{2.43}{x+3.328}}$, $y = \frac{1}{0.01637+3.885e^{-x}}$, $y = \frac{1}{0.001893+2.543e^{-x}}$, 拟合度分别为 $R^2 = 0.9546$, $R^2 = 0.9723$, $R^2 = 0.9678$, 见图5。精巢中精子束的数量随着日龄的增大而减少,精子束数量最多为 2932.80 ± 233.70 条,到12日龄时为最低 (1992.00 ± 166.97 条);数量减少的速率先快后慢,8日龄为转折点。贮精囊和复射精管中精子束数量随日龄的变化关系呈“S”型,1~2日龄精子束为零,然后缓慢增大,数量增大的速率在4~8日龄为最快,8日

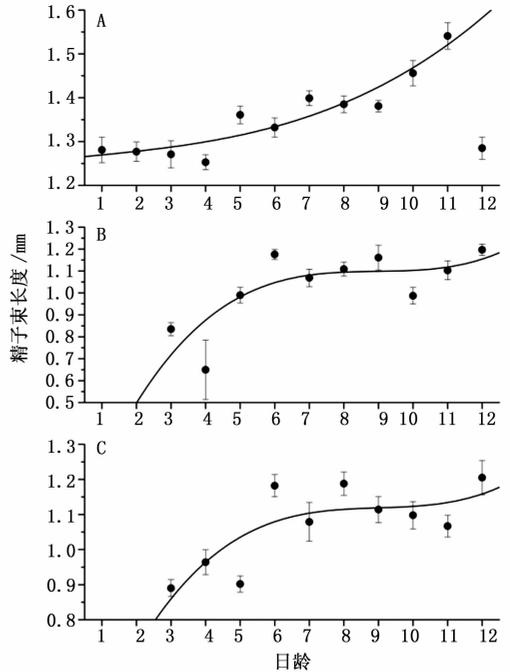


图4 1~12日龄雄青斑蝶的精巢(A)、贮精囊(B)和复射精管(C)中精子束的长度随日龄的变化

龄后趋于平稳,这也与精巢中精子束随日龄变化关系的拟合结果一致。

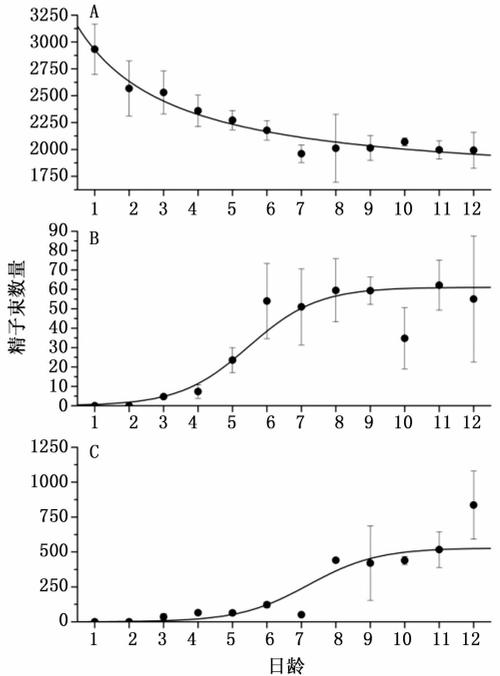


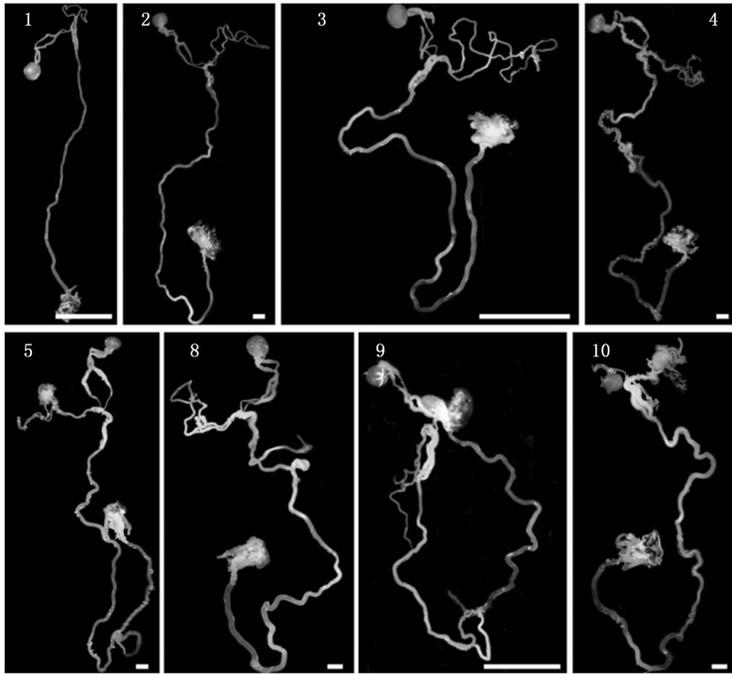
图5 1~12日龄青斑蝶雄蝶的精巢(A)、贮精囊(B)和复射精管(C)中精子束的数量随日龄的变化

2.4 雄青斑蝶内生生殖器官发育分级

雄青斑蝶内生生殖器官随着日龄的发育形态如图6所示。通过对雄蝶1~12日龄内生生殖器官解剖及

贮精囊和复射精管的发育分析,我们根据其发育特征,将雄性生殖系统的发育分成4个等级。I级,乳白透明期(1~2日),贮精囊中没有或者刚开始出现丝状乳白色精液,复射精管中无精液存在,其直径在0.425~0.8 mm,精巢呈淡红色。脂肪细胞饱满,乳白色,圆形或长圆形;II级,精子束输送生长期(3~7日),复射精管中开始有精液且逐渐增多,呈现乳白色,其直径在0.5~0.6 mm,附腺中慢慢出现并积累白色分泌物,精巢颜色慢慢加深呈鲜红色。复射精管中精子束数目在 35 ± 23 至 122 ± 21 条之间。脂肪细胞饱满,乳白色,圆形或长圆形;III级(精

子束大量输送成熟期,8~10日),复射精管中充满乳白色精液,且很容易因为破损外溢,其直径在0.6~0.7 mm之间,各生殖器官饱满而充满光泽。复射精管中精子束数目在 426 ± 26 至 594 ± 350 条之间。脂肪细胞颜色稍加深,变瘪,部分呈丝状。IV级,精子束补充期(11~12日):复射精管中充满精液,但很容易因为复射精管壁破损而产生精液外漏,其直径在0.7~0.8 mm之间,部分精子束变成熟,输精管韧性变低易断,复射精管中精子束的数目在 471 ± 140 至 836 ± 245 条之间。脂肪细胞呈淡黄色,丝状增多。



注:不同数字表示日龄,比例尺:2.0 mm

图6 不同日龄青斑蝶雄蝶内生生殖器官的结构

3 讨论

昆虫雄性生殖系统主要有1对精巢以及悬浮在腹腔内的导管和脂肪体组成^[18],而部分鳞翅目从幼虫向蛹变态发育的过程中,2个精巢融合成了1个精巢^[19]。雄青斑蝶内生生殖器官包括1个精巢、2个贮精囊、2条与贮精囊相连接的输精管、1对复射精管、1条与复射精管连接的单射精管以及1对附腺组成,这与雄橙黄豆粉蝶的内生殖器官组成一样^[5],但是比 *E. hegesia* 雄蝶的内生殖器官组成多出1对复射精管^[4]。鳞翅目昆虫精巢一般具有4种类型:A,睾丸完全分离,每个睾丸具有4叶,例如 *Hepialus* 属;B,睾丸完全分离,但是每个睾丸都是圆球的、具

有3叶,例如 *Saturnia* 属;C,两个睾丸被一个阴囊包在了一起,例如 *Lycaena* 属;D,两个睾丸被阴囊包在一起,并且结合的很紧密以至于看起来像一个圆球状的器官,例如 *Pieris* 属^[20]。雄青斑蝶的两个睾丸融合到一起,被阴囊包住,呈圆球状,故属于D类。

本研究对复射精管和单射精管生长进行了测定,结果表明成虫羽化后,复射精管与单射精管开始生长,同时伴有精子的释放,精子源源不断释放至复射精管中,因此复射精管在1~12日龄时一直呈现出增大的趋势。由于一直未能交配,因此,释放出来的精子束贮藏在贮精囊和复射精管中。研究认为,昆虫精子在发育成精子束后,开始由精巢释放到贮精囊,然后释放至射精管,参与交配射精^[21-24]。对

于雄青斑蝶,精巢中精子束,随着日龄增长,长度不断变长,表明精子束在精巢中随着日龄而不断成熟;在发育成熟过程中,开始有部分精子束释放至贮精囊与复射精管中,此时精巢中精子束数量随着日龄增长不断减少。

对于多数昆虫而言,雄性常常与多个雌性交配^[25]。对寄生蜂的研究发现,随着其交配次数增加,交配时能提供给雌性的精子数量趋于减少甚至在有些情况下根本没有精子提供给雌虫^[26-27],且 Damien 等(2006)报道精子耗尽的雄性广赤眼蜂 *Trichogramma evanescens*(Westwood)并不会阻止雌虫与其他雄虫交配,但是会减少雌虫从其他雄虫获得储存精子的能力^[28]。根据对雄蝶生殖器官中精子束的统计也发现雄成虫刚羽化时精子束数量最多,推测其随着交配次数的增加体内的精子束数量将逐渐减少。所以为了提高雌成虫的产卵量应该保证与之交配的雄成虫体内有足够数量的精子提供。本研究得出,雄成虫在6~10日龄时,精子不仅数量最多且达到最佳成熟度,若此时与雌蝶进行交配,在提高交配成功率的同时提高雌蝶产卵量,从而保证市场蝴蝶供应量。

4 结论

雄青斑蝶的内生殖器官由1个精巢、2个贮精囊、1对输精管、1对复射精管、1条单射精管和附腺组成。对不同日龄生殖器官大小测定发现:复射精管的直径和单射精管的长度随着日龄的增大显著增大;随着成虫日龄的增加,精巢、贮精囊、复射精管中精子束的长度随着日龄的变化显著变长;雄蝶精巢中精子束的数量随着日龄的增大显著减少;贮精囊和复射精管中精子束数量随日龄的变化关系呈“S”型,1~2日龄精子束为零,然后缓慢增大,数量增大的速率在4~8日龄为最快,8日龄后趋于平稳。本研究根据雄青斑蝶复射精管直径和特征、复射精管中的精子束数量、脂肪细胞的特点,将雄青斑蝶发育分为4个等级,即乳白透明期、精子束输送期、精子束大量输送成熟期和精子束补充期,这是首次将雄性昆虫的发育进行分级。

参考文献:

[1] Fu X W, Li C, Feng H Q, et al. Seasonal migration of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Crambidae) over the Bohai Sea in northern China[J]. Bulletin of Entomological Research, 2014, 104(5): 601-609.

[2] Justus K A, Mitchell B K. Reproductive morphology, copulation, and inter-population variation in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)[J]. International Journal of Insect Morphology and Embryology, 1999, 28(3): 233-246.

[3] Alves L, Mancini K, Lino-Neto J, et al. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae)[J]. Acta Zoologica, 2006, 87(2): 131-139.

[4] Mancini K, Dolder H. Sperm morphology and arrangement along the male reproductive tract of the butterfly *Euptoieta hegesia* (Insecta: Lepidoptera)[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2003, 44(2-3): 107-117.

[5] 孟银凤, 尚素琴, 张雅林. 橙黄豆粉蝶生殖系统形态学研究[J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(3): 813-817.

[6] Jahnke S M, Redaelli L R, Diefenbach L M G. Internal reproductive organs of *Cosmoclopius nigroannulatus* (Hemiptera: Reduviidae)[J]. Brazilian Journal of Biology, 2006, 66(2A): 509-512.

[7] Presgraves D C. Sperm heteromorphism and precedence in the stalk-eyed fly, *Cyrtodiopsis whitei*[D]. University of Maryland, 1997.

[8] Katsuno S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae): I. The intratesticular behaviour of the spermatozoa at various stages from the 5th instar to the adult[J]. Applied Entomology and Zoology, 1977, 12(2): 142-153.

[9] Morrow E H, Gage M J G. The evolution of sperm length in moths[J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2000, 267(1440): 307-313.

[10] Osanai M, Chen P S. A comparative study on the arginine degradation cascade for sperm maturation of *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*[J]. Amino Acids, 1993, 5(3): 341-350.

[11] Osanai M, Kasuga H, Aigaki T. Isolations of eupyrene sperm bundles and apyrene spermatozoa from seminal fluid of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Journal of Insect Physiology, 1989, 35(5): 401-408.

[12] Swallow J G, Wilkinson G S. The long and short of sperm polymorphisms in insects[J]. Biological Reviews, 2002, 77(2): 153-182.

[13] Friedländer M. Control of the eupyrene-apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera[J]. Journal of Insect Physiology, 1997, 43(12): 1085-1092.

[14] Silberglied R E, Shepherd J G, Dickinson J L. Eunuchs: The role of apyrene sperm in Lepidoptera? [J]. The American Naturalist, 1984, 123(2): 255-265.

[15] 周尧. 中国蝶类志[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1999.

[16] 陈晓鸣, 周成理, 史军义, 等. 中国观赏蝴蝶[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008.

[17] Liao H J, Qian Q, Liu X D. Heat shock suppresses mating and sperm transfer in the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis*[J]. Bulletin of Entomological Research, 2014, 104(3): 383-392.

[18] O'woma. O O, Chigozirim. U P, Emmanuel O, et al. Reproductive and survival strategies utilized by insect. A Review[J]. Amer-

- ican Journal of Zoological Research, 2016, 4(1): 1-6.
- [19] 刘琳, 冯启理. 鳞翅目昆虫精巢融合的研究[J]. 华南师范大学学报:自然科学版, 2014, 46(5): 1-7.
- [20] Callahan P S. Serial morphology as a technique for determination of reproductive patterns in the corn earworm, *Heliothis Zea* (Boddie) [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1958, 51(5): 413-428.
- [21] Giebultowicz J M, Weyda F, Erbe E F, et al. Circadian rhythm of sperm release in the gypsy moth, *Lymantria dispar*: ultrastructural study of transepithelial penetration of sperm bundles[J]. Journal of Insect Physiology, 1997, 43(12): 1133-1147.
- [22] Giebultowicz J M, Zdarek J. The rhythms of sperm release from testis and mating flight are not correlated in *Lymantria* moths [J]. Journal of Insect Physiology, 1996, 42(2): 167-170.
- [23] Gieultowicz J M, Riemann J G, Raina A K, et al. Circadian System Controlling Release of Sperm in the Insect Testes[J]. Science, 1989, 245(4922): 1098-1100.
- [24] 刘绪生, 李国清, 陈长琨. 棉铃虫精子在雌蛾生殖道内的转移动态[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(2): 45-48.
- [25] Arnqvist G, Nilsson T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects [J]. Animal Behaviour, 2000, 60(2): 145-164.
- [26] Steiner S, Henrich N, Ruther J. Mating with sperm-depleted males does not increase female mating frequency in the parasitoid *Lariophagus distinguendus* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2008, 126(2): 131-137.
- [27] 孙芳, 陈中正, 段毕升, 等. 蝇蛹金小蜂的交配行为及雄蜂交配次数对雌蜂繁殖的影响[J]. 生态学报, 2013(14): 4354-4360.
- [28] Damiens D, Boivin G. Why do sperm-depleted parasitoid males continue to mate [J]. Behavioral Ecology, 2006, 17(1): 138-143.

(责任编辑:张玲)