

红螯螯虾雄性生殖系统的生化组成及精子代谢

丁银娣, 王 群, 李 恺, 陈东华

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要:通过对红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)雄性生殖系统各组织的生化测定和乳酸脱氢酶(LDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、延胡索酸还原酶(FR)的活性测定发现,红螯螯虾精荚(含精子)中的糖类和蛋白质含量丰富,分别为18.264和12.846 mg/g(FW),总脂含量相对较低,仅为1.613 mg/g(FW);精子(含初级精荚壁)亦以糖类和蛋白质含量较高,分别达到5.227和8.475 mg/g(FW),总脂含量因过低而未能测出,但精子的上述物质含量均显著低于精荚。酶活性测定发现,LDH酶活性以精荚、输精管和射精管较高,其中又以前输精管最高,为1 426.258 U/(g protein),可能与其功能相关;精子和精荚LDH活性显著低于输精管,含量分别为87.375和36.215 U/(g protein),两者间差异显著;FR活性在精荚和精子中较高,两者分别达到19.945和15.732 U/(mg protein),显著高于生殖系统其他组织器官,但均未检测到SDH酶活性,故其SDH/FR的比值趋向于0。而生物物质的组织化学以及酶组化定位的结果进一步证实了上述结果。此外,LDH同工酶谱结果证实,精荚仅含有一条厌氧型LDH^H编码亚基占优势的同工酶谱带。所有实验结果表明,红螯螯虾精子代谢的方式以厌氧型为主,其代谢底物主要为糖类,为厌氧型糖酵解,其代谢底物由次级精荚壁提供。

关键词:红螯螯虾;雄性生殖系统;生化成分;同工酶;精子代谢

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)05-0562-07

红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)又名淡水龙虾,隶属甲壳纲、十足目、长尾亚目、拟河虾科、光壳虾属。原产澳大利亚,中国于1992年开始引进试养并对其进行研究。目前,有关该虾雄性生殖生物学方面的研究仅局限于对其繁殖习性的观察^[1]和生殖系统的发生^[2]等,而对其生殖营养及精子代谢的研究尚无报道。精子代谢所需能量物质的质和量,在很大程度上影响着精子的活力。目前,通过分析输精管生化组成以及某些酶如乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)、延胡索酸还原酶(fumarate reductase, FR)等的活性可以了解精子代谢的类型^[3]。本研究从红螯螯虾雄性生殖系统的生化组成、酶活性等方面入手,通过测定红螯螯虾雄性生殖系统LDH、SDH、FR的活性以及糖类、蛋白质、脂类等能量物质含量,试图探讨该虾精子代谢的方式以及对能量物质的利用,以期能为进一步提高红螯螯虾精子的质量,从而提高其繁殖过程中的受精率和孵化率,提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性红螯螯虾于2003年4月购自浙江省淡水水产研究所,均为1龄成熟个体,具体规格见表1。

表1 雄性红螯螯虾的规格(n=10)

Tab.1 Male crayfishes used in the experiment (n=10)

项目	Item	$\bar{X} \pm SD$
体重/g	Body weight	115.03±17.09
眼2后头胸甲长/cm	OCL	5.42±0.43
肝体指数/%	HEP	5.28±1.22
性腺指数/%	GSI	1.13±0.32

注:性腺指数=(精荚的重量+输精管的重量+射精管的重量)/体重;肝体指数=肝胰腺重量/体重;OCL为眼后缘至头胸甲后缘之间的长度。

Note: HEP = hepatopancreas weight / Body weight; GSI = (testis weight + vas deferens weight + ejaculatory duct weight) / Body weight; OCL was measured as the distance from the rear of the eye orbit to the posterior of the carapace.

收稿日期:2004-12-31; 修订日期:2005-04-19.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300265).

作者简介:丁银娣(1979-),女,硕士研究生,从事甲壳动物生殖生物学研究. E-mail: dyd0923@yahoo.com.cn

通讯作者:王 群. E-mail: qwang@bio.ecnu.edu.cn

1.2 样品收集

活体解剖,迅速取出精巢、输精管、射精管;输精管又根据其形态特征及其功能进一步分成前、中、后输精管(另文发表),取出后输精管中的精英。因精子包裹于两层精英壁之中,且初级精英壁极薄(另文发表),无法完全从精英中分离精子,故仅用 D-hanks 液洗去次级精英壁,将含有初级精英壁的精子作为精子样品直接测定。去除精英后的后输精管用 0.75% 生理盐水多次冲洗后待测。上述样品部分于冰浴中,用 0.75% 生理盐水匀浆后直接测定,剩余部分 -70℃ 低温冷藏备用。

1.3 生化测定

总糖测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS),单位为 mg/g 组织湿重^[4]。总脂的测定采用改进的氯仿-甲醇抽提法^[5]。蛋白质(双缩脲法)、甘油三酯(GPO-PAP 法)、糖元(蒽酮比色法)、葡萄糖(GOD-PAP 法)、乳酸脱氢酶活性、琥珀酸脱氢酶活性的测定均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,具体方法详见产品说明书。延胡索酸还原酶的测定根据 Prichard 等^[6-7]的方法略加改进。其中乳酸脱氢酶的活性以每克组织蛋白 37℃ 与基质作用 15 min,在反应体系中产生的 1 μmol 丙酮酸为 1 单位,琥珀酸脱氢酶和延胡索酸还原酶活性以每毫克蛋白每分钟使反应体系的吸光度降低 0.01 为 1 个比活性单位。

1.4 同工酶

乳酸脱氢酶同工酶的分析采用不连续垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳,常规染色、拍照,干胶保存;电泳重复 5 次并根据结果绘制酶谱示意图。实验方法及酶谱示意图的绘制详见胡能书等^[8]方法。

1.5 组织化学分析

糖原的检测采用 PAS 法,酸性黏多糖采用 A-PAS 法,中性黏多糖采用胭脂红法,蛋白质采用茚三酮法,脂类则采用苏丹 IV 丙二醇法;乳酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶的检测参照贾长恩等^[9]的方法,延胡索酸还原酶的检测先按照 Prichard 等^[6]的孵育液孵育 30 min,再用硝基蓝四唑盐(NBT)显色,同时以除去反丁烯二酸的孵育液为阴性对照 1,以琥珀酸脱氢酶阳性反应作为阴性对照 2。

1.6 数据处理与分析

每个实验设 3 个平行组,所有实验数据均以平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示;方差分析和多重比较采用 SPSS 软件的 Duncan's 分析。

2 结果与分析

2.1 糖类、蛋白质和脂类的含量(FW)

糖类共测定 3 个指标,分别为总糖含量和总糖中的糖元及葡萄糖含量。总糖含量以整个精英(含精子,下同)最高,为 (18.264 ± 0.081) mg/g (FW),精子(含初级精英壁,下同)含量仅为 (5.227 ± 0.054) mg/g (FW),显著低于精英($P < 0.05$),精巢则更低;糖元含量亦以精英最高,为 (3.243 ± 0.690) mg/g (FW),精巢其次,精子含量最低,仅为 (0.375 ± 0.048) mg/g (FW),显著低于精英含量($P < 0.05$)。葡萄糖含量以精巢最高,为 0.618 mg/g (FW),其次为精英,精子最低,仅为 (0.204 ± 0.098) mg/g (FW),显著和极显著低于精英($P < 0.05$)和精巢($P < 0.01$)。

蛋白质含量以精英最高,为 12.846%,精子则为 8.475%,两者差异显著($P < 0.05$),精巢最低,仅为 3.303%。

脂类主要测定了总脂含量以及其中的甘油三酯含量。总脂含量以精巢最高,占湿重的 13.043%,精英为 1.613%,精子因其含量极微,故未测出。甘油三酯占总脂的百分含量虽以精英最高,但因其总脂含量显著低于精巢,故其实际百分含量应远低于精巢(表 2)。

2.2 乳酸脱氢酶

2.2.1 乳酸脱氢酶活性 不同组织中 LDH 酶活性差异显著($P < 0.05$)(表 3)。前、中、后输精管 LDH 活性明显高于其他组织器官,其中又以前输精管最高,后输精管次之;精子的 LDH 活性虽较低,但仍然显著高于精英($P < 0.05$),两者分别为 87.375 和 36.215 U/g protein。LDH 的酶活性由高到低依次为前输精管、后输精管、中输精管、精巢、射精管、精子和精英。

2.2.2 乳酸脱氢酶同工酶 凝胶电泳显示,在不同的组织中,乳酸脱氢酶同工酶的区带不同(图 1)。精英 7 条,前输精管 4 条,中、后输精管和射精管各 2 条,精英 1 条。根据其泳动特点将其分成两个区:第一区以 LDH^B 基因编码的亚基为主,向阳极泳动较快,酶带着色浅,在该区,精巢有 3 条带,后输精管和射精管各有一条带;第二区以 LDH^A 基因编码的亚基为主,向阳极泳动较慢,酶带着色深,在该区精巢和前输精管各有 4 条带分布,中输精管有两条带,后输精管和射精管各有 1 条带,精英仅有的一条带也分布在该区。第二区是酶带的主要分布区。

表 2 雄虾生殖系统的生化成分

Tab.2 Biochemical composition of male crayfish reproductive system				$\bar{X} \pm SD$
项目 Item		精巢 Testis	精英* Spermatophores	精子** Sperm
总糖/(mg·g ⁻¹ FW)	Total carbohydrates	4.444±0.114 ^a	18.264±0.081 ^a	5.227±0.054 ^b
糖元/(mg·g ⁻¹ FW)	Glycogen	2.288±0.025 ^b	3.243±0.690 ^c	0.375±0.048 ^a
葡萄糖/(mg·g ⁻¹ FW)	Glucose	0.618±0.052 ^b	0.405±0.191 ^{ab}	0.204±0.098 ^a
蛋白质/%(FW)	Protein	3.303±0.688 ^a	12.846±2.179 ^c	8.475±0.943 ^b
总脂/%(FW)	Total lipid	13.043±1.592	1.613±0.026	-
甘油三酯/%(总脂)	Triglyceride	0.647±0.122	5.445±0.159	-

注:“*”示含精子;“**”示含初级精英壁;“-”未测出,同行之间字母不同,表示差异显著,同列之间不比较。
Note: “*” means including sperm; “**” means including the primary layer of spermatophores; “-” undetectable. The different letters show significant difference in the same row, and data haven't been compared in the same column.

表 3 雄虾生殖系统 LDH、SDH 和 FR 酶活性

Tab.3 LDH,SDH and FR activity of male reproductive system								U/(g protein); $\bar{X} \pm SD$
项目 Item	精巢 Testis	输精管 Vasa deferentia			射精管 Ejaculatory duct	精英* Spermatophores	精子** Sperm	
		前输精管 Proximal vas deferens	中输精管 Mid-vas deferens	后输精管 Distal vas deferens				
LDH 活性 LDH Activity	866.245 ±133.956 ^{bc}	1426.258 ±329.260 ^d	1099.518 ±243.440 ^{cd}	1291.000 ±237.463 ^d	656.392 ±129.736 ^b	36.215 ±11.429 ^a	87.375 ±13.453 ^a	
SDH 活性 SDH Activity	7.284 ±0.337 ^{ab}	4.987 ±0.307 ^{ab}	9.497 ±2.121 ^b	10.545 ±4.018 ^b	8.712 ±1.634 ^a	-	-	
FR 活性 FR Activity	1.457 ±0.245 ^a	-	0.708 ±0.461 ^a	1.160 ±0.426 ^a	1.128 ±0.484 ^a	19.945 ±6.371 ^b	15.732 ±2.434 ^b	

注:“*”示含精子;“**”示含初级精英壁;“-”未测出,同行之间字母不同,表示差异显著,同列之间不比较。
Note: “*” means including sperm; “**” means including the primary layer of spermatophores; “-” undetectable. The different letters show significant difference in the same row, and data haven't been compared in the same column.

2.3 琥珀酸脱氢酶和延胡索酸还原酶的活性

SDH 的活性在中输精管、后输精管、射精管和精巢中差异不显著($P>0.05$),最大活性在后输精管中检测到,为 10.545 U/(mg protein),而精英和精子 SDH 活性极弱,未测出。FR 活性在精英和精子中较高,两者分别达到 19.945 U/(mg protein)和 15.732 U/(mg protein),显著高于其他组织器官($P<0.05$),而中输精管、后输精管、射精管和精巢的活性很低,且它们之间的差异不显著($P>0.05$)(表 3)。

2.4 组织化学染色

组织化学测定结果显示,精英壁中都含有丰富的糖类和蛋白质。PAS 反应强阳性,同时次级精英

壁 A-PAS 反应为极强的阳性反应,显示次级精英壁中酸性黏多糖含量极其丰富。蛋白在次级精英壁和精子中都有极强的阳性反应。此外脂类检测发现,精子和精英壁中仅为弱阳性,表明精子和精英壁中含有极少量的脂类物质。酶组织化学结果显示,精子、初级精英壁和次级精英壁 SDH 均为阴性;FR 和 LDH 在精子分别为强阳性和阳性,而初级精英壁均为弱阳性,次级精英壁则均为阴性。精巢中,LDH 组织化学染色仅精细胞生精小囊及收集管中的精子呈阳性,其他初、次级精母细胞生精小囊皆为阴性,两者差异明显,而 SDH 和 FR 在精巢中整体呈弱阳性。输精管及其内容物的组织化学染色结果见表 4。

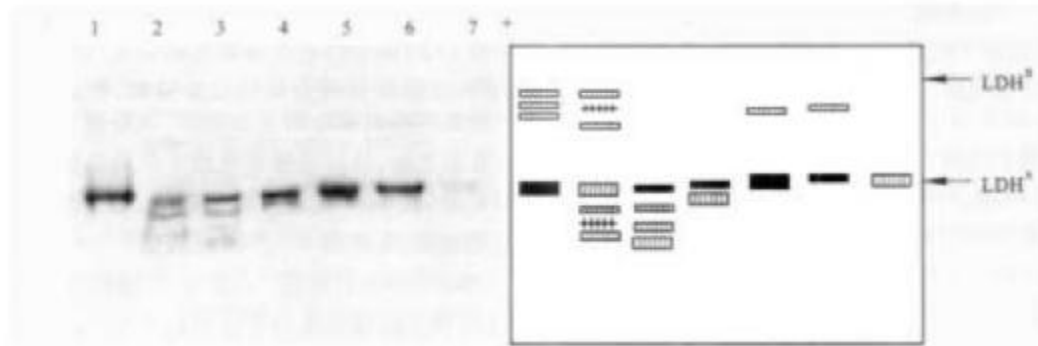


图1 红螯螯虾各种不同组织的LDH同工酶谱

1:心脏; 2:精巢; 3:前输精管; 4:中输精管; 5:后输精管; 6:射精管; 7:精荚

■ 示酶带色深,为一级带(酶活性强); ▨ 示酶带色浅,为二级带; ▩ 示酶带色极浅,为三级带(酶活性很弱); +++++ 表示扩散带;同时每一级酶带又可根据酶带的宽度分为宽带和窄带二类。

Fig.1 Tissue-specific pattern of lactate dehydrogenase isozymes of *Cherax quadricarinatus*

1:Heart; 2:Testis; 3:Proximal vas deferens; 4:Mid-vas deferens; 5:Distal vas deferens; 6:Ejaculatory duct; 7:Spermatophores

■ Showing primary band(the activity of enzyme is high); ▨ Showing secondary band; ▩ Showing tertiary band(the activity of enzyme is low); +++++ Showing dispersal band;and the bands at same rank were divided into wideband and narrowband according to the width.

表4 雄性红螯螯虾生殖系统各组织的组织化学染色结果

Tab.4 Histochemical results of tissues of reproductive system in male *C. quadricarinatus*

项目 Item	输精管 Vas deferens				精荚 Spermatophores			
	结缔组织 Connective tissue	肌层 Muscle	基膜 Ground membrane	上皮细胞 Epithelial cell	次级壁 Secondary layer	初级壁 Primary layer	基质 Matrix	精子 Sperm
PAS	+	++	++	++	+++	++	+	+
A-PAS	-	-	-	+	++++	-	-	+
胭脂红 Carmine	-	-	-	+++	-	+	-	++
蛋白质 Protein	+++	+++	+	++++	++++	++	+	++++
脂类 Lipid	++	++	++	++	++	+/-	-	+
LDH	++	++++	++	++++	-	+	-	++
SDH	+	++	-	++	-	-	-	-
FR	-	-	-	-	-	+	-	+++

注:“-”示阴性;“+”示弱阳性;“++”示阳性;“+++”示强阳性;“++++”示极强阳性。

Note:“-”showing negative; “+”showing moderately positive; “++” showing positive; “+++” showing intensely positive; “++++” excessively positive.

3 讨论

已有研究证实,人工饲养条件下营养的不均衡,将直接导致虾蟹精荚的退化和精子数量的急剧减少甚至完全消失^[10-11]。而相关的研究发现,甲壳动物精子自精巢进入输精管直至交配,需经历较长的

时间,期间精子始终进行着正常的代谢以保持其活力^[12]。因此,营养素除了作为精子发生的结构物质外,还须为精子形成后的正常代谢活动提供必需的能量物质。而输精管中能量物质的质和量以及代谢相关酶活性的多寡,对精子的后期成熟以及活力的保持具有重要影响。

3.1 精子的代谢类型

不同动物精子代谢的方式存在差异,既有有氧代谢,又有厌氧代谢,而部分种类则因精子所在部位的不同而分别采用不同的代谢方式^[13]。而相关的研究证实,精子代谢与 LDH、SDH、FR 等的活性密切相关。LDH 是厌氧糖酵解过程中重要的氧化还原酶,可催化丙酮酸和乳酸之间的相互转化,而 FR 和 SDH 则分别为厌氧呼吸必需酶^[14]和有氧代谢标志酶^[15],故 SDH/FR 的比值可作为判断其代谢类型的依据^[16]。已有研究显示,大部分哺乳动物 SDH/FR 的比值约为 60:1,其代谢类型为有氧代谢;*Micrococcus lactyliticus* 约为 0.03:1,为厌氧代谢;平分大鳌蟹 (*Metopogapsus messor*) 的精子为 5.7:1,其代谢类型为兼性^[16]。

本研究发现,精子和精荚中均含有 LDH 活性,且精子中该酶的活性显著高于精荚;在 FR 活性的检测中发现,精子和精荚中该酶的活性远高于生殖系统的其他组织,同时精子中又高于精荚中,虽两者间无显著差异,但因精荚中包含有精子,故精荚中该酶的活性应显著低于精子,酶组织化学定位的结果证实了这一点;此外,在精子和精荚中均未检测到 SDH 的活性,酶组织化学定位也得到了相同的结果。因此,红螯螯蟹精子的 SDH/FR 比值趋向 0,应为厌氧型代谢。

乳酸脱氢酶同工酶由 A、B 两个亚基组成,为一四聚体酶,通常为 5 条酶带,其中 A 亚基同聚体 A_4 向阳极泳动最慢,与厌氧代谢关系密切,而 B 亚基同聚体 B_4 向阳极泳动最快,与有氧代谢有关^[17]。LDH 同工酶的研究发现,红螯螯蟹雄性生殖系统 LDH 同工酶并未呈现经典的 5 条谱带,而是分成 2 个区,其中颜色较浅的第一区是由需氧型 LDH^B及其变异基因编码的亚基形成的谱带,染色深的第二区则是由厌氧型 LDH^A基因编码并占据优势,而精荚仅出现一条由厌氧型 LDH^A基因编码为主的同工酶条带。因此,进一步证实了红螯螯蟹精子代谢的类型为厌氧型代谢。

在组织化学定位中,次级精荚壁 LDH 酶为阴性,初级精荚壁也仅为弱阳性,精子为强阳性,因而可以认为整个精荚所测得的 LDH 酶活性值实际是精子中的活性,初级精荚壁 LDH 酶弱阳性亦可能是由精子内部该酶的外渗进入初级精荚壁所致^[3]。

此外,研究结果发现在红螯螯蟹前、中、后输精管和射精管的管壁中,LDH 酶活性以前输精管最

高,而 SDH 和 FR 的活性则均以后输精管最高。前输精管 LDH 酶活性较高可能与其强大的分泌功能有关^[3];后输精管的分泌功能虽极弱,但后输精管是红螯螯蟹精荚贮存的主要场所,也是精子代谢产物的富集之地,故后输精管管壁中较高的酶活性可能与其重吸收精子代谢产物有关^[3]。相似的结果在短尾类的锯缘青蟹^[3]、中华绒螯蟹^[13]、平分大鳌蟹^[16]等研究中亦有报道。而精巢、后输精管、射精管的 LDH 同工酶酶谱在两个区均有分布,且 SDH/FR 分别是 5:1、9.1:1 和 7.7:1,因此其代谢类型可能为兼性。

3.2 精子代谢的底物

代谢底物是正常代谢顺利进行的物质基础。关于甲壳动物精子代谢的底物类型目前尚无定论,部分学者认为蛋白质是其主要的能量物质,而更多则倾向于利用碳水化合物^[3,13,16,18]。因此,甲壳动物精子代谢的底物类型可能存在种的差异性。

本研究结果发现,精荚(含精子)中总糖含量最高,蛋白质其次,脂类含量极低;然而精子所测的上述各物质含量中,虽含有初级精荚壁的成分,但各含量仍显著低于精荚,说明精子中糖类、蛋白质和脂类的含量应更低于实测值,而次级精荚壁的含量则高于其实测值。因此,可以认为红螯螯蟹次级精荚壁是整个精荚营养物质的富集场所。

精子作为一类特殊的生殖细胞,其主要部分为含有遗传物质的细胞核,绝大部分细胞质在其形成过程中丢弃。红螯螯蟹精子从精巢产生至交配,需在输精管中贮存较长的时间^[19],故精子自身的营养物质不足以提供其代谢所需。而已有的研究证实,精荚壁具有一定的通透性,可允许小分子物质通过^[20]。因此,红螯螯蟹精子代谢的底物应该来源于次级精荚壁,其方式是利用其自身的通透性进入精子细胞,为其正常的代谢提供能量物质。从蛋白质、脂类和糖类分子的大小以及次级精荚壁各物质的含量来看,糖类的分子最小,最易穿透精荚壁进入精子细胞,且在次级精荚壁中糖类含量极其丰富。结合精子代谢类型的分析可以推断:红螯螯蟹精子代谢的底物以糖类为主,其主要方式为厌氧糖酵解。而蛋白质和脂类可能仅作为精荚壁的组成成分参与了精荚的构成(另文发表)。而红螯螯蟹的精荚壁除了具有通常的保护精子的作用外,还具有重要的营养作用,为精子的代谢提供了必要的物质基础。

参考文献:

- [1] King C R. Growth and survival of red-claw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in relation to temperature, with comments on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland[J]. *Aquaculture*, 1994, 122(15): 75-80.
- [2] 罗宇良, 吴志新, 陈孝煌, 等. 红螯蟹虾精巢发育的组织学研究[J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(1): 78-79.
- [3] Jeyalekumie C, Subramoniam T. Biochemistry of seminal secretions of the crab *Scylla serrata* with reference to sperm metabolism and storage in the female[J]. *Mol Rep Dev*, 1991, 30: 44-55.
- [4] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [5] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H. A Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. *J Biol Chem*, 1957, 226: 497-509.
- [6] Prichard P K. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics[J]. *Int J Parasitol*, 1973, 3: 409-417.
- [7] Xiao Shuhua, Feng Jianjun, Guo Haifang, et al. Effect of mebendazole, albendazole, and praziquantel on succinate dehydrogenase, fumarate reductase, and malate dehydrogenase in *Echinococcus granulosus* cysts harbored in mice[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1993, 14(2): 151-154.
- [8] 胡能书, 万贵同. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985.
- [9] 贾长恩, 李叔庚. 组织化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [10] Leung-Trujillo J R, Lawrence A L. Observations on the decline in the sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions[J]. *Aquaculture*, 1987, 65: 363-370.
- [11] Samuel M, Kannupandi J, Soundarapandian P. Nutritional effect on male reproductive performance in the freshwater Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) [J]. *Aquaculture*, 1999, 172: 327-333.
- [12] 王群, 赵云龙, 陈立侨. 红螯蟹精子发育的营养及代谢研究概况[J]. *动物学杂志*, 2002, 37(5): 78-82.
- [13] 王群, 赵云龙, 陈立侨. 中华绒螯蟹雄性生殖系统的生化组成和精子代谢[J]. *水产学报*, 2002, 26(5): 411-416.
- [14] Keiichi E, Yukihiko A, Haruhiko M. Physiological role of soluble fumarate reductase in redox balancing during anaerobiosis in *Scacharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Micro Lett*, 2002, 215: 103-108.
- [15] Warrings M, Smith O H, Guaditta A, et al. Studies on succinic dehydrogenase. Isolation of a succinic dehydrogenase-fumaric reductase from an obligate anaerobe[J]. *Biochim et Biophys Acta*, 1957, 25: 96-109.
- [16] Anilkumar G, Sudha K, Anitha E, et al. Aspects of sperm metabolism in the spermatheca of the brachyuran crab *Metapagurus*. *Mexor*[J]. *J Crust Biol*, 1996, 16(2): 310-314.
- [17] Jadwiga G, Matek S Z, Anna B, et al. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isozymes from herring *Clupea harengus* [J]. *Comp Biochem Phys Part B*, 2003, 134: 399-406.
- [18] Jeyalekumie C, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatozoa and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata* [J]. *Biol Bull*, 1989, 177: 247-253.
- [19] 赵云龙, 孟凡丽, 顾志敏, 等. 红螯蟹虾繁殖习性的研究[J]. *动物学杂志*, 2000, 35(5): 5-9.
- [20] Uma K, Subramoniam T. Histochemical characteristics of spermatophore layers of *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda: Portunidae) [J]. *J Invert Report*, 1979, 1: 31-34.

Biochemical composition and sperm metabolism in male reproductive system of crayfish, *Cherax quadricarinatus*

DING Yin-di, WANG Qun, LI Kai, CHEN Dong-hua

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The sperms of the Crustacea are often atypical, bizarre, and non-flagellated, so it is difficult to investigate the sperm metabolism directly. Biochemical studies, as well as enzyme assays for lactate dehydrogenase (LDH) activity, succinate dehydrogenase (SDH) activity and fumarate reductase (FR) activity, have been conducted on the male reproductive tissue in order to provide reference to sperm metabolism in the male crayfish, *Cherax quadricarinatus*. The results reveal that spermatophores (with sperm inside) contain high levels of carbohydrate and protein, which are (18.264 ± 0.081) and (12.846 ± 2.179) mg/g of wet tissue weight, respectively, but low level of total lipid, (1.613 ± 0.026) mg/g of wet tissue weight. Compared with other reproductive tissues, the corresponding contents in sperm (with the primer layer of spermatophore) are fairly low, the content of total lipid in which is too low to be detected; in contrast, there are still high levels of carbohydrate and protein, (5.227 ± 0.054) and (8.475 ± 0.943) mg/g of wet tissue weight, respectively, all significantly lower than those in spermatophore. Enzyme assays show that the lactate dehydrogenase activity is high in testis, vas deferens and ejaculatory duct, particularly in the proximal vas deferens $(1\,426.258 \pm 329.260)$ U/g protein, in agreement with its function. Secondly, the lactate dehydrogenase activities in sperm and spermatophore are significantly lower than those in the vas deferens, (87.375 ± 13.453) and (36.215 ± 11.429) U/g protein, respectively, which is significantly lower in spermatophore than in sperm. Thirdly, compared with other reproductive tissues, the fumarate reductase activity is high in spermatophore and sperm, which are (19.945 ± 6.371) and (15.732 ± 2.434) U/mg protein, respectively, while the succinate dehydrogenase activity is undetectable. Therefore the ratio of SDH/FR is very low. Finally, histochemical studies of carbohydrate, protein, lipid, LDH, SDH and FR provide further evidence for the former results. Furthermore, electrophoretic studies reveal that only one LDH isozyme (LDH^A gene code type or M-type) be expressed in the mature spermatophore. All these results suggest that the metabolism of sperms be mainly anaerobic in *C. quadricarinatus*, and following the glycolytic pathway, during their storage in the spermatophore, using carbohydrate substrates, which are provided by the secondary layer of spermatophore.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; male reproductive system; biochemical composition; isozymes; sperm metabolism

Corresponding author: WANG Qun. E-mail: qwang@bio.ecnu.edu.cn