

文章编号: 1000-0615(2002)05-0411-06

中华绒螯蟹雄性生殖系统生化组成及精子代谢

王 群, 赵云龙, 陈立侨

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 通过对中华绒螯蟹肝胰腺及生殖系统各组织生化成分和乳酸脱氢酶(LDH)活性的测定发现: 总碳水化合物的含量以副性腺及输精管内容物(含精荚和精浆)较高, 为 $33.456\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重和 $21.537\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重, 肝胰腺、精荚及精巢的含量较低; 碳水化合物中的糖原和葡萄糖含量分别以输精管内容物和肝胰腺最高, 分别为 $0.385\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重和 $5.866\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重, 精巢和肝胰腺中的糖原含量太低而无法检测到, 精荚葡萄糖含量最低; 蛋白质含量以肝胰腺最高, 其余各部分含量显著低于肝胰腺; 脂类含量以精巢和肝胰腺最高, 其中的甘油三酯仅存于肝胰腺和精巢, 且肝胰腺含量显著高于精巢。乳酸脱氢酶活性以贮精囊最高, 精荚仅为中等, 这可能与精荚壁的通透性有关, 而精浆和肝胰腺显著低于其它组织。结果表明, 中华绒螯蟹能量代谢主要物质是脂类和蛋白质; 精子代谢的能量物质为碳水化合物, 并由精浆提供, 而其代谢的方式以厌氧代谢为主。

关键词: 中华绒螯蟹; 生化成分; 乳酸脱氢酶; 精子代谢

中图分类号: Q591 文献标识码: A

Biochemical composition and sperm metabolism in the reproductive system of the male, *Eriocheir sinensis*

WANG Qun, ZHAO Yun-long, CHEN Li-qiao

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

Abstract: Biochemical composition of male reproductive system and hepatopancreas, with special reference to lactate dehydrogenase (LDH) activity, was determined in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*. The results reveal that the glandula accessoria and luminal contents (seminal plasma along with spermatophores) are rich in carbohydrates ($33.456\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and $21.537\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of wet tissue weight, respectively). The carbohydrate contents of hepatopancreas and spermatophore and testis are low. Luminal contents and hepatopancreas contain the highest level of glucose and glycogen respectively, but spermatophore contains very low level of glucose and in testis and hepatopancreas glycogen is too low to be detected. Protein content of hepatopancreas is higher than that of other tissues. Hepatopancreas and testis contain the higher level of lipid. Triglyceride exists in the hepatopancreas and testis only and the content of hepatopancreas is higher than that of testis. LDH activity is very high in seminal vesicle, and probably this is due to the storage of seminal substances within this region. On the contrary, spermatophores show only moderate amount and a low LDH activity

收稿日期: 2002-01-11

资助项目: 教育部骨干教师基金项目, 霍英东青年教师基金项目和教育部回国留学人员科研启动基金部分资助

作者简介: 王 群(1968-), 男, 浙江宁波人, 副教授, 博士, 从事甲壳动物生殖生物学研究。E-mail: qunwang@online.sh.cn

通讯作者: 陈立侨(1962-), 男, 广东梅县人, 博士, 教授, 主要从事水生动物营养学和种质遗传学方面的研究。E-mail: lqchenc@online.sh.cn

detected in the seminal plasma may be due to its leakage from the spermatophores. Compared with reproductive system, LDH activity of hepatopancreas is significantly low. All results show that the pattern of sperm metabolism in *Eriocheir sinensis* is anaerobic by utilizing carbohydrates. A high carbohydrate content of glandula accessoria suggests that spermatozoa may rely on carbohydrate reserves of seminal vesicle for its survival in the spermatheca.

Key words: *Eriocheir sinensis*; biochemical composition; lactate dehydrogenase(LDH); sperm metabolism

配子质量与受精能力的研究是生殖生物学的重要组成部分。目前,甲壳动物在该方面的研究主要集中在雌体,特别是成熟期卵内物质的积累以及对受精率、孵化率、幼体成活率等的影响,而很少涉及雄体。然而,个体发育的前提是雌雄配子的结合,精子同样为子代提供了遗传物质,因此,在繁殖过程中精子与卵子同样重要,精子的优劣也将直接影响卵的受精率及幼体孵化率。短尾类精子在形成后直至交配、产卵这段时期,分别贮存于雄性输精管(交配前)和雌性纳精囊(交配后至排卵),并始终进行着旺盛的代谢活动,从而保持其应有的活力。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质量。因此,深入研究甲壳动物精子的代谢方式和能量利用情况,对于提高精子质量和繁殖过程中卵的受精率、孵化率至关重要。研究证实,蔓足类精子主要利用内源性的物质如脂类作为能量物质^[1];昆虫在雄性生殖道中,精子以厌氧代谢方式利用精浆中可酵解的糖类作为运动的主要能源^[2-5],而在雌性纳精囊中则转向有氧代谢,利用精子自身的脂肪酸和磷脂作为能量物质^[6]。但是,甲壳动物这方面的研究迄今尚未见有详尽报道。

精子代谢通常是通过底物利用方式和某些酶的活性如乳酸脱氢酶(LDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、延胡索酸还原酶(FR)的测定来进行研究^[7]。LDH是糖酵解中一种非常重要的酶,研究显示脊椎动物的LDH同功酶有H、M型亚单位,它们均与有氧和无氧代谢有关^[8]。而酶的活性常依赖于细胞外底物的可利用性,因此通过对碳水化合物、脂类、蛋白质以及酶活性的测定,可间接了解其代谢方式。本研究通过对中华绒螯蟹雄性生殖系统LDH酶活性的测定,以及与此相关的碳水化合物、蛋白质、脂类含量的分析,试图了解精子代谢方式和能量利用情况,为人工繁殖中亲体营养强化提供理论依据。

1 材料与方 法

实验用蟹于2001年3月两批购于上海中山桥农贸市场,均为两秋龄成熟个体(表1)。活体解剖,迅速取出肝胰腺、副性腺、精巢、输精管;刺破输精管取出输精管内容物(含精浆和精英),一部分直接用于测定,剩余部分用生理盐水多次冲洗,分离出精英;取出内容物后的输精管壁用生理盐水反复冲洗,洗去剩余内容物并将其分成前输精管、后输精管和贮精囊三部分。各组织根据不同需要分别匀浆、-70℃低温冷藏备用。酶活性测定均在4℃以下进行。

表1 实验用雄蟹的规格

Tab. 1 Male crabs used in the experiment

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	平均 average
体重(g) weight	59.5	52.5	52	60.8	64	48.8	50.3	54.5	42	55.5	46.5	51	57	46	53	52.89±5.92
性腺指数(%) GSI	4.2	4.37	4.51	3.93	3.56	3.43	7.44	6.43	7.43	4.34	4.03	3.30	4.22	6.17	5.94	4.89±1.41
肝体指数(%) HEP	3.78	4.08	3.82	3.77	3.23	2.88	6.50	5.78	7.03	3.86	3.70	2.81	3.63	5.66	4.59	4.34±1.30

注:性腺指数=(精巢+输精管+副性腺)/体重;肝体指数=肝胰腺质量/体重

Notes: GSI=(testis+ vas deferreas+ glandula accessoria)/weight; HEP= hepatopancreas/weight

总碳水化合物和糖原的测定采用蒽酮比色法,单位均为 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 湿重^[9,10]。葡萄糖测定采用上海荣盛生物技术有限公司生产的试剂盒(葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法),单位为 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 湿重。蛋白质(双缩脲法)、甘油三酯(甘油磷酸氧化酶法)、乳酸脱氢酶的测定均采用南京建成生物工程研究所生产

的试剂盒。总脂的测定采用氯仿-甲醇抽提法^[11]。

2 结果

2.1 碳水化合物

碳水化合物共测定 3 个指标,分别为总碳水化合物含量和碳水化合物中的糖原及葡萄糖的含量(表 2)。结果表明,副性腺和输精管内容物(含精英和精浆)的总碳水化合物含量最高,糖原含量以输精管内容物最高,其次是副性腺和精英,肝胰腺和精巢中未检测到糖原,可能是因含量过低而无法检测到。虽然各部分糖原含量占其湿重的比例并不高,但输精管内容物糖原的含量仍明显高出副性腺和精英。葡萄糖的含量以肝胰腺最高,这可能与肝胰腺作为机体代谢的主要能量贮存器官有关。其余依次为输精管、精巢、副性腺和精英。

从碳水化合物的测定结果来看,输精管内容物各指标均较高,而精英的含量则远低于输精管内容物,因输精管内容物为精英和精浆的混合物,其中精英占大部分。因此输精管内容物中精浆的各碳水化合物含量应更高于输精管内容物的测定值。副性腺除葡萄糖外,其总碳水化合物和糖原的含量亦较高。

2.2 蛋白质含量

精巢、输精管内容物、副性腺和精英的蛋白质含量相对较为接近(表 2),其中以精英含量最低,仅为 4.738%(占湿重的百分含量),而肝胰腺则明显高出以上 4 种组织,为 31.797%(占湿重的百分含量)。蛋白质含量由大至小依次为肝胰腺、副性腺、内容物、精巢和精英。结果显示,除肝胰腺外,生殖系统其余各部分的蛋白质含量均较低。

2.3 脂类含量

在脂类方面测定了总脂和其中甘油三酯的含量(表 2)。总脂的含量以精巢最高,为 19.73%(占湿重的百分含量),其次是肝胰腺,为 18.157%。作为机体代谢主要能量物质的甘油三酯,在精英、输精管内容物以及副性腺中均未检测到,而仅存于肝胰腺和精巢,而且肝胰腺的含量明显高于精巢。

表 2 雄蟹生殖系统和肝胰腺的生化成分

Tab. 2 Biochemical compositions of male reproductive system and hepatopancreas

	精巢 testis	输精管内容物 luminal contents	副性腺 glandula accessoria	肝胰腺 hepatopancreas	精英 spermatophores
总碳水化合物(mg·g ⁻¹ 湿重) total carbohydrates	2.355±0.418	21.537±8.393	33.456±4.415	6.514±1.460	5.035±0.172
糖原(mg·g ⁻¹ 湿重) glycogen	※	0.385±0.231	0.077±0.022	※	0.024±0.005
葡萄糖(mg·g ⁻¹ 湿重) glucose	1.612±0.639	3.891±0.168	1.401±0.179	5.866±1.197	0.447±0.043
蛋白质(%湿重) protein	5.253±0.615	6.944±1.979	7.671±1.972	31.797±5.711	4.738±0.536
总脂(%湿重) total lipid	19.73±3.712	13.79±1.307	10.61±2.452	18.157±2.223	-
甘油三酯(占总脂%) triglyceride	0.333±0.0778	※	※	8.932±2.492	※

注: - 未测, ※ 未测出

Notes: - untested, ※ too low to detect

2.4 乳酸脱氢酶活力

不同组织中 LDH 酶活力差异明显(表 3)。在生殖系统各组织中以贮精囊最高,精浆最低,精英的

酶活力低于输精管和精巢,而显著高于精浆。相比之下肝胰腺酶活力最低。

表3 雄蟹生殖系统及肝胰腺的LDH酶活力

Tab. 3 LDH activity of male reproductive system and hepatopancreas ($U \cdot mg^{-1} \text{ protein}$)

	精巢 testis	精英 spermatophores	精浆 seminal plasma	前输精管 anterior vas deferens	后输精管 posterior vas deferens	贮精囊 seminal vesicle	肝胰腺 hepatopancreas
酶活力 LDH activity	439.888 ± 18.388	230.047 ± 9.294	34.545 ± 2.618	356.854 ± 12.321	424.533 ± 12.470	668.484 ± 22.963	26.623 ± 0.764

3 讨论

(1) 肝胰腺作为机体能量储存的主要场所,为机体正常代谢和各系统的发育提供能量来源。甲壳动物生殖腺发育的主要能量物质及产生配子所需的结构物质大部分由肝胰腺提供,这已在许多甲壳动物雌体的研究中得到证实^[11,12]。因此,肝胰腺与甲壳动物生殖系统发育的关系极为密切。大量研究证实甲壳动物的肝胰腺缺乏象哺乳动物那样的肝功能,比如糖原异生作用和生酮作用^[13]。同时,研究表明甲壳动物在正常状态下主要以脂类特别是甘油三酯作为能量物质^[14],但在饥饿状态下则基本不动用肝胰腺储存的脂肪,而转向使用蛋白质^[15]。因此,甲壳动物主要的能量物质是脂类和蛋白质。而 Spaargraen 和 Haefel^[16]的研究也证实了这一点,他们发现在普通螯虾(*Crangon crangon*)卵巢发育时,糖类只占整个肝胰腺湿重的0.4%~0.8%,而脂类和蛋白质却要占到2.7%~33%和40%~50.8%。因此,在甲壳动物肝胰腺中主要是以脂类和蛋白质作为能量物质的贮存形式。与上述结果相似,雄性中华绒螯蟹肝胰腺中以蛋白质和脂类为主,总碳水化合物含量相对较低,而糖原的含量则极低而无法检测。所以,中华绒螯蟹能量代谢的主要物质同样为脂类和(或)蛋白质。

雄性中华绒螯蟹肝胰腺总脂含量与同期的雌体相似(14.02%,占肝胰腺的湿重),但其中的中性脂含量差异较大。在雌体成熟期,中性脂占总脂含量的93.9%,而且中性脂中几乎完全由甘油三酯组成^[11],而雄体甘油三酯的含量仅占总脂的8.932%。如此大的差异,一方面与雌雄个体差异有关,但更主要的原因可能与雌体在繁殖过程中担任的重要作用有关。雌体需要将大量的能量物质其中包括甘油三酯转移到卵中,为卵的正常发育提供足够的能量,同时在产卵、孵化过程中雌体抱卵、孵化时间较长,需消耗大量的能量物质以保证产卵、孵化的顺利完成。

(2) 哺乳动物精子一般不含有糖酵解物质,可广泛利用来自精浆和雌性生殖管道中的细胞外物质如各种糖类、有机酸和乙醇^[17]。Adiyodi K G 和 Adiyodi R G^[18]研究十足类甲壳动物精子时发现:精子中拥有糖原沉积,并以此作为能量物质。而在锯缘青蟹(*Scylla serrata*)精英中同样含有游离糖类,如果糖、葡萄糖和甘露糖,显示它们可能参与精子的无氧代谢^[19]。进一步研究锯缘青蟹精子在纳精囊贮存过程以及体外低温冷藏(-4℃)时发现,精英无论在纳精囊还是在体外贮存均利用了碳水化合物,而蛋白质和脂类则未被利用^[7,20];在对各期锯缘青蟹脂类含量的调查中也发现,发育初期脂类在精浆和精英中含量极低,随着发育程度的提高,其增量甚微^[7]。这说明甲壳动物精子代谢的方式和所利用的主要能量物质有别于体内的其它代谢活动,其代谢所需物质为碳水化合物。

中华绒螯蟹精英和输精管内容物(包括精浆和精英)中蛋白质的含量远低于肝胰腺,而作为甲壳动物主要能量物质的甘油三酯则更低而无法检测,但在输精管内容物中却含有较高的碳水化合物。因此,中华绒螯蟹精子代谢的能源物质不可能是脂类或蛋白质,而应是碳水化合物。此外,Uma 和 Subramoniam^[21]研究发现,锯缘青蟹的精英能被有机分子穿透,由此认为在精英和精浆之间存在一种代谢物质的互换,即精英中的精子其代谢所需的能量物质可通过精英壁由精浆提供。中华绒螯蟹精英的碳水化合物含量较低,根本无法满足精子长期代谢的能量需求,必须由精英以外的物质提供,而精浆中正含有较高的碳水化合物,因此中华绒螯蟹精子代谢的能量物质也应与锯缘青蟹一样,通过精英壁的渗透由精浆提供。

(3) Jeyalectumie 和 Subramoniam^[7]在研究锯缘青蟹时发现,雌体发育早期(I期)纳精囊中所有的有机物质如蛋白质、脂类和碳水化合物均很低,虽然在II期后有快速上升,但至第V期碳水化合物含量

降到最低,而在交配后随着雄体生殖产物的进入,纳精囊内容物中各物质的含量大量增加。同时还发现精子在纳精囊储存的过程中,只利用了碳水化合物,而蛋白质和脂类却未动用。对奔水束腹蟹(*Parathelphusa hydrodromous*)的研究也发现,在已交配的雌体纳精囊中蛋白质、脂类和碳水化合物含量与未交配的均有明显增加^[22]。由此可以认为,雌体纳精囊中的碳水化合物主要由雄体通过交配提供。本研究发现,中华绒螯蟹雄体副性腺内无论是总碳水化合物还是其中的葡萄糖或糖原含量均显著高于其它部位。副性腺是雄性生殖系统不可分割的一部分,位于贮精囊和射精管的交界处,其内容物在与雌体交配过程中和精英及精浆一起进入雌体纳精囊。因此,副性腺内容物较高的碳水化合物含量可能为精子在雌体纳精囊中继续储存提供了保证。

(4) 中华绒螯蟹输精管管壁中,贮精囊壁 LDH 酶活性最高,后输精管次之,前输精管最低。此结果与 Jeyalectumie 和 Subramoniam^[22] 研究相似,该研究认为后输精管(相当于中华绒螯蟹的贮精囊)酶活性最高与其贮存功能有关。贮精囊是中华绒螯蟹交配前精英贮存的主要场所,也是精子代谢产物富积之地,超微结构研究显示,贮精囊上皮细胞分泌功能极弱,游离端具有大量的微绒毛,具有吸收管腔内物质的功能^[23]。因此,贮精囊壁高的 LDH 酶活性可能与其重吸收精子代谢产物有关。

精子完全由精英包被,其旺盛的代谢活动全部在精英内完成,因此精英中酶活性应最高,大量研究也证实十足类精英具有最高的酶活力^[7,22]。精浆仅是精子代谢所需营养的提供者,而非代谢场所,所以酶活性无或极低。然而 Jeyalectumie 和 Subramoniam^[7] 的研究却发现精浆中也存在较低的 LDH 酶活性,他们认为该酶活性可能来自精英的渗透,而不是精浆本身所具有,这在蔓足类和哺乳类中也得到了证实^[17,24]。本研究同样发现中华绒螯蟹精浆中也存在较低的 LDH 酶活性,其来源可能同样来自精英的渗透。中华绒螯蟹精英 LDH 酶活性仅为中等,显著低于贮精囊、后输精管和精巢,而中华绒螯蟹输精管内容物中精浆的含量又明显高于精英,酶的渗透必然导致精英酶活力的明显下降。

(5) 乳酸脱氢酶是糖酵解过程中重要的氧化还原酶,催化丙酮酸和乳酸间的相互转化,是细胞在厌氧条件下获取能量的主要方式,糖酵解过程中乳酸脱氢酶的活性越高则证明厌氧代谢越显著。本研究发现,除精浆外雄性生殖系统各部位的酶活力都大大高于肝胰腺,表明中华绒螯蟹的雄性生殖系统和其他组织相比,厌氧代谢比有氧代谢更为主要。而生殖系统各部分生化成分分析结果显示,精子代谢的主要能量物质为碳水化合物。因此,可以认为中华绒螯蟹精子是以碳水化合物作为能量物质,以厌氧糖酵解方式进行代谢的。

本实验还发现中华绒螯蟹精巢也具有较高的 LDH 酶活性,这与哺乳动物的研究相类似。在哺乳动物中精子是以乳酸作为能源的,乳酸脱氢酶是哺乳动物睾丸中非常重要的酶,其活性随精子的成熟不断升高,而且其中的 LDH-C4 是保持精子活力的关键酶^[25]。实验用中华绒螯蟹为完全成熟的个体,其精巢中较高的乳酸脱氢酶是否具有哺乳动物中同样的功能,有待于进一步的研究。

华东师范大学 99 级同学朱光剑和张秩通参加本研究部分工作,特此致谢。

参考文献:

- [1] Bames H. The oxygen uptake and metabolism of *Balanus balanus* spermatozoa[J]. J Exp Biol, 1962, 39: 353- 358.
- [2] Blum M S, Glowka Z, Taber S. Chemistry of the drone honey bee reproductive system II. Carbohydrates in the reproductive organs and semen [J]. Ann Entomol Soc Am, 1962, 55: 135- 139.
- [3] Lensky AE, Holstein P. Sugars and trehalose in the reproductive organs and haemolymph of the queen and drone honey bees (*Apis mellifera*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1969, 28: 1419- 1425.
- [4] Rao H V. Free sugars in the reproductive system and haemolymph of the bed bug [J]. Proc India Acad Sci Sect B, 1971, 75: 294- 303.
- [5] Adiyodi K G, Adiyodi R G. Advances in invertebrate reproduction, Vol I [A]. Taber S. Semen of *Apis mellifera* fertility, chemical and physical characteristics [C]. Kerala India: Peralam Kenneth, 1977. 219- 352.
- [6] Blum M S, Bumgarber J E, Taber S. Composition of fatty acids in the lipid classes in honey bee semen [J]. J Insect Physiol, 1967, 13: 1301- 1309.
- [7] Jeyalectumie C, Subramoniam T. Biochemistry of seminal secretions of the crab *Scylla serrata* with reference to sperm metabolism and storage

in the female[J]. Molecular Reproduction and Development, 1991, 30: 44- 55.

- [8] Pfeleiderer G, Wachsmuth E D. Alters- und funktions- abhängige differenzierung der lactatdehydrogenase menschlicher organe[J]. Biochem Z, 1961, 334: 185- 198.
- [9] Zhang J T. Modern Experimental Methods in Pharmacology[M]. Beijing: United Press of Peking Medical University and China Union Medical College, 1998. 1006- 1007. [张均田. 现代药理实验方法(上册)[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 1006- 1007.]
- [10] Cai W C, Yuan H J. Routine Chemical Analysing Methods of Biomaterial[M]. Beijing: Science Press, 1982. 4. [蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1982. 4.]
- [11] Cheng Y X, Du N S, Lai W. Lipid composition in the hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* at different stages[J]. Acta Zoologica Sinica, 1998, 44(4): 420- 429. [成永旭, 堵南山, 赖伟. 不同阶段中华绒螯蟹肝胰腺的脂类及脂肪酸组成[J]. 动物学报, 1998, 44(4): 420- 429.]
- [12] Castille F C, Lawrence A L. The relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus* (L.) [J]. J Crust Biol, 1989, 9(2): 202- 211.
- [13] Phillips J W, McKinney R J, Hird F J R, et al. Lactic acid formation in crustaceans and the liver function of the midgut gland questioned[J]. Comp Biochem Physiol, 1977, 56B: 427- 433.
- [14] Harrison K E. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review[J]. J Shellfish Res, 1990, 9(1): 1- 28.
- [15] Dall W, D J W Moriarty. Lipid absorption and utilization in the Norwegian lobster, *Nephrops lonyopes* [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1981, 50: 3- 45.
- [16] Spaargraen D H, Haefer P A. Interaction of ovary and hepatopancreas during the reproductive of *Crangon crangon* H. Biochemical relationship [J]. J Crust Biol, 1994, 14: 6- 19.
- [17] Mann T. The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract[M]. London: Methuen, 1964. 493.
- [18] Adiyodi K G, Adiyodi R G. Reproductive biology of invertebrates, Vol. 11 [A]. J Arthropoda-crustacea Spermatogenesis and sperm function [C]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1983. 407- 449.
- [19] Uma K. Studies on the seminal secretions of a portuni crab *Scylla serrata* (Forsk.) (Brachyura: Crustacea). PhD thesis[D]. University of Madras, India. 1982.
- [20] Jeyalctumie C, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata* [J]. Biol Bull, 1989, 177: 247- 253.
- [21] Uma K, Subramoniam T. Histochemical characteristic of spermatophore layers of *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda: Portunidae) [J]. Int J Invert Reprod, 1979, 1: 31- 41.
- [22] Jeyalctumie C, Subramoniam T. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the field crab, *Paratephusa hydrodromous* (Herbst) [J]. Exp Biol, 1987, 46: 231- 236.
- [23] Wang Q, Zhao Y L, Lai W, et al. Ultrastructural study on spermatophore formation in *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards [J]. J ECNU, 2000, 3: 98- 103. [王群, 赵云龙, 赖伟, 等. 中华绒螯蟹精英形成的超微结构研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2000, 3: 98- 103.]
- [24] Barnes H, Blackstock J. Biochemical composition of the seminal plasma of the cirripede *Balanus balanus* (L.) with particular respect to free amino acids and proteins [J]. J Exp Marine Biol Ecol, 1974, 16: 47- 85.
- [25] Wang Y M. Immune inhibition of fecundity by LDH- C4 [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1988, 15(5): 359- 362. [王又明. 乳酸脱氢酶 C4 对生育力的免疫抑制[J]. 生物化学与生物物理进展, 1988, 15(5): 359- 362.]