

# 保存液中 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)精子体外保存 存活率的影响\*

陈东华 李艳东 贾林芝 厉小波 王立人 孙菊香 王 群

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

**提要** 以伊红染色法检测样品精子存活率为依据,研究了4种保存液及 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 离子对中华绒螯蟹精子体外保存效果的影响。5种保存液分别为人工海水(ASW)、2倍钙离子人工海水( $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW)、无镁离子人工海水( $\text{Mg}^{2+}$ -FASW)、无钾离子人工海水( $\text{K}^{+}$ -FASW)、无钙离子人工海水( $\text{Ca}^{2+}$ -FASW),经4天保存后,各保存液中精子样品的存活率和精子密度均出现明显差异, $\text{K}^{+}$ -FASW、ASW及 $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW三种保存液中的精子因发生顶体反应而大量死亡,而 $\text{Mg}^{2+}$ -FASW、 $\text{Ca}^{2+}$ -FASW的保存效果较好。在此基础上,进一步探讨了不同 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对精子存活率的影响,结果发现,经24h保存后各实验组精子存活率均随着两种离子浓度的增加而明显下降。上述结果表明: $\text{K}^{+}$ -FASW、ASW及 $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW不适合精子保存,而 $\text{Mg}^{2+}$ -FASW和 $\text{Ca}^{2+}$ -FASW均可作为该蟹精子的保存液; $\text{Ca}^{2+}$ 因可引起精子顶体反应而造成保存液中精子的大量死亡,其浓度与存活率呈明显的负相关;无 $\text{K}^{+}$ 的保存液中, $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 的存在与否对精子的保存效果起关键作用;无 $\text{Mg}^{2+}$ 人工海水之所以具有较好的保存效果,可能与 $\text{Mg}^{2+}$ 的缺乏而导致 $\text{Ca}^{2+}$ 逆浓度差转运受阻,避免了因 $\text{Ca}^{2+}$ 进入而诱发顶体反应有关。

**关键词** 中华绒螯蟹, 精子, 低温保存, 保存液,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$

**中图分类号** Q78

随着人工育苗及遗传育种研究的深入,水产动物精液冷冻保存技术的研究已引起人们的关注。目前,有关水生动物精子保存的研究多集中在鱼类,且大多模拟生殖道精浆的组成,来确定保存液合适的离子成分及比例(Tan-Fermin *et al*, 1999),以确保精子保存过程中不被激活或发生顶体反应(Stoss, 1983)。然而,对甲壳动物的此类研究极少(Bray *et al*, 1998),且多以天然或人工海水作为基础保存液(Bray *et al*, 1998; Anchoroguy *et al*, 1988; 柯亚夫等, 1996; Bhavanishankar *et al*, 1997),而作为我国重要的经济甲壳动物中华绒

螯蟹(又称河蟹),在这方面的研究更是空白。本文作者以人工海水(ASW)为基础保存液,结合电镜观察,探讨了ASW中 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 阳离子对中华绒螯蟹精子保存存活率的影响,为中华绒螯蟹精子保存的研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 游离精子的获得

实验用中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)于2005年4月购自上海长风集贸市场,选取二龄成熟的健康雄蟹,3%高锰酸钾浸泡消毒20min,迅

\* 国家自然科学基金资助项目, 30300265号。陈东华, E-mail: chendonghua307@gmail.com; 李艳东, E-mail: ydli1979@126.com

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

收稿日期: 2006-05-08, 收修改稿日期: 2006-10-22

速解剖取出输精管,置于灭菌无钙离子人工海水( $\text{Ca}^{2+}$ -FASW)中。刺破输精管,挤出精英,胰蛋白酶消化法获得游离精子(马强等,2006)。

### 1.2 保存液的配制

以人工海水(ASW,盐度为20)(Tereza *et al.*,1988)为基础保存液,通过增减不同阳离子分别配制以下5种保存液:ASW,  $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW(2倍钙离子人工海水),  $\text{Mg}^{2+}$ -FASW(无镁离子人工海水),  $\text{K}^{+}$ -FASW(无钾离子人工海水),  $\text{Ca}^{2+}$ -FASW(无钙离子人工海水)。各保存液配方见表1。所有保存液均用灭菌的  $\text{ddH}_2\text{O}$  配制,同时加入适量双抗(青霉素为1U/ml,链霉素  $1 \mu\text{g/ml}$ ),  $0.22 \mu\text{m}$  细菌滤膜过滤,采用PHSJ-3型pH计(上海精密科学仪器有限公司)测定pH值,FM-8型全自动冰点渗透压计(上海医科大学仪器厂生产)测定渗透压。

### 1.3 精子存活率的检测

吸取一定量的游离精子加入到各种保存液中,使各保存液中的精子终浓度约为  $(8-10) \times 10^6$  个/ml,4保存4天,每天同一时间取样检测精子存活率和精子密度。精子存活率的检测采用伊红染色法(马强等,2007),其染色终浓度为0.5%,染色时间10min;光学显微镜观察计数,其中发生形变和类似顶体反应的精子均以死亡精子计算。每次随机计数200个精子,分4个随机计数点,每个点约计50个精子(Leung-Trujillo *et al.*,1987),统计样品精子存活率和精子密度。所有样品重复三次。

### 1.4 精子超微结构观察

保存4天后将部分保存液离心,移去保存液,所获精子一部分加入以  $\text{Ca}^{2+}$ -FASW 配置的2.5%戊二醛固定过夜,1%琼脂包埋辅助固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂618包埋,瑞典LKB2088超薄切片机制片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,JEM-100CXII透射电镜观察拍照;另一部分加入以

$\text{Ca}^{2+}$ -FASW 配置的2.5%戊二醛及1%锇酸固定,乙醇梯度脱水,醋酸异戊酯处理两次,临界点干燥,离子溅射喷金,JXA-840型扫描电镜观察拍照。

### 1.5 保存液中 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 对精子存活率的影响

以  $\text{Ca}^{2+}$ -FASW 保存液为对照组,逐量向该保存液中添加  $\text{CaCl}_2$ ,使保存液中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度分别达到2.00mmol/L(实验1组)、4.00mmol/L(实验2组)、6.00mmol/L(实验3组)、8.00mmol/L(实验4组)、10.00mmol/L(实验5组);以  $\text{Mg}^{2+}$ -FASW 保存液为对照组,逐量向该保存液中添加  $\text{MgCl}_2$ ,使保存液中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度分别达到10.51mmol/L(实验A组)、21.02mmol/L(实验B组)、31.53mmol/L(实验C组)、42.04mmol/L(实验D组)、52.05mmol/L(实验E组)。各实验组分别加入新鲜游离精子,使各保存液中的精子终浓度约为  $(8-10) \times 10^6$  个/ml,4保存24h后检测其精子存活率和密度,方法参照1.3。

实验数据用“平均数  $\pm$  标准差”表示,采用SPSS 11.0软件进行数据处理,并进行Deuncana单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 5种保存液对精子保存质量的影响

保存4天后各保存液的保存效果见表2。第1天时,各保存液的精子存活率即出现明显差异,其中  $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW、 $\text{K}^{+}$ -FASW 和 ASW 三种保存液中的精子存活率下降明显,分别为19.55%、48.5%和50.69%,至第4天时上述保存液的精子存活率仅为5.67%、2.42%和9.47%,降幅分别达到93.60%、97.29%、88.96%;而精子密度的降幅除ASW为16.19%外,  $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW 和  $\text{K}^{+}$ -FASW 分别达到54.10%和42.70%。然而,  $\text{Mg}^{2+}$ -FASW 和  $\text{Ca}^{2+}$ -FASW 两种保存液的精子存活率未见明显变化,保存4天后精子存活率依然达到92.47%和86.58%,降幅仅为2.28%和3.70%,而精子密度的降幅均不超过12%。

表1 五种保存液的成分、pH及渗透压

Tab.1 Chemical composition, pH and osmotic pressure of five preservation solutions

成分 (mmol/L)	ASW	$2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW	$\text{Mg}^{2+}$ -FASW	$\text{K}^{+}$ -FASW	$\text{Ca}^{2+}$ -FASW
NaCl	399.61	399.61	452.17	409.33	399.61
KCl	9.73	9.73	9.73	—	9.73
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	52.56	52.56	—	52.56	52.56
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	27.12	27.12	27.72	27.72	27.72
$\text{NaHCO}_3$	2.70	2.70	2.70	2.70	2.70
$\text{CaCl}_2$	10.08	20.16	10.08	10.08	—
pH值	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
渗透压 (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)	980.00 $\pm$ 1.00	1012.67 $\pm$ 2.31	935.67 $\pm$ 4.04	974.00 $\pm$ 6.9	791.00 $\pm$ 4.00

注:1mOsm 0.248kPa

表2 五种保存液的精子存活率及精子密度  
Tab.2 Viability rate and density of *E. sinensis* sperms preserved in five solutions

保存液	项目	时间(d)					降幅 (%)
		0	1	2	3	4	
2×Ca <sup>2+</sup> -ASW	活率(%)	88.61±2.87 <sup>ab</sup>	19.55±2.05 <sup>bc</sup>	6.24±0.71 <sup>cc</sup>	9.57±1.15 <sup>cc</sup>	5.67±0.63 <sup>cc</sup>	93.60
	密度(10 <sup>6</sup> )	6.47±0.69 <sup>a</sup>	6.70±0.61 <sup>a</sup>	6.77±0.95 <sup>a</sup>	3.57±0.45 <sup>b</sup>	2.97±0.37 <sup>b</sup>	54.10
Mg <sup>2+</sup> -FASW	活率(%)	94.63±4.63 <sup>aa</sup>	95.52±3.53 <sup>aa</sup>	95.95±4.83 <sup>aa</sup>	92.70±2.95 <sup>aa</sup>	92.47±1.41 <sup>aa</sup>	2.28
	密度(10 <sup>6</sup> )	5.73±0.72 <sup>a</sup>	5.40±0.60 <sup>a</sup>	4.73±0.29 <sup>b</sup>	4.63±0.66 <sup>b</sup>	5.07±0.76 <sup>ab</sup>	11.52
K <sup>+</sup> -FASW	活率(%)	89.32±3.20 <sup>ab</sup>	48.50±3.93 <sup>bb</sup>	28.17±1.83 <sup>cb</sup>	12.5±1.14 <sup>cBC</sup>	2.42±0.34 <sup>cc</sup>	97.29
	密度(10 <sup>6</sup> )	6.23±0.32 <sup>a</sup>	6.97±0.55 <sup>a</sup>	5.37±0.33 <sup>a</sup>	6.07±0.54 <sup>a</sup>	3.57±0.29 <sup>b</sup>	42.70
ASW	活率(%)	85.76±2.05 <sup>ab</sup>	50.69±3.38 <sup>cc</sup>	11.37±0.79 <sup>bbc</sup>	14.54±1.69 <sup>bb</sup>	9.47±0.51 <sup>cb</sup>	88.96
	密度(10 <sup>6</sup> )	5.93±0.65 <sup>a</sup>	6.07±0.61 <sup>a</sup>	5.80±0.77 <sup>b</sup>	5.46±0.24 <sup>b</sup>	4.97±0.43 <sup>c</sup>	16.19
Ca <sup>2+</sup> -FASW	活率(%)	89.91±5.17 <sup>aa</sup>	84.90±9.04 <sup>ba</sup>	86.92±4.70 <sup>ba</sup>	87.03±3.44 <sup>aa</sup>	86.58±4.52 <sup>ba</sup>	3.70
	密度(10 <sup>6</sup> )	6.93±0.50 <sup>a</sup>	6.40±0.62 <sup>b</sup>	6.83±0.75 <sup>a</sup>	6.70±0.47 <sup>ab</sup>	6.10±0.60 <sup>b</sup>	11.98

注: One-way ANOVA LSD, Duncana 分析 ( $P<0.05$ ), 小写字母上角标表示同种保存液的差异显著 ( $P<0.05$ ), 大写字母上角标表示不同保存液之间的差异 ( $P<0.05$ )

## 2.2 精子保存后的电镜观察

Mg<sup>2+</sup>-FASW 和 Ca<sup>2+</sup>-FASW 中培养的精子未发生顶体反应, 精子呈陀螺形, 直径为 4—5 μm, 辐射臂清晰可见。K<sup>+</sup>-FASW、ASW 及 2×Ca<sup>2+</sup>-ASW 中均有大量精子发生顶体反应, 辐射臂缩入核内。

## 2.3 Mg<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>对精子保存存活率的影响

经 24h 保存后, 不同 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>浓度的人工海水保存液中精子存活率及精子密度结果见表 3。从实验数据看, 两个对照组的精子存活率和精子密度在保存 24h 后, 与实验初(0h)相比均无显著差异; 除对照组外, Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>两个实验组中精子存活率均分别随着 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>离子浓度的增加呈现逐渐下降趋势, 精子密度亦随着精子的大量死

亡、解体而明显下降。从 Mg<sup>2+</sup>实验组与 Ca<sup>2+</sup>实验组的比较发现, Mg<sup>2+</sup>实验组精子存活率的降幅要小, 且前几个实验组的降幅较小, 至 E 组时才迅速增至 79.31%, 而 Ca<sup>2+</sup>实验组则在添加 Ca<sup>2+</sup>后即出现大幅下降。

## 3 讨论

不适宜的精子保存条件极易诱发顶体反应而使精子大量死亡 (Dan, 1956), 如何最大限度地减少精子顶体反应发生率、维持精子活力并延长其寿命, 已经成为精子体外保存的关键所在。然而, 精子保存液是精子体外保存过程中赖以生存的外环境, 其离子成分、渗透压以及 pH 值等条件将直

表3 不同Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>浓度人工海水保存液中精子存活率及精子密度的变化  
Tab.3 Viability rate and density of *E. sinensis* sperms in solutions of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> at different concentrations

Ca <sup>2+</sup>	项目	时间(h)			降幅 (%)	Mg <sup>2+</sup>	项目	时间(h)			降幅 (%)
		0	24					0	24		
对照	活率(%)	96.11±0.53	96.23±2.49	0	对照	活率(%)	96.30±1.71	94.12±1.84	2.26		
	密度(10 <sup>6</sup> )	6.23±0.06	6.30±0.05	0		密度(10 <sup>6</sup> )	6.73±0.49	6.52±1.13	3.12		
1	活率(%)	96.11±0.53	46.95±4.06	51.15	A	活率(%)	96.30±1.71	86.74±3.00	9.93		
	密度(10 <sup>6</sup> )	5.53±0.55	4.37±0.55	20.98		密度(10 <sup>6</sup> )	6.02±0.70	5.18±0.45	13.95		
2	活率(%)	96.11±0.53	25.40±0.89	73.57	B	活率(%)	96.30±1.71	80.15±4.26	16.77		
	密度(10 <sup>6</sup> )	6.53±0.64	3.37±0.35	48.39		密度(10 <sup>6</sup> )	7.75±0.18	5.18±0.45	33.16		
3	活率(%)	96.11±0.53	8.04±1.79	91.63	C	活率(%)	96.30±1.71	73.67±4.55	23.50		
	密度(10 <sup>6</sup> )	6.67±0.44	2.35±0.18	64.77		密度(10 <sup>6</sup> )	6.50±0.50	4.32±0.43	33.54		
4	活率(%)	96.11±0.53	6.56±2.13	93.17	D	活率(%)	96.30±1.71	73.38±4.06	23.80		
	密度(10 <sup>6</sup> )	7.17±0.33	2.17±0.47	69.74		密度(10 <sup>6</sup> )	6.48±0.62	4.53±0.66	30.09		
5	活率(%)	96.11±0.53	1.96±0.96	97.96	E	活率(%)	96.30±1.71	19.92±2.80	79.31		
	密度(10 <sup>6</sup> )	7.38±0.94	2.15±0.22	70.87		密度(10 <sup>6</sup> )	6.42±0.33	4.37±0.54	31.93		

接影响精子体外保存的效果。

$\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 是精浆的重要组分,也是构成精浆渗透压的主要离子。 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 离子在无脊椎动物精子活动中具有重要作用(鲁大椿等, 1992),其中 $\text{Na}^+$ 是精子启动及运动维持的重要离子(王春年等, 1993),但研究已证实,该离子几乎不能引起中华绒螯蟹的顶体反应(堵南山等, 1987a, b; 1988);而 $\text{K}^+$ 外流则会引起膜的去极化,导致 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 的内流,促进精子的顶体反应,从而引起精子的死亡(陈大元, 2000)。本研究结果发现, $\text{K}^+$ -FASW(无钾离子人工海水)保存液的保存效果极差,4天后的存活率仅为2.42%;而同样不含 $\text{K}^+$ 的单一 $\text{NaCl}$ 海水等渗保存液(与天然海水渗透压相同)在保存中华绒螯蟹精子6天后,其存活率仍超过80%(陈东华等, 2007)。同样不含 $\text{K}^+$ 的两种保存液,其保存效果截然相反,其原因可能与两种保存液中的离子成分有关,尤其是其中的 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ;单一 $\text{NaCl}$ 海水等渗保存液中不含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等其他离子,故细胞内 $\text{K}^+$ 的外流无法导致外环境中 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 内流而诱发顶体反应;然而, $\text{K}^+$ -FASW中却含有足量的 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ,这些离子的内流可能最终导致了顶体反应的发生,从而造成精子的大量死亡。

研究表明(Dan, 1956),精子的顶体反应依赖胞外的 $\text{Ca}^{2+}$ ,精浆中的 $\text{Ca}^{2+}$ 与精子膜上的CaM(钙调蛋白, Calmodulin)结合,可导致 $\text{Ca}^{2+}$ 内流而引起顶体反应,同时 $\text{Ca}^{2+}$ 在顶体反应中能促进顶体膜和其外的质膜发生融合,使顶体囊内物质发生胞吐作用;因此, $\text{Ca}^{2+}$ 是精子获能和顶体反应的关键因素。本研究结果表明, $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW和ASW均含有大量的 $\text{Ca}^{2+}$ ,其保存效果差, $\text{Ca}^{2+}$ -FASW(无钙离子人工海水)不含 $\text{Ca}^{2+}$ ,其保存效果较好;而电镜的观察亦证实, $\text{K}^+$ -FASW、 $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW和ASW保存效果差的主要原因是大量精子发生顶体反应;因此,本实验结果再次证明了, $\text{Ca}^{2+}$ 是诱发精子顶体反应、影响精子保存效果的关键因素。

此外,本研究结果还表明, $\text{Mg}^{2+}$ -FASW(无镁离子人工海水)与 $\text{Ca}^{2+}$ -FASW一样具有很好的保存效果。进一步的研究发现,在 $\text{Mg}^{2+}$ -FASW和 $\text{Ca}^{2+}$ -FASW的基础上,分别逐量添加 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 后,精子存活率均随两种离子浓度的增加而呈明显的下降趋势,即显著负相关,其中较低的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度即可诱发精子的顶体反应,而 $\text{Mg}^{2+}$ 的影响相对较小,其原因可能与 $\text{Mg}^{2+}$ 影响 $\text{Ca}^{2+}$ 的转运有

关。 $\text{Mg}^{2+}$ 是细胞内很多酶的激活剂,任何使ATP水解和磷酸基转移的反应都需要 $\text{Mg}^{2+}$ 作为激活剂; $\text{Mg}^{2+}$ 在肌浆中通过参与ATP的分解过程,可使 $\text{Ca}^{2+}$ 逆浓度差由胞外转运至胞内,而细胞内 $\text{Mg}^{2+}$ 水平低下则会降低 $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP酶活性,从而减少对 $\text{Ca}^{2+}$ 的吸收(Resnick *et al*, 1991; Delva *et al*, 1996)。因此,可以推断 $\text{Mg}^{2+}$ -FASW之所以具有较好的保存效果,可能与 $\text{Mg}^{2+}$ 的缺乏而导致 $\text{Ca}^{2+}$ 逆浓度差转运受阻,避免了因 $\text{Ca}^{2+}$ 进入而诱发顶体反应有关。

从上述的研究结果可以得出以下结论: $\text{Ca}^{2+}$ 可诱导精子的顶体反应,是影响中华绒螯蟹精子保存效果的关键性离子; $\text{K}^+$ 的缺乏可引起 $\text{Ca}^{2+}$ 的内流而最终导致精子发生顶体反应,影响中华绒螯蟹精子的保存效果;而 $\text{Mg}^{2+}$ 的缺乏则可减少对 $\text{Ca}^{2+}$ 的吸收,避免精子发生顶体反应,从而间接提高了中华绒螯蟹精子的保存效果; $\text{Mg}^{2+}$ -FASW和 $\text{Ca}^{2+}$ -FASW一样均可作为中华绒螯蟹精子短期保存较适宜的保存液。

#### 参 考 文 献

- 马强,王群,李恺等, 2006. 酶消化法和匀浆法获得河蟹游离精子的比较研究. 华东师范大学学报(自然科学版), 3: 82—87
- 马强,丁银娣,曲迪等, 2007. 伊红、台盼蓝检测河蟹精子存活率的比较研究. 动物学杂志, 42(4): 65—69
- 王春年,谢文英, 1993. 离子与精子启动及顶体反应. 男性学杂志, 7(2): 117—118
- 陈大元, 2000. 受精生物学. 北京: 科学教育出版社, 107—109
- 陈东华,周忠良,范丽君等, 2007. 保存液及保存条件对中华绒螯蟹精子存活率的影响. 华东师范大学学报(自然科学版), 4: 86—94
- 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
- 堵南山,赖伟,薛鲁征, 1987a. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)精子顶体反应的研究. 动物学报, 33(1): 8—13
- 堵南山,赖伟,薛鲁征, 1987b. 中华绒螯蟹精子研究. 精子的形态及超微结构. 海洋与湖沼, 18(2): 119—125
- 堵南山,赖伟,薛鲁征, 1988. 中华绒螯蟹精子研究 II. 精子发生. 海洋与湖沼, 19(1): 71—75
- 鲁大椿,刘宪亭,方建萍等, 1992. 我国主要淡水养殖鱼类精浆的元素组成. 淡水渔业, 2: 10—12
- Anchordoguy T J, Crowe J H, Griffin F J *et al*, 1988. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. Cryobiology, 25: 238—243
- Bhavanishankar S, Subraminiam T, 1997. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) . J Exp Zool, 277: 326—333

- Bray W A, Lawrence A L, 1998. Male viability determinations in *Penaeus annamensis*: evaluation of short-term storage of spermatophores up to 36h and comparison of Ca-free saline and seawater as sperm. *Aquaculture*, 160(1—2): 63—67
- Dan J C, 1956. The Acrosome Reaction. In: Bourne G H ed. *International Review of Cytology*, Vol.V. New York: Academic Press, 5: 365—393
- Delva P T, Pastori C, Degan M *et al*, 1996. Intralymphocyte free magnesium in a group of subjects with essential hypertension. *Hypertension*, 28: 433—439
- Tan-Fermin J D, Adachi S, Adachi S, 1999. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). *Aquaculture*, 171: 323—338
- Leung-Trujillo J R, Lawrence A L, 1987. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus serilferus* under laboratory conditions. *Aquaculture*, 65: 363—370
- Resnick L M, Gupta P K, Bhargava K K *et al*, 1991. Cellular ions in hypertension, diabetes and obesity. A nuclear magnetic resonancespectroscopy study. *Hypertension*, 17: 951—957
- Stoss J, 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar W S, Randall D J, Donaldson E M ed. *Fish Physiology*, Vol.IXB. New York: Academic Press, 305—350
- Tereza C V, Gesteira K Halcrow, 1988. Influence of some external factors on the acrosome reaction in the spermatozoa of *Homarus americanus* M.. *Journal of Crustacean Biology*, 8(3): 317—321

## THE VIABILITY RATE OF *ERIOCHEIR SINENSIS* SPERMS *IN VITRO* IN PRESERVATION SOLUTIONS OF $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ AND $\text{K}^+$ AT DIFFERENT CONCENTRATIONS

CHEN Dong-Hua, LI Yan-Dong, JIA Lin-Zhi, LI Xiao-Bo,  
WANG Li-Ren, SUN Ju-Xiang, WANG Qun  
(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai, 200062)

**Abstract** The viability rate of *in vitro* sperms of *Eriocheir sinensis* preserved in five solutions at 4 was studied with eosin stain to evaluate the impact from metal ions. The five preservation solutions (Tab.1) included artificial seawater (ASW), 2-fold calcium ion artificial seawater ( $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW), magnesium-free artificial seawater ( $\text{Mg}^{2+}$ -FASW), potassium-free artificial seawater ( $\text{K}^+$ -FASW) and calcium-free artificial seawater ( $\text{Ca}^{2+}$ -FASW). Results show that the sperms preserved in  $\text{K}^+$ -FASW, ASW, and  $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW were completely killed 4 days later because of acrosome reaction. However, most of the sperms in  $\text{Mg}^{2+}$ -FASW and  $\text{Ca}^{2+}$ -FASW remained alive in the same period. Therefore,  $\text{Mg}^{2+}$ -FASW and  $\text{Ca}^{2+}$ -FASW can be ideal solutions for preserving *E.sinensis* sperms *in vitro*, but  $\text{K}^+$ -FASW, ASW, and  $2 \times \text{Ca}^{2+}$ -ASW. Furthermore, the viability rate was also checked with different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . As the concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  incremented, the viability rate dropped in 24 hour, indicating that  $\text{Ca}^{2+}$  could lead to mass mortality of the sperms due to acrosome reaction. Inverse correlation was found between the viability rate and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  played a key role in e  $\text{K}^+$ -free preservation solutions. The good performance of  $\text{Mg}^{2+}$ -FASW is probably due to the prohibition of  $\text{Ca}^{2+}$  transportation against the concentration difference, so that  $\text{Ca}^{2+}$  was kept away from entering the sperms resulting in acrosome reaction.

**Key words** *Eriocheir sinensis*, Spermatozoa, Low temperature preservation, Preservation solution,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$