

DOI: 10.12264/JFSC2022-0398

不同倍性长牡蛎闭壳肌和精子的组织学和超微结构观察

董璐瑶^{1,2}, 赵丽艳¹, 张恩烁³, 李洲⁴, 李赞³, 王卫军^{1,2,3}, 杨建敏³

1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东 烟台 264006;

3. 鲁东大学农学院, 山东 烟台 264025;

4. 芝罘区现代海洋产业发展促进中心, 山东 烟台 264000

摘要: 以二倍体、三倍体、四倍体长牡蛎(*Crassostrea gigas*)闭壳肌和精子为研究对象, 采用石蜡组织切片、透射电镜和扫描电镜方法, 比较了 3 种倍性长牡蛎闭壳肌和精子的组织学特性及超微结构的差异。研究结果显示, 二、三、四倍体闭壳肌组织的肌纤维都包含粗肌丝、细肌丝、肌膜、肌束膜、肌内膜、线粒体、囊泡、小管、细胞核、肌浆网等结构, 但三者的形态及超微结构不同, 其中三倍体闭壳肌线粒体直径、肌纤维直径、粗肌丝密度显著大于二倍体和四倍体, 肌纤维密度显著小于二倍体和四倍体。不同倍性精子的扫描电镜和透射电镜结果显示, 二、三、四倍体长牡蛎精子在组成结构上相似, 分别由头部、中段和尾部构成, 但不同倍性精子中各结构大小和线粒体数目不同。在长牡蛎精子头部长度、宽度, 顶体高度、宽度, 线粒体长度的测量分析中, 四倍体精子的头部、顶体以及线粒体显著大于二、三倍体。三倍体精子的头部和顶体显著大于二倍体, 但三倍体精子的线粒体大小与二倍体相比无显著差异。此外, 二、三倍体精子均含 4 个线粒体, 但在本研究中发现二倍体精子含有 5 个(占比 1%)线粒体的特例。四倍体长牡蛎精子的线粒体数目不同, 含有 4 个(占比 46%)、5 个(占比 52%)、6 个(占比 2%)这 3 种情况。该研究阐明了不同倍性长牡蛎闭壳肌及精子的组织学特性和超微结构, 为深入研究长牡蛎肌纤维生物学特性和精子繁育生物学提供了基础资料。

关键词: 长牡蛎; 闭壳肌; 精子; 二倍体; 三倍体; 四倍体; 超微结构

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)04-0433-14

自然界中普遍存在二倍体长牡蛎(*Crassostrea gigas*), 但其三倍体和四倍体则需通过染色体操作技术获得。长牡蛎三倍体由于其性腺不发育或育性差, 在养殖过程中具有明显优势, 肉质性状优良, 生长速度快, 并具有一定的抗病能力^[1-3], 深受养殖户和消费者喜爱。二倍体卵子和四倍体精子“杂交”可产生 100%全三倍体, 这为实现三倍体长牡蛎规模化产业生产提供了保障, 同时也是四倍体长牡蛎最大的经济价值体现^[4]。长牡蛎营固着生活, 属于单柱形双壳贝类。其中, 闭壳肌是长

牡蛎肌肉组织的重要组成部分, 对牡蛎的生长、储能、新陈代谢等生命活动过程起着重要作用^[5]。有研究发现, 闭壳肌的收缩力度是评判牡蛎健康指标的尺度标准^[6], 闭壳肌拉力是贝类强壮程度的生理性状评判指标^[7]。闭壳肌拉力较高的家系在夏季死亡率较小, 且拉力性状可以遗传给后代, 故闭壳肌拉力可作为衡量高成活率群体选育的标准^[7]。而不同倍性长牡蛎的闭壳肌拉力之间具有显著差异, 其中三倍体长牡蛎的闭壳肌拉力显著大于二倍体和四倍体(本项目组未发表数据)。因

收稿日期: 2022-12-18; 修订日期: 2023-01-18.

基金项目: 国家贝类产业技术体系项目(CARS-49); 山东省农业良种工程项目(2020LZGC016); 中央引导地方科技发展资金项目(YDZX2021017); 烟台市水产种业提升项目(YHYH[2022]24).

作者简介: 董璐瑶(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为贝类遗传育种. E-mail: dly6568@163.com

通信作者: 王卫军, 博士, 教授, 研究方向为海洋无脊椎动物遗传育种和繁殖生物学. E-mail: wwj2530616@163.com;

此, 研究不同倍性长牡蛎闭壳肌的形态及超微结构, 可从组织学层面来探究其闭壳肌拉力指标产生差异的原因, 对进一步优化多倍体长牡蛎的人工繁育体系具指导意义。长牡蛎闭壳肌可分为平滑肌和横纹肌, 平滑肌与横纹肌之间密切结合但界限明显^[8], 平滑肌为不透明的白色部分, 主要负责双壳保持长时间闭合的状态, 而横纹肌呈现半透明的状态, 主要负责使双壳快速闭壳^[9-11]。Hoyle 等^[12]和 Elliott^[13]的研究主要是关于平滑肌和横纹肌收缩机制、生理特性等方面, 而对于不同倍性长牡蛎闭壳肌的形态结构及超微结构的研究尚未见报道。本研究主要通过石蜡组织切片和透射电镜法, 探究二倍体、三倍体和四倍体长牡蛎闭壳肌横纹肌之间的组织学特征和超微结构, 丰富了不同倍性长牡蛎闭壳肌生理特性的基础研究数据。

精子超微结构是繁育生物学主要研究课题。目前, 国内外已经对一些水产动物不同倍性群体的精子超微结构进行观察。Psenicka 等^[14]研究报告, 在西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)中, 发现六倍体精子的顶体、头部、中段和鞭毛显著大于四倍体。Komaru 等^[15]在贻贝(*Mytilus edulis*)中发现四倍体精子头部和顶体显著大于二倍体, 且某些四倍体精子出现线粒体增多的情况。在姜波^[16]的研究中发现, 四倍体长牡蛎精子与二倍体“杂交”后生产三倍体的受精率远远小于二倍体自繁的受精率, 而四倍体与二倍体精子在形态、构造上无明显区别, 但在尺寸上四倍体精子的头部、顶体及线粒体都要显著大于二倍体精子。目前, 虽然有对长牡蛎二倍体、三倍体及四倍体精子的超微结构单独的研究报道^[17-18], 但缺乏系统的比较。本研究采用扫描电镜和透射电镜方法研究二倍体、三倍体和四倍体长牡蛎精子的超微结构, 旨在阐明不同倍性长牡蛎精子外部特征及内部的超微结构, 并比较精子的形态结构、精子成分的线性尺寸、线粒体数量上的差异。通过对不同倍性长牡蛎精子超微结构进行比较研究, 有助于了解不同倍性长牡蛎间受精机制和精子质量的差异, 可为多倍体长牡蛎繁育以及人工育种提供

基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2022 年 6 月于山东省烟台市崆峒岛育种基地(121°30'9" E, 37°33'42" N)选取不同倍性二龄性成熟雄性长牡蛎个体各 30 只, 其壳体完整、活性强, 其生长性状指标范围为: 壳高 7~11 cm, 壳长 5~7 cm, 壳宽 2~4 cm, 湿重 55~100 g。通过滴水镜检法鉴别雌雄, 分别选取长牡蛎二倍体和四倍体雄性发育饱满的个体, 选取长牡蛎三倍体雄性性腺发育的个体各 3 只, 分别取各倍性长牡蛎闭壳肌组织和精巢组织, 且组织切片与电镜观察的样品为同一个体。

1.2 实验方法

1.2.1 光学显微镜样本制备 将不同倍性长牡蛎的新鲜闭壳肌组织的横纹肌(呈半透明状态)切成 5 mm³ 大小的组织块, 置于 4%多聚甲醛中固定 24 h。倒净固定液后, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗两遍, 然后使用梯度无水乙醇(85%、95%、100%)进行脱水, 在二甲苯中进行透明, 对样品进行石蜡包埋后用组织切片机切片, 厚度为 5 μm。二甲苯脱蜡处理后, 进行常规 H.E 染色, 中性树胶封片, 并在光学显微镜(DS-FI2)下观察并拍照。

1.2.2 透射电镜样本制备 将性腺发育成熟的不同倍性长牡蛎解剖后, 在 4 °C 的低温环境下利用刀片分别切取闭壳肌组织及精巢组织各 2 mm³, 分别取 3 个重复, 取样时刀片要向一个方向切动, 幅度要小, 尽量避免组织受到机械损伤。样品经 4 °C 预冷的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗后, 放入 2.5%戊二醛固定液中, 避光条件下 4 °C 固定 4 h 后, 倒出固定液, 加入新的 2.5%的戊二醛固定液过夜保存。在 4 °C 的环境下用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 15 min, 并漂洗 3 遍。用新鲜配制的 1%的锇酸固定液固定 2 h。吸出锇酸后, 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 15 min, 漂洗 3 次。再依次用梯度乙醇(30%、50%、70%、80%、90%、100%、100%)、乙醇: 丙酮(3: 1、1: 1、1: 3)、丙酮(2 次)脱水, 每次 10 min, 包埋剂包埋, 纯包

埋剂固化后高温聚合。超薄切片机切片, 切片厚度为 70~80 nm, 5%醋酸铀-柠檬酸铅双重染色法染色并制片。使用透射电子显微镜(JEM-1200EX)进行样品观察、拍摄, 最大加速电压为 80 kV。

1.2.3 扫描电镜样本制备 将不同倍性性腺发育成熟的长牡蛎解剖后, 取 2 mm³ 的闭壳肌及精巢组织置于 4 ℃ 下 2.5% 的戊二醛固定液中固定 4 h 后, 更换新的固定液过夜保存。样品中加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 离心清洗(1000 r/min, 5 min) 3 次, 缓慢倒出上层清液。使用乙醇梯度(30%、50%、70%、80%、90%)脱水各 1 次, 100%乙醇脱水 2 遍各 8 min。使用醋酸异戊酯置换 20 min 后。经常规 CO₂ 临界点干燥, 用离子溅射仪在样品上喷镀铂金膜后, 放置于扫描电镜(JSM-840)下观察、摄像。

1.3 统计分析

1.3.1 闭壳肌肌纤维直径、密度及粗肌丝密度的测定 使用 10×40 倍光学显微镜(DS-FI2)拍照获得的闭壳肌图片, 利用 ImageJ (National Institutes of Health, 美国)软件, 分别圈出并测量不同倍性肌纤维的长径和短径。每张切片随机选取 5 个视野, 保持视野大小一致, 在每个视野中测量 10 条, 并将长径和短径的几何平均值作为肌纤维的直径^[19]。并将光学显微镜获得的肌纤维横切照、透射电镜获得的粗肌丝横切照, 通过 ImageJ 计算每个相同大小视野中的肌纤维和粗肌丝的数量, 分别换算成每 mm²、μm² 中的根数, 作为样本的肌纤维及粗肌丝密度^[20]。

1.3.2 精子超微结构线性尺寸测量 将透射电镜和扫描电镜拍照获得的二倍体、三倍体和四倍体的精子图片, 通过 ImageJ 软件分别对典型精子(具有轴杆)的头长、头宽、顶体高、顶体宽及线粒体长进行测量(图 1), 测量数目 $n=20$ 。

1.3.3 数据分析 采用 IBM SPSS statistics 23 统计软件完成实验数据的统计分析, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)实现对各组数据的组间差异统计分析, 并用 Turkey 法进行组间多重比较, 所有数据都以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 差异显著度为 0.05。

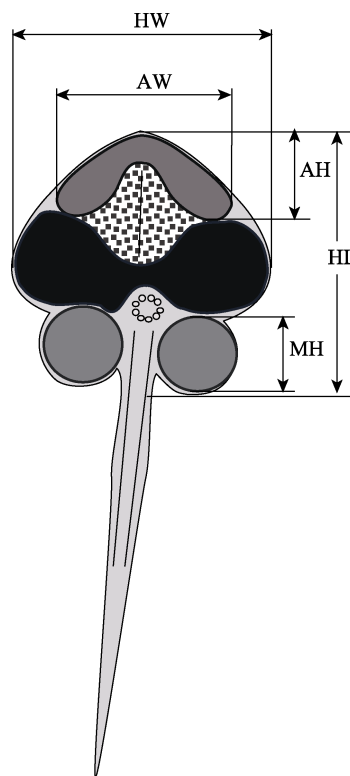


图 1 长牡蛎精子组织结构及电镜测量方案图

HW: 头宽; AW: 顶体宽; AH: 顶体高;

HL: 头长; MH: 线粒体长。

Fig. 1 Sperm structure and electron microscopy measurement scheme of *Crassostrea gigas*

HW: Head width; AW: Acrosome width; AH: Acrosome height; HL: Head length; MH: Mitochondrial height.

2 结果与分析

2.1 二倍体、三倍体、四倍体长牡蛎闭壳肌形态结构差异比较

2.1.1 闭壳肌形态结构的组织切片观察 在光学显微镜(100 倍和 400 倍)下分别对不同倍性长牡蛎闭壳肌的横切面进行观察(图 2), 胶原纤维呈现淡红色, 而肌纤维呈现出亮红色; 细胞核和核糖体则呈现出蓝黑色; 结缔组织主要由胶原蛋白组成, 从大到小分别是肌膜、肌束膜、肌内膜。

石蜡组织切片结果表明, 二倍体、三倍体和四倍体长牡蛎闭壳肌(横纹肌)横切图肌纤维形态上存在明显差异。二倍体长牡蛎闭壳肌横纹肌肌纤维横切面为不规则的块状, 细胞核位于肌纤维的边缘, 肌纤维间有大量的结缔组织, 少部分肌纤维单独存在, 肌束膜较少, 肌膜间隙最小(图 2a,

b)。三倍体闭壳肌肌纤维横切面呈不规则的长条状分布,且肌纤维与肌纤维间多出现相互嵌合态分布,肌纤维排列也更为紧密,且肌纤维与结缔组织间隙也较二倍体更小,大量肌纤维成束或成层分布,肌束膜比二倍体及四倍体多(图 2c, 2d)。

四倍体闭壳肌肌纤维横切面呈不规则条块状分布,肌纤维未完全与细胞长轴平行排列,故横切面在出现边缘规整肌纤维的同时,存在肌纤维黏着成团现象。少量肌纤维单独存在,大部分肌纤维成束分布,肌膜间隙最大(图 2e, 2f)。

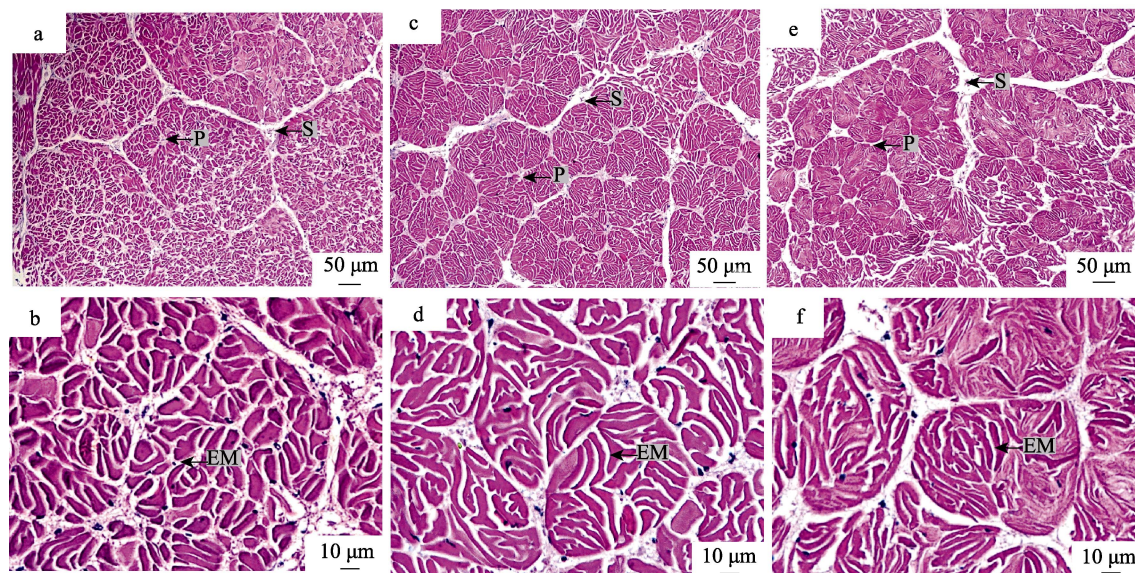


图 2 不同倍性长牡蛎闭壳肌(横纹肌)组织切片

图 a, c, e 分别为二倍体、三倍体、四倍体闭壳肌(横纹肌) 100 倍光学显微镜下的横切图;

图 b, d, f 分别为二倍体、三倍体、四倍体闭壳肌(横纹肌) 400 倍光学显微镜下的横切图; S: 肌膜; P: 肌束膜; EM: 肌内膜。

Fig. 2 Tissue sections of the adductor muscle (striated muscle) of different ploidy *Crassostrea gigas*

Figures a, c, and e are the cross-sections of the diploid, triploid, and tetraploid adductor muscle (striated muscle) under a 100× light microscope; Figures b, d, and f are the cross-sections of the diploid, triploid, and tetraploid adductor muscle (striated muscle) under a 400× light microscope; S: Sarcolemma;

P: Perimysium; EM: Endomysium.

对不同倍性长牡蛎闭壳肌横纹肌的肌纤维直径、肌纤维密度进行统计分析。其中,二倍体长牡蛎肌纤维直径为 $(8.86 \pm 0.77) \mu\text{m}$,三倍体肌纤维直径为 $(21.15 \pm 0.73) \mu\text{m}$,四倍体肌纤维直径为 $(15.15 \pm 0.87) \mu\text{m}$,三者差异显著($P < 0.05$);二倍体肌纤维密度为 $(14120 \pm 1107.35) \text{根}/\text{mm}^2$,三倍体肌纤维密度为 $(7260 \pm 457.52) \text{根}/\text{mm}^2$,四倍体肌纤维密度为 $(9520 \pm 505.08) \text{根}/\text{mm}^2$,三者存在显著性差异($P < 0.05$)。三倍体长牡蛎闭壳肌横纹肌肌纤维直径显著大于二倍体和四倍体,肌纤维密度显著低于二倍体和四倍体。

2.1.2 闭壳肌超微结构的透射电镜观察 研究表明,不同倍性长牡蛎横纹肌肌纤维结构相似,均包含粗肌丝、细肌丝、肌膜、线粒体、囊泡、

小管、细胞核以及肌浆网(图 3)。粗肌丝呈圆形或卵圆形,不同倍性长牡蛎粗肌丝直径不同,50~150 nm 不等;粗肌丝周围环绕分布着细肌丝,不同倍性长牡蛎粗肌丝与粗肌丝间的直线距离不同,其中三倍体长牡蛎粗肌丝间的直线距离显著小于二倍体和四倍体($P < 0.05$,图 3a, 3b, 3c)。在相邻肌纤维之间存在着肌膜、囊泡、小管、肌浆网及少量的胶原纤维,囊泡和卵球形小管平行于肌纤维的纵轴,它们之间彼此互通,共同构成肌浆网。其中,三倍体肌纤维之间的囊泡和小管数量最多,而二倍体、四倍体肌纤维间的数量较少(图 3g, 3h, 3i);四倍体肌纤维之间肌膜界限明显、厚度较大,而三倍体肌纤维间的肌膜大多与囊泡、小管黏合,厚度最小(图 3a, 3b, 3c)。不同

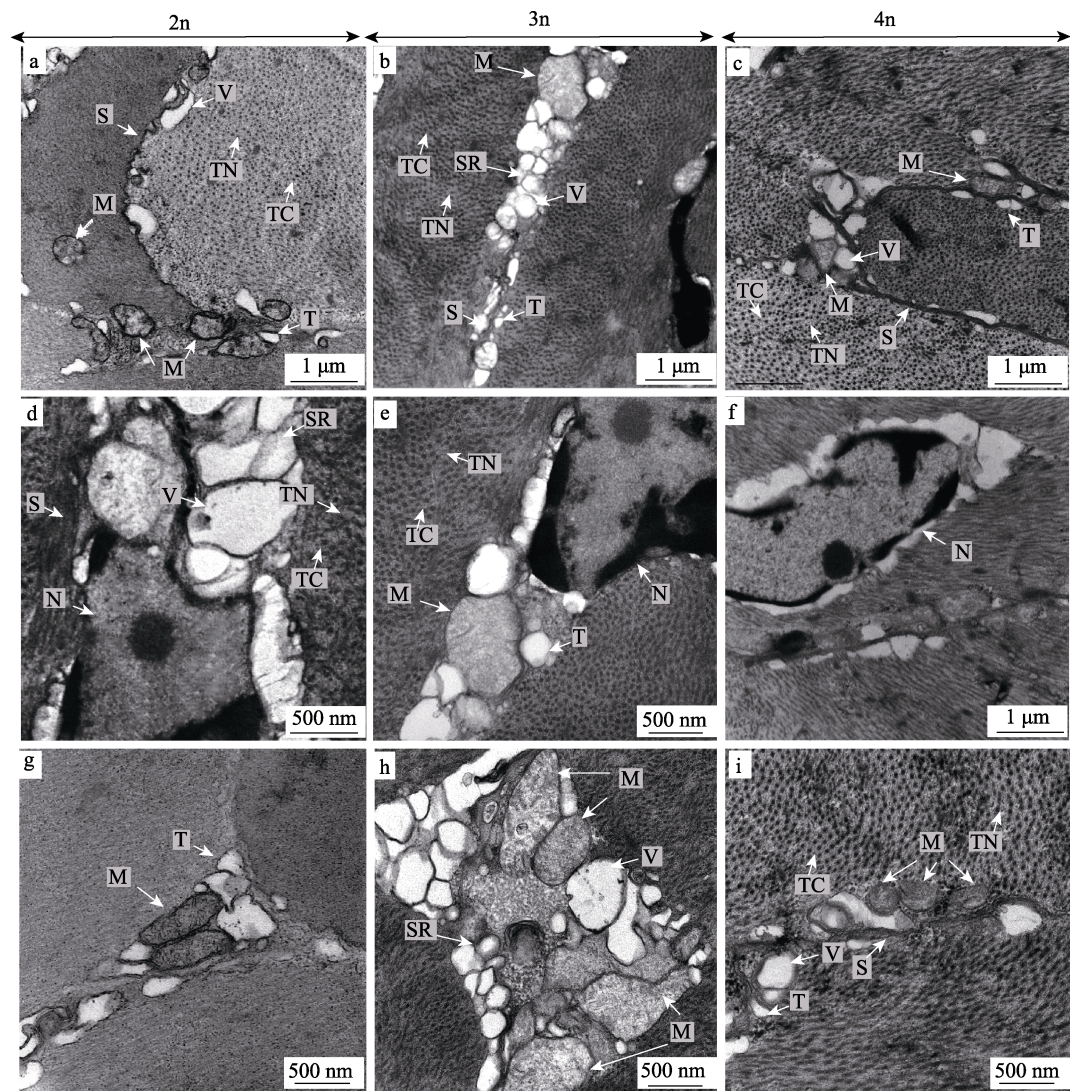


图 3 不同倍性长牡蛎闭壳肌透射电镜

图 a, d, g 为二倍体(2n)闭壳肌透射电镜图; 图 b, e, h 为三倍体(3n)闭壳肌透射电镜图; 图 c, f, i 为四倍体(4n)闭壳肌透射电镜图; 2n、3n、4n 的 3 组重复为同一个体不同部位的重复。S: 肌膜; M: 线粒体; V: 囊泡; T: 小管; N: 细胞核; TN: 细肌丝; TC: 粗肌丝; SR: 肌浆网。

Fig. 3 Transmission electron microscopy of the adductor muscle of different ploidy *Crassostrea gigas*

Figures a, d, and g are transmission electron micrographs of diploid (2n) adductor; Figures b, e, and h are the transmission electron micrographs of triploid (3n) adductor muscle; Figures c, f, and i are the transmission electron micrographs of tetraploid (4n) adductor muscle; the three sets of repeats of 2n, 3n, and 4n were repeated at different parts of the same body.

S: Sarcolemma; M: Mitochondrion; V: Vesicles; T: Tubules; N: Nucleus; TN: Thin myofilament; TC: Thick myofilament; SR: Sarcoplasmic reticulum.

倍性间肌细胞的形态和大小无显著差异(图 3d, 3e, 3f)。肌细胞的线粒体大多分布于细胞膜和肌膜附近, 与肌纤维纵轴的方向平行, 其中三倍体长牡蛎肌纤维间中存在着大量异形线粒体, 而二倍体和四倍体闭壳肌中线粒体多为球状或椭球形(图 3g, 3h, 3i)。

对不同倍性长牡蛎闭壳肌横纹肌的线粒体直

径、粗肌丝密度进行统计分析。其中, 二倍体长牡蛎闭壳肌中线粒体直径为 $(0.67\pm0.08)\mu\text{m}$, 三倍体长牡蛎闭壳肌中线粒体直径为 $(0.96\pm0.13)\mu\text{m}$, 四倍体长牡蛎闭壳肌中线粒体直径为 $(0.40\pm0.05)\mu\text{m}$, 三倍体闭壳肌中的线粒体大小显著大于二倍体和四倍体($P<0.05$), 四倍体闭壳肌中的线粒体线性尺寸最小。二倍体粗肌丝密度为 (116 ± 12.85)

根/ μm^2 , 三倍体粗肌丝密度为 (240 ± 17.78) 根/ μm^2 , 闭壳肌粗肌丝密度显著大于二倍体和四倍体, 二倍体的粗肌丝密度最低(表 1)。

表 1 二倍体、三倍体、四倍体牡蛎闭壳肌形态大小比较

Tab. 1 Comparison of morphology and size of diploid, triploid, and tetraploid adductor muscle of *Crassostrea gigas* n=10

参数 parameter	二倍体 diploid	三倍体 triploid	四倍体 tetraploid
线粒体直径/ μm mitochondria diameter	0.67 ± 0.08^a	0.96 ± 0.13^b	0.40 ± 0.05^c
肌纤维直径/ μm muscle fiber diameter	8.86 ± 0.77^a	21.15 ± 0.73^b	15.15 ± 0.87^c
肌纤维密度/(根/ mm^2) muscle fiber density	14120 ± 1107.35^a	7260 ± 457.52^b	9520 ± 505.08^c
粗肌丝密度/(根/ μm^2) thick myofilament density	116 ± 12.85^a	240 ± 17.78^b	169 ± 16.12^c

注: n 表示统计数目, 同行数据肩标不同字母表示差异显著($P<0.05$), 相同字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$).
Note: n indicates the calculated number, different letters of the shoulder band of peer data indicated significant differences ($P<0.05$), and the same letters indicated that the difference was not significant ($P>0.05$).

2.2 二倍体、三倍体、四倍体长牡蛎精子超微结构的差异比较

2.2.1 精子扫描电镜观察 在整体形态上, 不同倍性长牡蛎精子均由顶体复合体、细胞核、中段和鞭毛组成, 并分为 3 部分: 头部、中段和尾部(图 4a, 4b, 4c)。头部整体近似钝圆锥形, 前端有一明显突出的结构为顶体。头部下方为长牡蛎精子的中段, 由环绕在其周边紧密排列的线粒体所构成。在以往研究报道中, 二倍体及三倍体的精子中段均由 4 个线粒体(图 4e, 4a, 4b, 4c)围绕中心粒复合体构成, 而在本研究中首次发现具 5 个线粒体的二倍体精子(图 4g, 4b), 占比 1%(统计 200 个二倍体精子)。三倍体精子畸形率较高, 常见畸形有头部形态不规整(图 4e), 线粒体异形(图 4h 中白色箭头所示), 尾部鞭毛主段同时出现 2 个“9+2”结构的异形态等(图 4h 中黄色箭头所示)。四倍体牡蛎精子所含线粒体数目不同, 现已发现含 4 个、5 个、6 个线粒体的精子, 占比分别为 46%, 52%, 2% (图 4c, 4f, 4i; 图 6d, 6e, 6f)。同时, 四倍体牡蛎精子线粒体的排列出现多层现象, 且线粒体大小具有差异(图 4f, 6d)。精子尾部鞭毛细长, 近头部较粗远端渐细, 主段均匀, 近尾端则逐渐变细。

2.2.2 精子头部及中段的透射电镜观察 不同倍性长牡蛎精子头部都包括顶体、亚顶体腔和细胞核。其中, 顶体(acrosome, AC)是高尔基体的衍生物, 被高尔基体膜包裹, 一般呈帽状, 顶体囊泡稍内陷。顶体膜和核膜均为双层膜, 两层膜排列

紧密, 膜间腔基本不可见(图 5a, 5b, 5c)。其中内层是特别薄的单位膜, 与亚顶体腔相连, 称为顶体内膜。顶体外膜由小颗粒密集排列构成, 较厚且与细胞质接触。少量顶体前端存在小囊泡(图 5c)。亚顶体腔(sub-acrosomal cavity, SC)与顶体紧密相连, 处于顶体后面, 构造松散, 内部有细小颗粒(图 5a, 5b, 5c)。轴杆(axial rod, AR)是从核内陷的基部向前延伸到顶体顶端内表面的微丝结构, 由高电子密度的微丝束构成(图 5a, 5c)。细胞核(nucleus, N)为头部的主要组成部分, 染色质高度密集凝聚, 电子密度高于顶体, 占头部的绝大部分体积。核前端有一较大半钝圆锥形凹陷, 与亚顶体腔相接, 故称核前窝(anterior nuclear fossa, ANF); 核后端有一弧形浅沟, 为核后窝(Posterior nuclear fossa, PNF), 在核边缘较不光滑或具有凹陷的地方, 称为缺刻(notch, NH), 此处无染色质分布(图 5a, 5b, 5c)。

不同倍性长牡蛎精子的中段, 是由环绕着中心粒复合体的线粒体所构成。其中, 中心粒复合体是由彼此垂直排列的远端中心粒和近端中心粒构成(图 5b)。近端中心粒(proximal centriole, PC)为横向分布, 更靠近染色质(图 6a, 6b), 远端中心粒(distal centriole, DC)为纵向分布, 靠近鞭毛并且向后延伸出了轴丝, 与近端中心粒相互垂直(图 6d, 6e)。中心粒的中心为三联体微管, 是一个圆柱形中空结构, 通常三联体中的一个微管要么缺失, 要么透明, 与每个中心粒周围排列的九套微管,

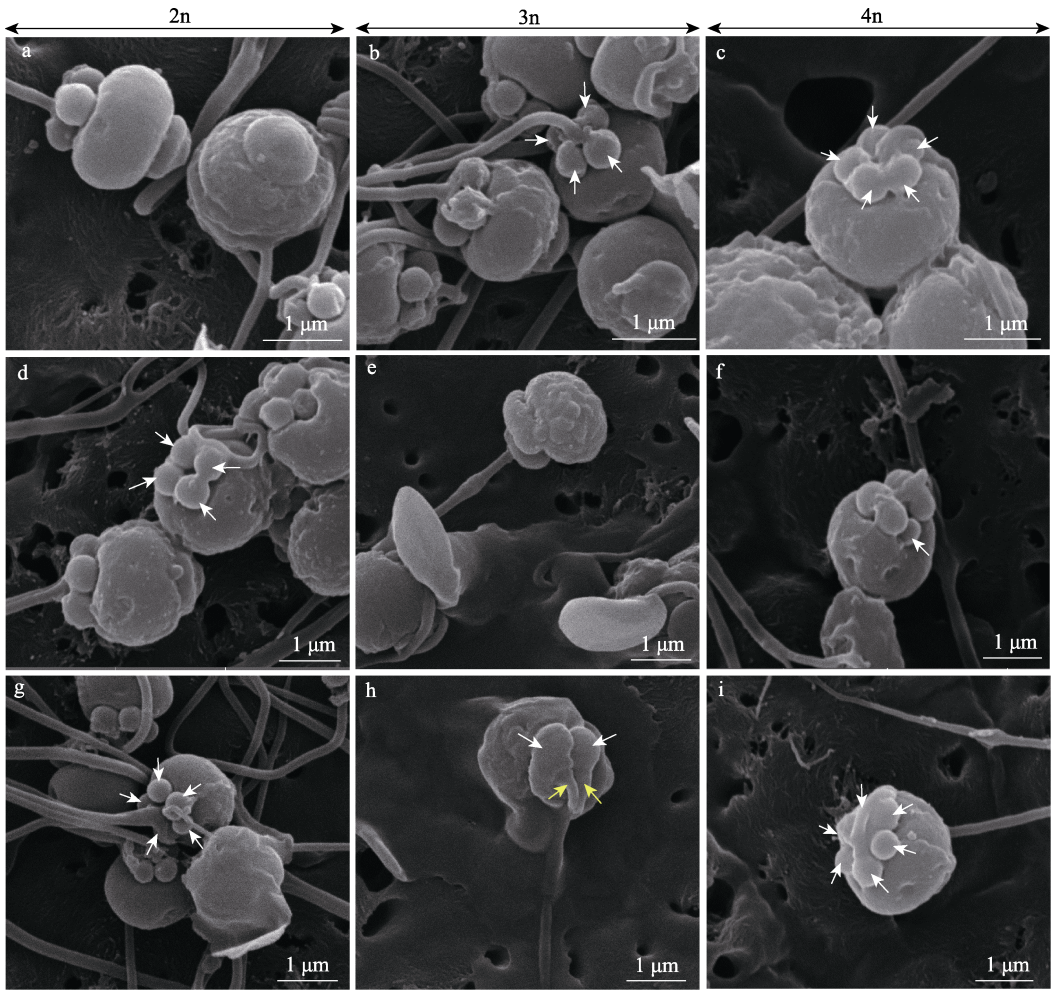


图 4 不同倍性长牡蛎精子扫描电镜

图 a, d, g 为二倍体(2n)精子扫描电镜图; 图 b, e, h 为三倍体(3n)精子扫描电镜图; 图 c, f, i 为四倍体(4n)精子扫描电镜图; 白色箭头表示线粒体, 黄色箭头表示远端中心粒位置; 2n、3n、4n 的 3 组重复为不同个体组织样品的重复。

Fig. 4 Different ploidy of sperm scanning electron microscope of *Crassostrea gigas*

Figures a, d, and g are scanning electron micrographs of diploid (2n) sperm; Figures b, e, and h are scanning electron micrographs of triploid (3n) sperm; Figures c, f, and i are the scanning electron micrographs of tetraploid (4n) sperm. The white arrow indicates the mitochondria, and the yellow arrow indicates the location of the distal centriole; the three sets of replicates of 2n, 3n, and 4n were replicates of different individual tissue samples.

共同形成“9+2”结构。线粒体(mitochondrion, M)具有双层膜结构,膜完整且电子密度较大,线粒体内部具排列不规则的嵴,其轮廓清晰可见(图 6),有些嵴在线粒体内延伸较长。线粒体周围存在许多囊泡(vesicles, V)及糖原颗粒(glycogen granules, G)(图 5a, b, c),其中在三倍体部分精子的线粒体中还发现了细胞质突起的现象(图 6-c)。

二倍体、三倍体、四倍体长牡蛎精子除大小及线粒体数目不同外,其超微结构均相似。通过对不同倍性长牡蛎精子外部形态特征进行测量分

析,发现四倍体长牡蛎精子的各测量指标均显著大于二倍体及三倍体。其中,四倍体长牡蛎精子的头部头长和头宽、顶体高度和宽度、线粒体直径大小的线性尺寸约为二倍体的 1.28 倍,约为三倍体精子的 1.17 倍。三倍体长牡蛎精子的头部和顶体也显著大于二倍体,但二倍体、三倍体精子线粒体直径差异不显著。虽然四倍体和三倍体精子顶体的高度和宽度分别显著大于二倍体精子,但不同倍性精子顶体高度与宽度的比值无显著性差异(表 2)。

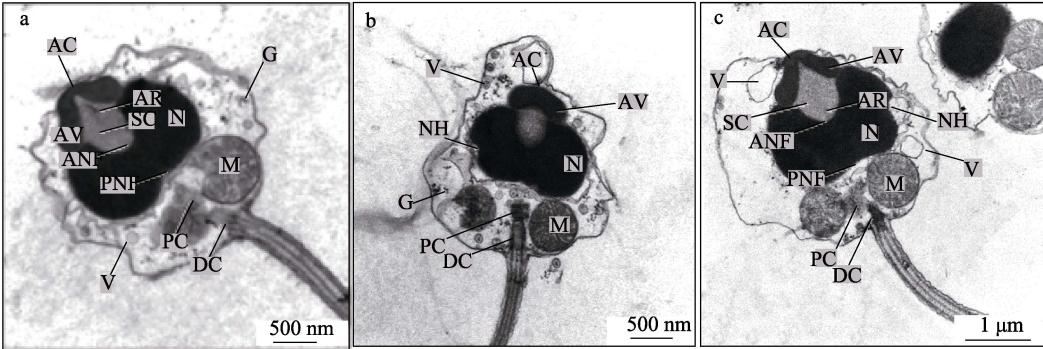


图 5 不同倍性长牡蛎精子头部和中段透射电镜

图 a, b, c 分别为二倍体、三倍体和四倍体精子头部及中段横切透射电镜图。

ANF: 核前窝; PNF: 核后窝; AC: 顶体; AV: 顶体囊泡; AR: 轴杆; SC: 亚顶体腔; PC: 近端中心粒; DC: 远端中心粒; V: 囊泡; N: 细胞核; M: 线粒体; NH: 缺刻; G: 糖原颗粒。

Fig. 5 Transmission electron microscopy of the sperm head and middle section of different ploidy *Crassostrea gigas*

Figures a, b, and c show the transmission electron microscopy transverse views of the head and middle section of diploid, triploid, and tetraploid sperm.

ANF: Anterior nuclear fossa; PNF: posterior nuclear fossa; AC: Acrosome; AV: Acrosomal vesicle; AR: Axial rod; SC: Sub-acrosomal Cavity; PC: Proximal centriole; DC: Distal centriole; V: Vesicles; N: Nucleus; M: Mitochondrion; NH: Notch; G: Glycogen granules.

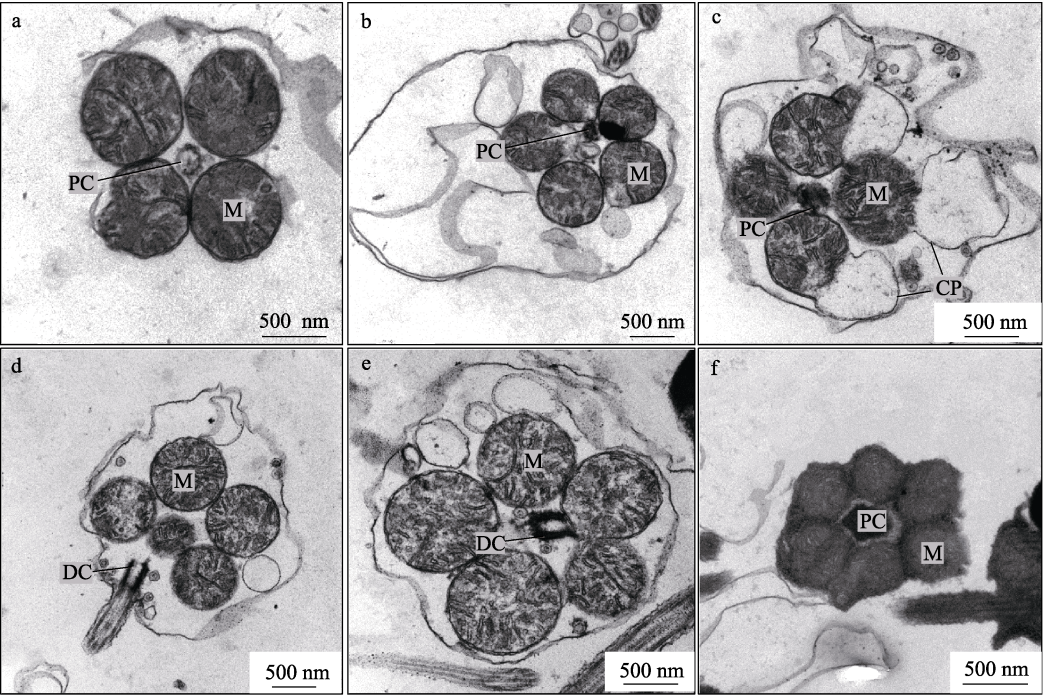


图 6 不同倍性长牡蛎精子中段透射电镜

图 a, b 为二倍体精子中段纵切透射电镜图; 图 c 为三倍体精子中段纵切透射电镜图;

图 d, e, f 为四倍体精子中段横切透射电镜图。

M: 线粒体; PC: 近端中心粒; DC: 远端中心粒; CP: 胞质突起。

Fig. 6 Transmission electron microscope of the middle segment of different ploidy *Crassostrea gigas* sperm

Figures a and b are transmission electron micrographs of the middle segment of diploid sperm; Figure c is the transmission electron microscopic image of the middle section of triploid sperm; Figures d, e, and f are the transmission electron micrographs of the middle segment of tetraploid sperm.

M: Mitochondrion; PC: Proximal centriole; DC: Distal centriole; CP: Cytoplasmic processes.

表 2 二倍体、三倍体、四倍体长牡蛎精子形态大小比较
Tab. 2 Comparison of sperm morphology size in diploid, triploid, and tetraploid *Crassostrea gigas*

参数 parameter	二倍体 diploid	三倍体 triploid	四倍体 tetraploid
精子头长/ μm sperm head length	2.33 $\pm$ 0.17 ^a	2.42 $\pm$ 0.12 ^b	3.24 $\pm$ 0.19 ^c
精子头宽/ μm sperm head width	2.13 $\pm$ 0.18 ^a	2.23 $\pm$ 0.12 ^b	2.88 $\pm$ 0.19 ^c
顶体高/ μm acrosome height	0.55 $\pm$ 0.06 ^a	0.58 $\pm$ 0.07 ^b	0.67 $\pm$ 0.05 ^c
顶体宽/ μm acrosome width	1.02 $\pm$ 0.09 ^a	1.13 $\pm$ 0.13 ^b	1.28 $\pm$ 0.14 ^c
顶体高/宽/ μm acrosome height/width	0.54 $\pm$ 0.07 ^a	0.52 $\pm$ 0.11 ^a	0.52 $\pm$ 0.13 ^b
线粒体直径/ μm mitochondrial diameter	0.72 $\pm$ 0.07 ^a	0.74 $\pm$ 0.08 ^a	0.87 $\pm$ 0.10 ^b

注: n 表示统计数目, 同行数据肩标不同字母表示差异显著($P<0.05$), 相同字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$).
Note: n indicates the calculated number, different letters of the shoulder band of peer data indicated significant differences ($P<0.05$), and the same letters indicated that the difference was not significant ($P>0.05$).

2.2.3 精子尾部的透射电镜观察 二倍体、三倍体、四倍体长牡蛎精子鞭毛超微结构相似, 鞭毛构成精子的尾部, 尾部近头部较粗, 远端渐细。自远端中心粒延伸出的轴丝贯穿精子鞭毛(flagellum, FL), 其中精子头部的被膜向后延伸, 与轴丝(axoneme, AX)两侧紧密贴合, 构成了鞭毛质膜(plasma membrane, PM), 整个精子的质膜呈波纹状态, 凸起部分为纤维鞘(fiber sheath, FS)(图 7a, e)。在某些精子尾部的轴丝侧面存在一些囊泡鞘(vesicular sheath, VS), 内含小囊泡(图 7b)。鞭毛主段为“9+2”的结构, 由轴丝和原生质鞘(protoplast sheath, PS)构成, 紧接远端中心粒。横切面呈典型的“9+2”结构, 外面包有质膜结构, 轴丝由双连体(duplex, DU)和中央微管(central microtubule, CM)组成, 双连体微管共 9 组, 均匀分布在外面, 其中一组中央微管位于中间, 二联体微观拥有致密结构, 清晰易辨别(图 7c, 7d, 7f)。其中, 在三倍体精子的一条尾部横切图中发现了含有两个“9+2”结构的畸形特例(图 7e)。

3 讨论

3.1 不同倍性长牡蛎闭壳肌结构差异分析

肌纤维数量、粗细以及肌原纤维是肌肉组织结构的重要影响因素。肌纤维平均直径可直观地评价肌肉的质量水平^[21], 其中, 物种的生长速度、营养摄食状况、运动量、性别和倍性都会直接影响肌纤维直径增长的情况^[22]。梁向阳^[23]对二倍体、三倍体鲫鱼(*Carassius auratus*)肌纤维细胞

的研究发现, 三倍体细胞直径显著大于二倍体。其中, 三倍体鲫鱼肌纤维长、短径均大于二倍体, 而肌纤维密度则均小于二倍体, 与本研究结果一致。在本研究中, 三倍体长牡蛎横纹肌肌纤维长径和短径均显著大于二倍体, 而肌纤维密度则显著小于二倍体及四倍体, 这说明三倍体长牡蛎肌纤维比二倍体直径更长、排列更松散。王雪薇等^[22]研究发现肌纤维细胞大小会随倍性升高而增加, 但本研究发现四倍体长牡蛎肌纤维直径却显著小于三倍体, 这说明四倍体长牡蛎肌纤维的生长受到了抑制。Nam 等^[24]研究了四倍体泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的生长, 发现四倍体泥鳅的大小及重量与二倍体相似, 在四倍体长牡蛎生长过程中可能有着与其类似的遗传机制, 从而导致其个体大小和肌纤维直径未随倍性增加而变大。

Stickland 等^[25]认为肌纤维总数在胚胎期中就已经确定下来, 出生后肌纤维主要是直径与面积上进行生长和增加, 且肌纤维的总数不再发生变化。因此, 不同倍性长牡蛎闭壳肌肌纤维的差异, 可能与其生长性能具有密切联系。有研究指出三倍体长牡蛎生长速度显著高于二倍体和四倍体, 不育的三倍体牡蛎可将机体的能量集中用于个体生长, 其中包括闭壳肌的生长^[26-27]。Li 等^[28]对褶牡蛎(*C. plicatula* Gmelin)的研究发现, 在食物充足的条件下, 闭壳肌和其他的组织器官一样, 在秋冬季节贮存糖原。而在繁殖季节, 配子发生过程中环境中原有食物供给已无法满足牡蛎较高的能量需求, 闭壳肌成为重要的能量储存和转化部

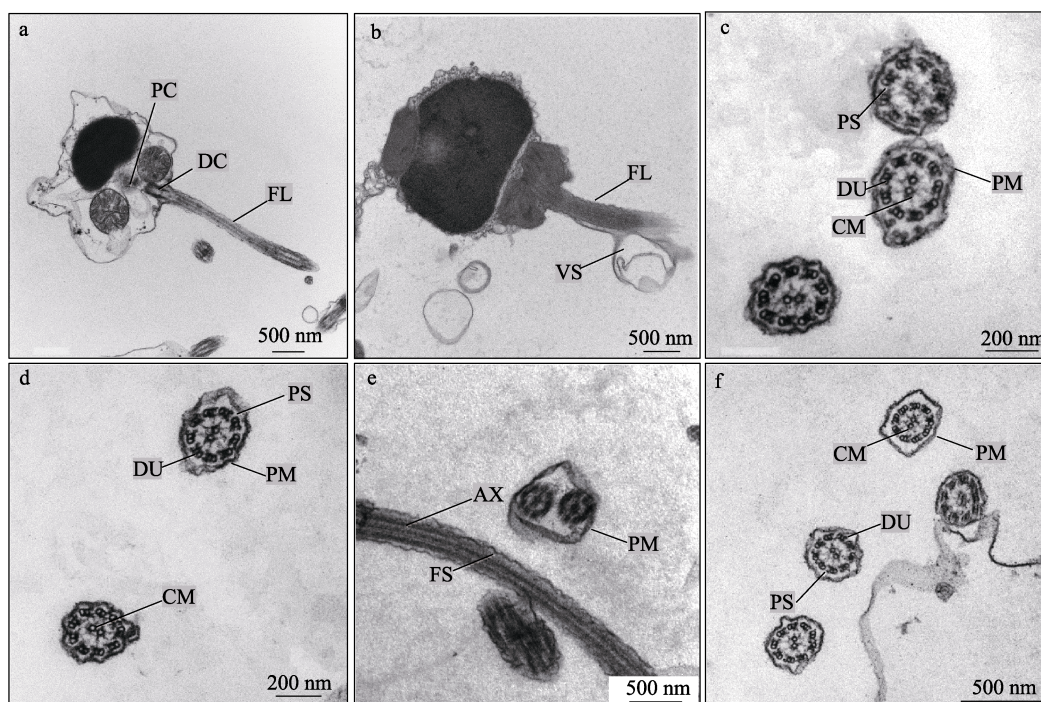


图 7 不同倍性长牡蛎精子尾部透射电镜

图 a, b 为二倍体精子整体横切透射电镜图; 图 c, d, f 分别为二倍体、三倍体、四倍体精子尾部纵切透射电镜图;

图 e 为三倍体畸形精子尾部纵切透射电镜图。VS: 囊泡鞘; FS: 纤维鞘; PM: 质膜; AX: 轴丝;

DU: 双联体; CM: 中央微管; PC: 近端中心粒; DC: 远端中心粒; FL: 鞭毛; PS: 原生质鞘。

Fig. 7 Transmission electron microscope of the different ploidy *Crassostrea gigas* sperm tails

Figures a and b are the transversal transmission electron micrographs of the whole diploid sperm; Figures c, d, and f are the longitudinal transmission electron micrographs of diploid, triploid, and tetraploid sperm tails;

Figure e is a longitudinal transmission electron microscopic image of the tail of triploid deformed sperm.

VS: Vesicular Sheath; FS: Fiber Sheath; PM: Plasma Membrane; AX: Axoneme; DU: Duplex; CM: Central Microtubule;

PC: Proximal Centriole; DC: Distal Centriole; FL: Flagellum; PS: Protoplast Sheath.

位, 是配子发生和生长的主要能量来源之一。二倍体和四倍体繁殖期间性腺发育需大量能量, 闭壳肌中的糖原在牡蛎的配子发生过程中被分解转化为性腺发育所需要的能量, 因此无法用于闭壳肌生长, 而三倍体由于繁殖季节不发育或育性差, 更多能量用于闭壳肌和个体的生长, 生长速度快, 导致三倍体拥有更发达的闭壳肌和直径、面积更大的肌纤维。

不同倍性长牡蛎闭壳肌超微结构的差异, 主要表现在粗肌丝密度、囊泡数量、肌浆网大小、线粒体大小和数量及肌膜厚度上。其中, 三倍体粗肌丝的密度最大, 囊泡数量最多, 肌浆网范围最广, 线粒体直径最大、数量最多, 这与梁向阳^[23]关于不同倍性鱼类肌纤维超微结构的比较研究结果类似。Hanson 等^[29]关于葡萄牙牡蛎(*C. angulata*)

闭壳肌纤维超微结构研究表明, 横纹肌张力的产生与粗肌丝和细肌丝构成的纤维滑动收缩系统有关。三倍体长牡蛎粗肌丝密度显著大于二倍体、四倍体, 这说明三倍体闭壳肌中具有更多的粗-细肌丝纤维滑动收缩系统, 可产生更多的张力, 这或许可以揭示三倍体闭壳肌拉力高于二、四倍体(项目组未发表数据)的结构机制。Endo^[30]认为肌浆网的膜上含有丰富的钙泵 ATP 酶, 具有调节肌浆中 Ca^{2+} 浓度的作用, 本研究在三倍体长牡蛎闭壳肌纤维的超微结构中, 观察到了丰富的肌浆网和囊泡, 这些结构有助于快速提高肌浆中 Ca^{2+} 浓度, 从而更快进行肌肉收缩反应。Chinnery 等^[31]指出线粒体为机体各项生命活动主要的供能细胞器, 机体能量代谢越高, 线粒体数量越多。三倍体长牡蛎因其不育或育性差, 更多能量用于闭壳肌

生长, 闭壳肌中能量代谢较高^[32], 因而三倍体长牡蛎闭壳肌中线粒体数量及大小较二倍体、四倍体而言显著增加。

3.2 不同倍性长牡蛎精子超微结构特点

三倍体和四倍体长牡蛎精子的超微结构与二倍体相似, 均由顶体复合体、细胞核、线粒体和鞭毛组成, 这与 Bozzo 等^[33]关于二倍体长牡蛎精子结构特征的研究结果一致。但在精子形态大小及线粒体数目上, 不同倍性精子间有所差异, 其中, 四倍体精子头部和顶体的线性尺寸显著大于三倍体和二倍体, 三倍体精子头部和顶体的线性尺寸显著大于二倍体, 这与 Dong 等^[17]和 Komaru 等^[34]的研究一致。Valenti^[35]在诱导多倍体尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)精子的研究报道中表明, DNA 含量的多少可能会影响精子头部大小, 随着细胞倍性的增加, 其线性尺寸也将增大。由于四倍体长牡蛎精子的 DNA 含量约为二倍体的 2 倍^[36], 三倍体长牡蛎精子为非整倍体, 其 DNA 含量约为二倍体精子的 1.5 倍^[37], 因此, 三倍体、四倍体长牡蛎精子的线性尺寸要显著大于二倍体。Allen^[38]研究发现, 多倍体砂海螂(*Mya arenaria*)精子线性尺寸的增大可能与基因剂量效应有关, 随着同源染色体条数的增加, 基因剂量增大, 基因表达增强, 表达产物增多, 在表观上表现为精子细胞尺寸增大。在三倍体、四倍体长牡蛎精子中, 随着同源染色体增多, 基因剂量的增加, 编码顶体和蛋白质同源染色体上的几组基因表达可能更活跃, 基因表达产物更多, 从而导致三、四倍体精子的头部和顶体的线性尺寸显著高于二倍体。

不同倍性长牡蛎精子除结构的线性尺寸具有差异外, 线粒体大小和数量也有所不同。有研究发现, 在栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)^[39]和马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)^[40]诱导的多倍体中, 精子线粒体的大小和细胞倍性水平无关, 这可能受其自身 DNA 的调节^[34], 这与本研究三倍体精子的线粒体大小与二倍体精子没有明显差异一致。值得注意的是, 四倍体长牡蛎精子线粒体大小显著大于二倍体和三倍体长牡蛎, 但目前有关导致四倍体精子线粒体尺寸增大的分子机理尚不明确。

Eckelbarger 等^[41]在美洲牡蛎(*C. virginica*)精子超微结构研究报道中首次提出二倍体牡蛎精子中段是由 4 个线粒体围绕中心粒复合体构成, 而在本研究中首次发现具 5 个线粒体的二倍体精子, 占比 1%, 三倍体精子线粒体数量全为 4 个, 四倍体精子中线粒体数量有所不同, 分别为 4 个、5 个和 6 个, 这与 Komaru 等^[34]和 Dong 等^[17]的研究结果一致。有关二倍体和四倍体地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)精子超微结构的研究表明, 在四倍体中观察到 5~7 个线粒体, 而二倍体中只有 5 个线粒体, Komaru 等^[15]认为在四倍体贻贝精子中, 线粒体数量的增加, 可以抵消由于精子头部大小增加而带来的不平衡影响, 从而使四倍体与二倍体精子具有相似的运动能力。理论上 50%以上四倍体长牡蛎精子线粒体数量增加, 可获得与二倍体精子相似的运动能力, 但实际上在 Suquet 等^[42]研究中证明, 四倍体长牡蛎精子整体运动能力及活性始终低于二倍体, 作者认为四倍体长牡蛎精子的 ATP 浓度在精子运动结束时仍然保持很高水平, 其活力低可能不是由 ATP 消耗引起的, 有可能是由于精子形态的急剧变化从而导致四倍体精子质量较低。

对于三倍体长牡蛎精子来说, 大多数精子细胞结构正常, 但部分存在异常。在三倍体中精子相对 DNA 含量为非整倍体是一种普遍的现象, 这种现象在三倍体虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中也有报道^[43]。Perruzzi 等^[44]认为三倍体大西洋鳕(*Gadus morhua*)中精子形态异常的频率较高、孵化期的异常幼虫可能与精子细胞染色体组成异常有关。同二倍体长牡蛎精子相比, 在三倍体精子中, 形态异常频率高, 具有更大的精子头, 但只有相似的线粒体, 这些都是导致精子运动能力下降的原因。此外, 在本研究中还发现三倍体精子线粒体中存在一定比例的胞质突出, Healy 等^[45]认为头足类精子中段存在细胞质突起与其受精过程中的某个方面相关, 可能具有某种辅助功能, 但具体作用机制尚不明确。

参考文献:

- [1] Walton W C, Rikard F S, Chaplin G I, et al. Effects of ploidy

- and gear on the performance of cultured oysters, *Crassostrea virginica*: Survival, growth, shape, condition index and Vibrio abundances[J]. Aquaculture, 2013, 414-415: 260-266.
- [2] Dégremont L, Garcia C, Frank-Lawale A, et al. Triploid oysters in the Chesapeake Bay: comparison of diploid and triploid *Crassostrea virginica*[J]. Journal of Shellfish Research, 2012, 31(1): 21-31.
- [3] Yu R H, Li H K, Li C H, et al. Production method and biological characteristics of tetraploid oyster[J]. Scientific Fish Farming, 2021(12): 61-62. [于瑞海, 李海昆, 李春华, 等. 四倍体长牡蛎的生产方法与生物学特性[J]. 科学养鱼, 2021(12): 61-62.]
- [4] Achouri A, Melizi M, Belbedj H, et al. Comparative study of histological and histo-chemical image processing in muscle fiber sections of broiler chicken[J]. Journal of Applied Poultry Research, 2021, 30(3): 100173.
- [5] Wang R C, WANG Z P, ZHANG J Z, et al. Aquaculture of Marine Shellfish[M]. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1993: 186. [王如才, 王昭萍, 张建中等. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1993: 186.]
- [6] Poulet S A, Lennon J F, Plouvenez F, et al. A nondestructive tool for the measurement of muscle strength in juvenile oysters *Crassostrea gigas*[J]. Aquaculture, 2003, 217(1-4): 49-60.
- [7] Fujiwara T, Aoki H, Ishikawa T, et al. Simple selection of pearl oysters *Pinctada fucata martensii* with strong shell-closing strength using near-infrared spectroscopy[J]. Aquaculture Science, 2010, 58(2): 253-259.
- [8] Millman B M. Mechanisms of contraction in molluscan muscle[J]. Integrative and Comparative Biology, 1967, 7(3): 583-591.
- [9] Zhang L, Liu J R, Tian Y Y, et al. Characteristics of histology and protein in adductor of Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(3): 356-362. [张龙, 刘俊荣, 田元勇, 等. 菲律宾蛤仔闭壳肌组织学及其蛋白特性[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(3): 356-362.]
- [10] Hanson J, Lowy J. The structure of the muscle fibres in the translucent part of the adductor of the oyster *Crassostrea angulata*[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 1961, 154(955): 173-196.
- [11] Walton W C, Rikard F S, Chaplin G I, et al. Effects of ploidy and gear on the performance of cultured oysters, *Crassostrea virginica*: Survival, growth, shape, condition index and Vibrio abundances[J]. Aquaculture, 2013, 414-415: 260-266.
- [12] Hoyle G, McAlear J H, Selverston A. Mechanism of super-contraction in a striated muscle[J]. The Journal of Cell Biology, 1965, 26(2): 621-640.
- [13] Elliott G F. Electron microscope studies of the structure of the filaments in the opaque adductor muscle of the oyster *Crassostrea angulata*[J]. Journal of Molecular Biology, 1964, 10(1): 89-IN27.
- [14] Psenicka M, Alavi S M, Rodina M, et al. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy[J]. Biology of the Cell, 2007, 99(2): 103-115.
- [15] Komaru A, Scarpa J, Wada K T. Ultrastructure of spermatozoa in induced tetraploid mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.)[J]. Journal of shellfish research, 1995, 14: 405-410.
- [16] Jiang B. Breeding of hybrid triploid Pacific oyster and its genome stability[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004. [姜波. 杂交三倍体太平洋牡蛎的培育及其染色体组稳定性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]
- [17] Dong Q X, Huang C J, Tiersch T R. Spermatozoal ultrastructure of diploid and tetraploid Pacific oysters[J]. Aquaculture, 2005, 249(1-4): 487-496.
- [18] Komaru A, Konishi K, Wada K T. Ultrastructure of spermatozoa from induced triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Aquaculture, 1994, 123(3-4): 217-222.
- [19] Achouri A, Melizi M, Belbedj H, et al. Comparative study of histological and histo-chemical image processing in muscle fiber sections of broiler chicken[J]. Journal of Applied Poultry Research, 2021, 30(3): 100173.
- [20] Li H J, Yu H, Li Q. Histological studies on the muscle fibers of *Crassostrea gigas* adductor[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(9): 1392-1399. [李绘娟, 于红, 李琪. 长牡蛎闭壳肌肌纤维的组织学特性[J]. 水产学报, 2017, 41(9): 1392-1399.]
- [21] Tan L Q, Ou C H, Li R Q, et al. Study on muscle fiber characteristics of Tengchong snowcock at 60 and 90 days[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2000, 515(04): 345-348. [谭丽勤, 欧茶海, 李润泉等. 60-90 日龄腾冲雪鸡肌纤维特性研究[J]. 云南农业大学学报, 2000, 15(04): 345-348.]
- [22] Wang X W, Xie Y J, Xue S Q, et al. Comparison of microstructure and nutrient in muscles between diploid and triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Fisheries Science, 2017, 36(5): 569-576. [王雪薇, 谢意军, 薛淑群, 等. 二、三倍体虹鳟肌肉组织结构及营养成分的比较[J]. 水产科学, 2017, 36(5): 569-576.]
- [23] Liang X Y. Comparative study on muscle fibers of skeletal muscle of fish with different ploidy[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2011. [梁向阳. 不同倍性鱼骨骼肌肌纤维的比较研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2011.]

- [24] Nam Y K, Choi G C, Park D J, et al. Survival and growth of induced tetraploid mud loach[J]. *Aquaculture International*, 2001, 9(1): 61-71.
- [25] Stickland N C, Widdowson E M, Goldspink G. Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibres and nuclei in skeletal muscle of pigs[J]. *The British Journal of Nutrition*, 1975, 34(3): 421-428.
- [26] Wadsworth P, Wilson A E, Walton W C. A meta-analysis of growth rate in diploid and triploid oysters[J]. *Aquaculture*, 2019, 499: 9-16.
- [27] Li Y G, Li Q. The growth, survival and ploidy of diploid, triploid and tetraploid of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in larval and juvenile stages[J]. *Aquaculture*, 2022, 553: 738083.
- [28] Li Q, Liu W G, Shirasu K, et al. Reproductive cycle and biochemical composition of the Zhe oyster *Crassostrea plicatula* Gmelin in an eastern coastal bay of China[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 752-759.
- [29] Hanson J, Lowy J. The structure of the muscle fibers in the translucent part of the adductor of the oyster *Crassostrea angulata*[J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 1961, 154(955): 173-196.
- [30] Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum[J]. *Physiological Reviews*, 1977, 57(1): 71-108.
- [31] Chinnery P F. Mitochondria[J]. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2003, 74(9): 1188-1199.
- [32] Kong L F. Histological and biochemical studies on polyploid Pacific oyster[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004. [孔令锋. 多倍体太平洋牡蛎组织学与生化研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]
- [33] Gràcia Bozzo M, Ribes E, Sagrista E, et al. Fine structure of the spermatozoa of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia) [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1993, 34(2): 206-211.
- [34] Komaru A, Konishi K, Wada K T. Ultrastructure of spermatozoa from induced triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 1994, 123(3-4): 217-222.
- [35] Valenti R J. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (*Steindachner*) by means of temperature shock treatment[J]. *Journal of Fish Biology*, 1975, 7(4): 519-528.
- [36] Eudeline B, Allen S K, Guo X M. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator[J]. *Aquaculture*, 2000, 187(1-2): 73-84.
- [37] Allen Jr S K. Gametogenesis in three species of triploid shellfish: *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas*, and *Crassostrea virginica*[C]. *Proc. World Symp on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, Bordeaux, May 27-30, 1986, Berlin, 1987. 1986, 2: 207-217.
- [38] Allen S K, Gagnon P S, Hidu H. Induced triploidy in the soft-shell clam: Cytogenetic and allozymic confirmation[J]. *Journal of Heredity*, 1982, 73(6): 421-428.
- [39] Komaru A, Wada K T. Gametogenesis and growth of induced triploid scallops *Chlamys nobilis*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989, 55(3): 447-452.
- [40] Komaru A. Gametogenesis of triploid Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*[J]. *Advances in Invertebrate Reproduction*, 1990, 5: 469-474.
- [41] Eckelbarger K J, Davis C V. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. ovary and oogenesis[J]. *Marine Biology*, 1996, 127(1): 79-87.
- [42] Suquet M, Donval C, Labbé C, et al. Sperm quality in diploid and tetraploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*[C]. *Aquaculture Europe* 09. 2009.
- [43] Christen R, Gatti J L, Billard R. Trout sperm motility. The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 166(3): 667-671.
- [44] Peruzzi S, Rudolfson G, Primicerio R, et al. Milt characteristics of diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(10): 1160-1169.
- [45] Yurchenko O V. Comparative ultrastructural study of spermatozoa in some oyster species from the Asian-Pacific Coast[J]. *Micron*, 2012, 43(2-3): 365-373.

Histological and ultrastructural observation of adductor and sperm of *Crassostrea gigas* with different ploidy

DONG Luyao^{1,2}, ZHAO Liyan¹, ZHANG Enshuo³, LI Zhou⁴, LI Zan³, WANG Weijun^{1,2,3}, YANG Jianmin³

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China;

3. School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China;

4. Zhifu District Bureau of Marine Development and Fisheries, Yantai 264000, China

Abstract: The histological and ultrastructural characteristics of the adductor muscles and sperm of diploid, triploid, and tetraploid *Crassostrea gigas* were compared through paraffin section, transmission electron microscope, and scanning electron microscope analyses. The experimental results showed that the muscle fibers of diploid, triploid, and tetraploid adductors were all composed of thick filaments, thin filaments, sarcolemma, perimysium, endomysium, mitochondria, vesicle, tubule, nucleus, sarcoplasmic reticulum, and so on. However, the morphology and ultrastructure of the *C. gigas* of three ploidies were different from each other: the mitochondrial diameter, muscle fiber diameter, and thick filament density of the triploid adductor muscle were significantly higher than those of diploid and tetraploid adductor muscles, and the muscle fiber density was significantly lower than that of diploids and tetraploids. The results of scanning electron microscopy and transmission electron microscopy of the different ploidy sperm showed that the sperm of diploid, triploid, and tetraploid *C. gigas* were similar in composition and structure, comprising head, middle, and tail parts. Nevertheless, the size and the number of mitochondria differed among the different ploidy sperm. Measurement and analysis of the head length, width, acrosome height and width, and mitochondrial length of *C. gigas* sperm showed that the head, acrosome, and mitochondria of tetraploid sperm were significantly larger than those of diploid and triploid sperm. The head and acrosome of triploid sperm were significantly larger than those of diploid sperm, but there was no significant difference in mitochondrial size between triploid and diploid sperm. Additionally, both diploid and triploid sperm contained four mitochondria; however, diploid sperm contained 5 (1%) mitochondria. The number of mitochondria in tetraploid *C. gigas* sperm varied, with 4 (46%), 5 (52%), and 6 (2%) mitochondria. This study elucidates the histological characteristics and ultrastructure of the adductor muscles and sperm of *C. gigas* of different ploidies, which provide important basic data for further study of the biological characteristics of *C. gigas* muscle fiber and sperm breeding biology, and provide a theoretical basis for improving the meat quality and polyploid artificial breeding of *C. gigas*.

Key words: *Crassostrea gigas*; adductor; sperm; diploid; triploid; tetraploid; ultrastructural

Corresponding author: WANG Weijun. E-mail: wwj2530616@163.com