



不同育性长牡蛎性腺发育过程中糖原和脂质的组织化学研究

王朔^{1,2}, 于红^{1,3*}, 李琪^{1,3}

(1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 辽宁省海洋水产科学研究院, 大连市海产贝类种质资源创新利用重点实验室, 辽宁 大连 116023;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 为探讨不同育性长牡蛎性腺发育过程中主要供能物质的利用和变化差异, 利用过碘酸雪夫氏染色 (PAS 染色) 和油红 O 染色法对不同育性三倍体长牡蛎及二倍体长牡蛎性腺组织进行观察分析。结果显示, 在增殖期, 二倍体和三倍体长牡蛎性腺结缔组织中均含有大量糖原和脂质。随着性腺发育, 二倍体和可育型三倍体 (3n α 型) 长牡蛎性腺结缔组织中糖原含量明显下降, 到成熟期几乎检测不到糖原, 说明性腺结缔组织中的糖原为配子发生提供能量。脂质主要存在于性腺结缔组织和卵母细胞的细胞质中, 说明脂质是卵细胞发育的重要组成物质。雌性二倍体和 3n α 型长牡蛎性腺结缔组织中的脂质含量随着性腺发育并未发生明显下降, 推测糖原可能转化为脂质以满足性腺发育的物质需求。脂质含量在二倍体雄性长牡蛎性腺发育过程中出现明显的减少, 说明脂质在雄性性腺发育中的主要功能可能是供能而不是结构组成。糖原和脂质作为长牡蛎性腺发育过程中重要的供能和组成物质, 在不育型三倍体 (3n β 型) 长牡蛎性腺发育过程中含量没有发生明显的变化, 这与 3n β 型配子发生受阻密切相关。推测 3n β 型长牡蛎由于配子发育受阻, 性腺发育初期积累的糖原和脂质并未分配至生殖细胞, 而留在结缔组织中, 从而使其在繁殖季节仍然能够保持快速生长。研究结果为牡蛎生殖发育调控机制及育性控制育种提供重要信息。

关键词: 长牡蛎; 三倍体; 糖原; 脂质; 组织化学

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

贝类的配子发生伴随着旺盛的能量需求, 性腺发育过程中需要足够的营养物质以满足配子发生以及后续的产卵排精。多数双壳贝类在配子发生前会提前进行营养物质的储存, 以供配子发生的能量需求。许多重要的海洋经济双壳贝类的繁殖生物学已经被研究并报道, 如扇贝科 (Pectinidae)、牡蛎科 (Ostreidae)、贻贝科 (Mytilidae) 和珍珠贝科 (Pteriidae) 等^[1]。大多数研究描述了性腺的组织学特征, 分析了配子发生过程中能量储备的使用周期, 并评估了生物为确保配子成熟和质量

所使用的代谢策略。研究表明, 糖原、脂肪和蛋白质等营养成分含量的变化与繁殖相关, 它们为贝类的性腺发育和配子发生提供能量^[2-5]。

长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 是我国重要的经济贝类之一, 具有环境适应力强、生长速率快等优点。然而长牡蛎产卵后体质量会出现急剧下降 (体质量损失约 65%), 因此夏季长牡蛎产卵后无法上市。为弥补长牡蛎在夏季因繁殖原因不能上市的空缺, 研究者通过化学、物理以及杂交等方法, 诱导获得了具有生长快速、育性差等优点的三倍

收稿日期: 2021-04-20 修回日期: 2021-09-01

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900200); 国家自然科学基金 (31672649)

第一作者: 王朔 (照片), 从事贝类遗传育种研究, E-mail: 1165018093@qq.com

通信作者: 于红, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: hongyu@ouc.edu.cn



体长牡蛎^[6-8]，一定程度上缓解了此问题。大部分三倍体长牡蛎个体不能产生或者产生极少量的配子，称为不育型三倍体长牡蛎(3n β)；约25%的三倍体长牡蛎个体可以产生大量成熟配子，称为可育型三倍体长牡蛎(3n α)^[9]。关于二倍体和三倍体长牡蛎的生化成分组成及其在生长发育过程中的变化已有很多报道^[10-15]，笔者也研究了不同育性长牡蛎性腺发育过程中生化成分的含量变化情况^[16]，证实不同育性三倍体长牡蛎糖原、脂质等营养成分在繁殖季节含量存在显著差异。但是不同育性长牡蛎营养物质储存细胞在繁殖季节中是否存在差异，营养物质在性腺中的组织化学定位等问题尚未见报道。

本研究利用过碘酸雪夫氏染色(PAS染色)和油红O染色法观察长牡蛎性腺组织中糖原和脂质的分布，比较不同育性三倍体长牡蛎及二倍体长牡蛎在性腺发育过程中性腺组织细胞的糖原和脂质变化，以期为三倍体长牡蛎性腺发育过程中营养物质利用及能量物质转化机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用牡蛎均取自威海荣成市桑沟湾海区，三倍体长牡蛎为四倍体和二倍体杂交产生，二倍体为养殖长牡蛎，均为2龄牡蛎，取样时间为2019年4—6月，每月二倍体采集30个个体，三倍体采集80个个体。

1.2 实验方法

样品处理 活体牡蛎样品解剖，取小部分鳃丝用于倍性检测，取性腺组织并切成小块，分别置于Bouin氏液和多聚甲醛固定液中固定。

倍性检测 活体取2~5根鳃丝放入1×PBS缓冲液中，用剪刀剪碎，300目筛绢过滤至提前-30℃预冷的无水乙醇中，用1 mL注射器吹打数十次，放入4℃冰箱过夜沉降。移液枪吸取1 mL沉淀加入离心管中，室温500 r/min离心后弃去上清液，用1 mL PBS重悬细胞，用荧光染料碘化丙啶(PI)对细胞DNA染色30 min，采用流式细胞仪(Beckman CytoFLEX)进行倍性检测，激发光波长为488 nm，荧光通道选用585/42 BP，测定DNA分子荧光强度，以二倍体长牡蛎为对照，待测峰值为二倍体的1.5倍时视为三倍体。

PAS染色 取约5 mm³固定于Bouin氏液24 h后的性腺组织，用75%乙醇完全置换出Bouin氏液，组织经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后进行切片，切片厚度为5 μ m。二倍体和三倍体不同性别、不同发育时期及不同育性样品各取6个个体进行PAS染色，依次将切片放入二甲苯 I 20 min-二甲苯 II 20 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-75%乙醇 5 min，自来水洗。切片入PAS染色液 B (0.5%高碘酸溶液)中染色10~15 min，自来水洗，蒸馏水洗2遍；切片入PAS染色液 A (Schiff雪夫试剂)浸染25~30 min，避光，流水冲洗5 min；切片入PAS染色液 C (苏木素染液)染30 s，自来水洗，盐酸水溶液分化，自来水洗，氨水返蓝，流水冲洗。切片依次放入无水乙醇 5 min-无水乙醇 II 5 min-无水乙醇 III 5 min-二甲苯 5 min-二甲苯 II 5 min透明，中性树胶封片。晾干后用光学显微镜(Olympus BX51)观察并拍照。

油红O染色 取固定于多聚甲醛固定液中的性腺组织，冰冻切片后复温干燥，自来水洗，晾干。二倍体和三倍体不同性别、不同发育时期及不同育性样品各取6个个体进行染色，切片入油红染液浸染8~10 min(加盖避光)，取出切片，停留3 s后，依次浸入两缸60%的异丙醇中各分化3和5 s。切片依次浸入两缸纯水中各浸洗10 s。取出切片，停留3 s后浸入苏木素复染3~5 min，3缸纯水分别浸洗5、10和30 s。分化液(以60%酒精为溶剂)分化2~8 s，两缸蒸馏水各洗10 s，返蓝液返蓝1 s，将切片轻轻浸入2缸自来水中，分别浸洗5和10 s，镜检染色效果。甘油明胶封片剂封片，晾干后用光学显微镜(Olympus BX51)观察并拍照。

2 结果

2.1 三倍体倍性检测结果

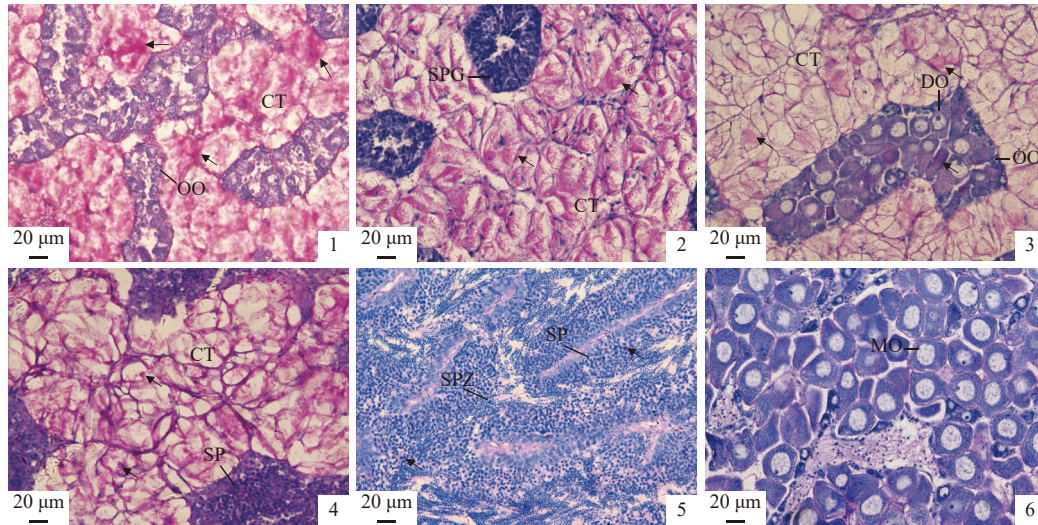
对采集的三倍体长牡蛎进行倍性测定，结果显示，4月三倍体长牡蛎样品中三倍体率为93%，5月三倍体率为82%，6月三倍体率为70%。

2.2 多糖

二倍体长牡蛎不同发育时期性腺组织中的多糖变化 二倍体长牡蛎雌性性腺增殖期出现单层卵原细胞(图版 I -1)，卵原细胞表现为PAS反应微弱阳性，而结缔组织细胞质中充满了PAS阳性反应颗粒。生长期出现多数以短柄形式附着

的卵黄生成前期卵母细胞和极少数卵黄生成期卵母细胞 (图版 I -3), 卵黄生成前期卵母细胞和卵黄生成期卵母细胞的细胞质中都充满阳性颗粒; 此时结缔组织面积减少且细胞质中的 PAS 阳性颗

粒较增殖期有明显减少。成熟期滤泡腔中充满大量呈多边形的成熟卵母细胞 (图版 I -5), 结缔组织几乎消失, 整个性腺仅有成熟卵母细胞的细胞膜有阳性反应。



图版 I 二倍体长牡蛎性腺发育过程中的多糖变化

1. 增殖期♀, 2. 增殖期♂, 3. 生长期♀, 4. 生长期♂, 5. 成熟期♀, 6. 成熟期♂, 图版 III 同; CT. 结缔组织, OO. 卵原细胞, DO. 未成熟卵子, MO. 成熟卵子, SPG. 精原细胞, SP. 精细胞, SPZ. 精子; 箭头所指为 PAS 反应阳性颗粒; 标尺为 20 μm, 下同

Plate I Changes of polysaccharides during gonadal development in diploid *C. gigas*

1. stage 1 ♀, 2. stage 1 ♂, 3. stage 2 ♀, 4. stage 2 ♂, 5. stage 3 ♀, 6. stage 3 ♂, the same as Plate III; CT. connective tissue, OO. oogonia, DO. developing oocyte, MO. mature oocyte, SPG. spermatogonia, SP. spermatid, SPZ. spermatozoa; arrows refer to PAS positive particles; scale bar=20 μm, the same below

二倍体长牡蛎雄性性腺增殖期出现多层精原细胞 (图版 I -2), 精原细胞表现为 PAS 反应阴性; 而结缔组织细胞质中与雌性一样充满了 PAS 阳性反应颗粒。生长期性腺中结缔组织减少 (图版 I -4), 滤泡腔中出现从精原细胞到精子各发育阶段的细胞, 主要在精母细胞和精细胞出现了阳性反应; 结缔组织细胞质中的 PAS 阳性颗粒较增殖期有明显减少。成熟期的滤泡腔中充满精细胞和呈辐射状排列的成熟精子 (图版 I -6), 并且有强阳性颗粒散布其中; 结缔组织几乎消失, 滤泡腔的边缘有微弱的阳性反应。

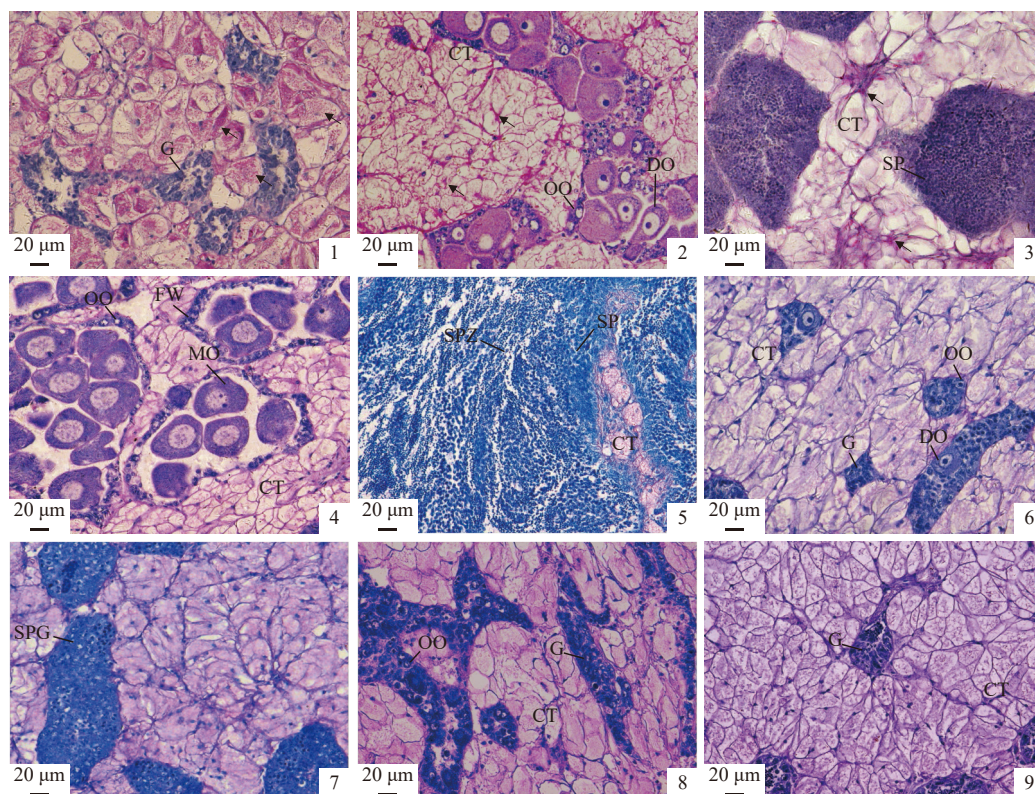
各类细胞的细胞核和核仁均呈 PAS 反应阴性。性腺切片经淀粉酶处理后再进行 PAS 染色, 阳性颗粒减少, 阳性反应减弱。

不同育性三倍体长牡蛎不同发育时期性腺组织中的多糖变化 三倍体长牡蛎增殖期不能辨别雌雄, 滤泡腔很小, 滤泡腔内的生殖细胞呈 PAS 染色反应阴性或微弱阳性 (图版 II -1); 结缔组织细胞的细胞质内充满阳性颗粒。生长期开始可辨别雌雄和育性, 育性根据 Jouaux 等^[9]分

为不育型三倍体 (β 型) 和可育型三倍体 (α 型)。 α 型 (可育型) 长牡蛎性腺发育过程中雌、雄多糖的变化与二倍体类似 (图版 II -2~5), β 型 (不可育型) 雌、雄长牡蛎在生长期之后的性腺 (图版 II -6~9) 结缔组织细胞质中没有明显较大的 PAS 反应阳性颗粒, 但整体弥漫着极细小的颗粒, 使得结缔组织的颜色较深。各类细胞的细胞核和核仁均呈 PAS 反应阴性。

2.3 脂质

二倍体长牡蛎不同发育时期性腺组织中的脂质变化 二倍体长牡蛎雌性性腺发育过程中, 增殖期卵原细胞有零星油红 O 染色反应阳性颗粒 (图版 III -1)。生长期各种卵母细胞的细胞质中分布较小阳性颗粒, 卵黄生成期卵母细胞中的阳性颗粒更多一些 (图版 III -3)。成熟期的卵黄形成后期和成熟卵母细胞的细胞质中充满油红 O 染色反应阳性颗粒 (图版 III -5)。性腺发育期间的结缔组织一直充满油红 O 染色反应阳性颗粒, 生长期的阳性颗粒大小和数量略少于增殖期。

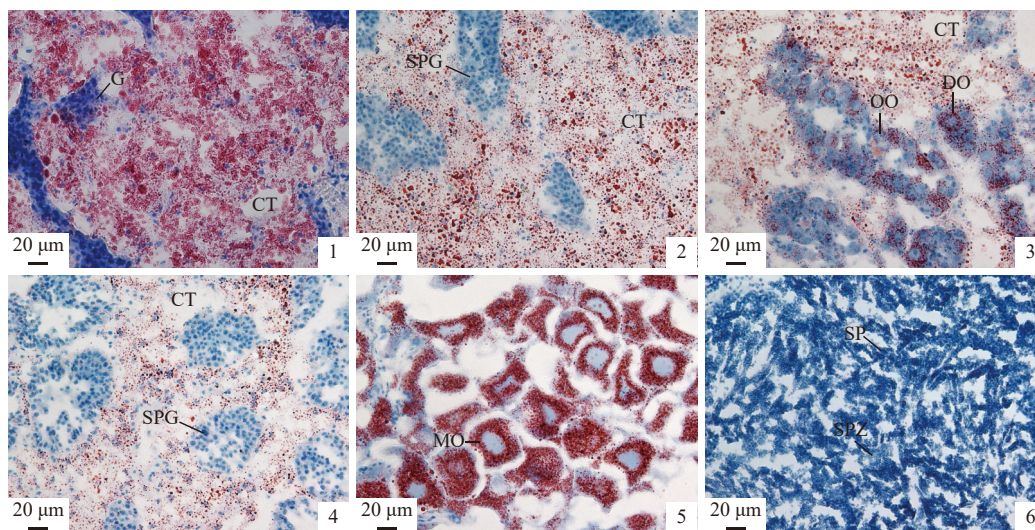


图版 II 不同育性三倍体长牡蛎性腺发育过程中的多糖变化

1. 增殖期, 不分雌雄, 2. 生长期 α ♀, 3. 生长期 α ♂, 4. 成熟期 α ♀, 5. 成熟期 α ♂, 6. 生长期 β ♀, 7. 生长期 β ♂, 8. 成熟期 β ♀, 9. 成熟期 β ♂, 图版IV同; FW. 滤泡壁, G. 性原细胞; 标尺为 20 μ m

Plate II Changes of polysaccharides during gonadal development in different types of triploid *C. gigas*

1. stage 1, none, 2. stage 2 α ♀, 3. stage 2 α ♂, 4. stage 3 α ♀, 5. stage 3 α ♂, 6. stage 2 β ♀, 7. stage 2 β ♂, 8. stage 3 β ♀, 9. stage 3 β ♂, the same as Plate IV; FW. follicle wall, G. gonias; scale bar=20 μ m



图版III 二倍体长牡蛎性腺发育过程中的脂质变化

红色颗粒代表脂质, 下同; 标尺为 20 μ m

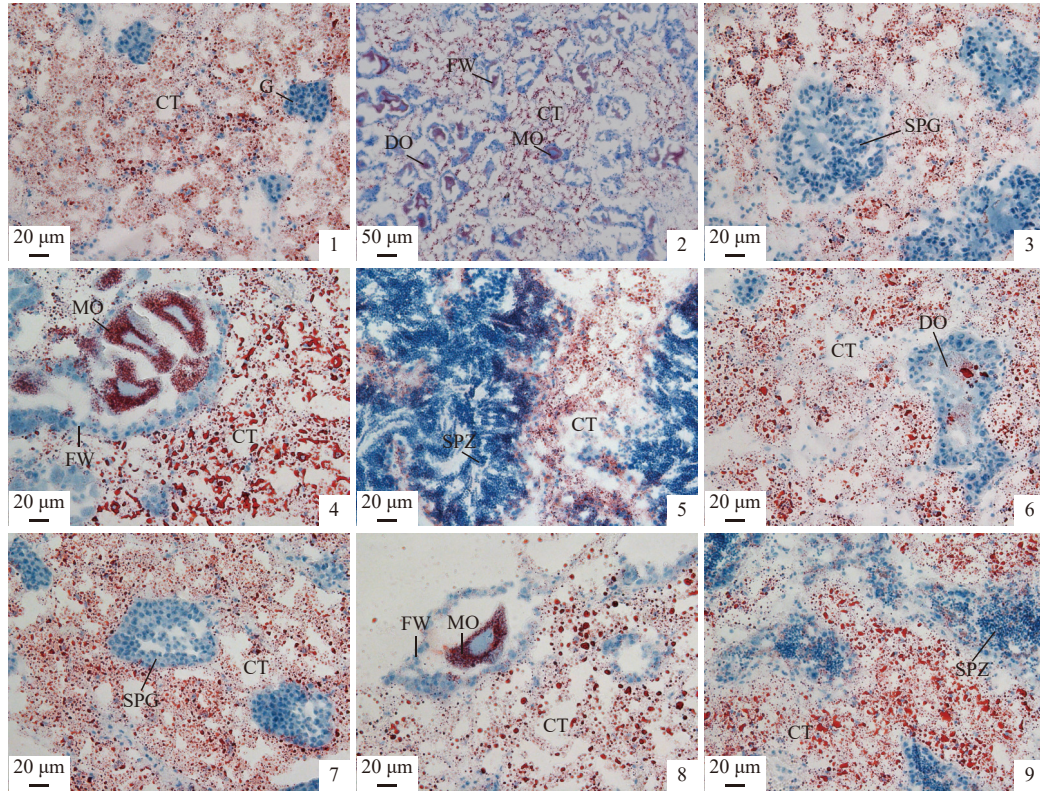
Plate III Changes of lipid during gonadal development in diploid *C. gigas*

Red particles refer to lipid, the same below; scale bar=20 μ m

二倍体长牡蛎雄性性腺发育过程中, 精原细胞的油红 O 染色反应为阴性或有极少阳性颗粒 (图版 III-2), 生长期时仅在外围精母细胞的细胞质中出现零星阳性颗粒 (图版 III-4), 成熟期的精细胞和精子油红 O 染色反应为阴性 (图版 III-6)。性腺发育期间的结缔组织一直充满油红 O 染色反应阳性颗粒, 生长期的阳性颗粒略少于增殖期。

不同育性三倍体长牡蛎不同发育时期性腺组织中的脂质变化 三倍体 α 型长牡蛎性腺发育过程中, 雌、雄性腺脂质的变化趋势与二倍体

类似, 结缔组织的细胞质中也都充满油红 O 染色反应阳性颗粒, 不同的是 α 型长牡蛎性腺发育不完全, 成熟期还有部分结缔组织 (图版 IV-4~5), 且精母细胞的阳性反应比二倍体强一些 (图版 IV-5), 成熟期整体的阳性颗粒比生长期略多一些。 β 型长牡蛎在性腺发育过程中, 结缔组织中的油红 O 染色反应阳性颗粒未有太大的变化 (图版 IV-6~9), 雄性阳性颗粒主要分布于结缔组织中, 雌性阳性颗粒除了存在于结缔组织中, 还分布在各类卵母细胞中。



图版 IV 不同育性三倍体长牡蛎性腺发育过程中的脂质变化

Plate IV Changes of lipid during gonadal development in different types of triploid *C. gigas*

3 讨论

糖原、蛋白质和脂质为贝类的生理和生殖活动提供能量^[17]。海洋双壳贝类的生殖活动与能量代谢密切相关, 配子发生需消耗大量能量, 这些能量可能是先前储存在体内某些组织中的能量物质, 也可能直接来自于食物。在长牡蛎中, 研究表明配子发生过程中糖原含量急剧下降, 配子发生需要消耗体内贮存的糖原作为能量, 而糖原等能量物质的贮存主要发生在非繁殖季节食物充足的情况下^[11]。

3.1 长牡蛎的能量储存部位

海洋双壳贝类遵循精确的生殖腺成熟、产卵的繁殖周期。繁殖力与能量消耗有关, 这导致细胞必须具有储存能量的能力, 以便在有充足食物时大量储存和积累营养物质, 在繁殖季节调动能量以供配子发生。

大多数海洋无脊椎动物都有特定的细胞或组织来积累和储存营养物质。例如海胆中的营养吞噬细胞^[18]、巨刺海星 (*Pisaster giganteus*) 中的幽门盲肠^[19]、多毛纲 (Polychaeta) 的肠上皮和腹膜上皮^[20]、结缔组织的贮藏细胞^[21] 以及甲壳类动物的肝胰脏、

腹部肌肉和鳃^[22]。双壳类储存营养的细胞类型具有较高的多样性,大致可以分为三类:特定的贮藏细胞、肌细胞和性腺内上皮细胞^[23]。在某些物种(如扇贝科)^[24]中没有特定的贮藏细胞,而是由闭壳肌储存营养物质;在帘蛤科(Veneridae)和鸟尾蛤科(Cardiididae)^[23]中,肌肉细胞和特定的贮藏细胞都参与营养物质的储存;少数种类有特定的能量贮藏组织,如贻贝科的外套膜中含有两种特定细胞:脂肪颗粒细胞(ADG细胞)和糖原细胞(VCT细胞);蚶科(Glycymerididae)和牡蛎科仅有一种特定的贮藏糖原和脂质的VCT细胞^[23]。

目前已有的研究发现,贝类中特定的贮藏细胞主要分为两类:脂肪颗粒细胞(adipogranular cells, ADG-cells)和泡状结缔组织细胞(vesicular-connective tissue cells, VCT-cells),这些细胞储存的能量物质不同,能量物质的释放和利用过程也有不同。研究显示VCT细胞专门储存糖原,因此也称其为糖原细胞(glycogen-cells),ADG细胞中同时含有脂质和蛋白质^[25]。本研究中长牡蛎性腺的组织化学结果显示,位于滤泡腔周围的贮藏细胞形态特征相似,细胞体积大、形状不规则,细胞核位于外围,细胞质中充满糖原颗粒和脂滴,这与之前Yurchenko等^[26]的研究发现基本一致,即牡蛎中糖原和脂质同时贮存在VCT细胞的细胞质中,这与贻贝VCT细胞贮存糖原、ADG细胞贮存脂质和蛋白质不同。牡蛎VCT细胞在形态上与哺乳动物的褐色脂肪细胞相似,细胞表面含有大量的胞质突,能量物质可能通过胞质突向周围细胞进行能量转运^[26]。本研究中也发现,长牡蛎糖原在VCT细胞中分布不均,这种分布特征是否与糖原的分解和能量转运有关,还有待深入研究。

3.2 不同倍性长牡蛎在性腺发育过程中的糖原和脂质变化

增殖期的长牡蛎性腺结缔组织中积累了大量的以糖原为主的多糖类物质(图版I-1~2,图版II-1),随着性腺的发育,二倍体长牡蛎和三倍体 α 型(可育型)长牡蛎的糖原含量持续下降,到成熟期几乎耗尽,这与之前测得的可育型三倍体长牡蛎在性腺发育过程中糖原的变化一致^[16],说明在性腺发育初期,主要靠糖原为生殖细胞的发育提供能量。而 β 型(不育型)三倍体长牡蛎在性腺发育初期也积累了大量的糖原,但到了生长期(图版II-4~5),糖原颗粒消失,结缔组织的细胞质颜色明显

变深,成熟期(图版II-8~9)也没有明显的糖原颗粒。王朔等^[16]利用近红外光谱法对 β 型三倍体长牡蛎在性腺发育过程中的性腺组织进行分析,发现糖原含量没有发生显著变化,一直处于较高水平,因此推测 β 型三倍体长牡蛎性腺组织中的糖原储存可能存在其他形式。目前关于糖原储存主要有两种代谢假说:一是在单个细胞中同时存在糖原的合成与分解调动两种不同的代谢方向^[27];另一种是糖原储存存在两种形式:短期储存在ADG细胞中^[28]和呈弥漫状态长期储存在VCT细胞中^[29]。根据性腺发育中的糖原检测结果推测, β 型三倍体长牡蛎的糖原储存可能是属于前者,当性腺发育停滞时,原本聚集起来的糖原又重新恢复至细颗粒或者更小颗粒的状态。也有可能因糖原不能被运送到生殖细胞中或者运送不足从而导致不育。糖原的储存和能量转化机制与配子发生的关系仍需进一步研究。

脂质对动物的性腺发育有重要影响,是维持性腺发育的能量物质^[30]。脂类物质是卵母细胞中的重要营养成分,也是卵黄的重要成分,脂质的贮存与利用和贝类的繁殖活动密切相关^[16]。本研究中,在卵黄形成初期和盛期时的卵母细胞需要大量的脂质来合成脂滴和卵黄,但二倍体长牡蛎和 α 型长牡蛎的脂类物质在生长期的减少不明显,说明脂质的积累存在某种特殊的转化。有研究证明,糖原可以转化为脂质以满足这一阶段的物质需求^[31],而糖原和脂质共同贮存在VCT细胞中,也有利于糖原转化为脂质。三倍体 β 型长牡蛎的性腺发育过程中,脂质的变化不甚明显,卵黄形成初期的卵母细胞(图版IV-6)脂滴含量相比于可育型明显降低,说明脂质没有被运送到卵母细胞中,这可能是三倍体 β 型牡蛎不育的原因之一。

综上所述,糖原和脂质在三倍体 β 型长牡蛎性腺发育初期有一定的积累,但是发育过程中糖原和脂质并没有被运送至生殖细胞,而是滞留在结缔组织贮藏细胞中,这些能量物质的滞留可能是不育型三倍体长牡蛎在繁殖季节仍然可以保持快速生长的重要物质基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献(References):

- [1] Gómez-Robles E, Rodríguez-Jaramillo C, Saucedo P E. Digital image analysis of lipid and protein histochemical

- markers for measuring oocyte development and quality in pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2005, 24(4): 1197-1202.
- [2] Ansell A D. Seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Abra alba* from the Clyde Sea Area[J]. *Marine Biology*, 1974, 25(1): 13-20.
- [3] Ansell A D. Seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Chlamys septemradiata* from the Clyde Sea Area[J]. *Marine Biology*, 1974, 25(2): 85-99.
- [4] Bayne B L. Aspects of reproduction in bivalve molluscs[M]//Wiley M. Estuarine processes. New York: Academic Press, 1976: 432-448.
- [5] Barber B J, Blake N J. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1981, 52(2-3): 121-134.
- [6] Guo X M, DeBrosse G A, Allen Jr S K. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids[J]. *Aquaculture*, 1996, 142(3-4): 149-161.
- [7] 田传远, 王如才, 梁英, 等. 6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体——4. 四倍体现象的研究[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 1998, 28(4): 560-566.
- Tian C Y, Wang R C, Liang Y, et al. Triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) induced with 6-DMAP: 4. Studies on the tetraploid[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1998, 28(4): 560-566 (in Chinese).
- [8] Guo X M, Allen Jr S K. Viable tetraploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunburg) produced by inhibiting polar body I in eggs of triploids[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(1): 42-50.
- [9] Jouaux A, Heude-Berthelin C, Sourdain P, et al. Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2010, 395(1-2): 162-170.
- [10] 曾志南, 林琪, 吴建绍, 等. 二倍体和三倍体太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)肉重和生化成分的周年变化[J]. *海洋科学*, 1999, 23(5): 54-56.
- Zeng Z N, Lin Q, Wu J S, et al. A annual changes of meat weight and biochemical composition between diploids and triploids in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Marine Sciences*, 1999, 23(5): 54-56 (in Chinese).
- [11] 刘文广, 李琪, 高凤祥, 等. 长牡蛎繁殖周期、生化成分的季节变化与环境因子的关系[J]. *热带海洋学报*, 2011, 30(3): 88-93.
- Liu W G, Li Q, Gao F X, et al. Seasonal variation in reproductive cycle and biochemical composition in relation to environmental factors in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2011, 30(3): 88-93 (in Chinese).
- [12] Soudant P, van Ryckeghem K, Marty Y, et al. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 123(2): 209-222.
- [13] Allen Jr S K, Downing S L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1986, 102(2-3): 197-208.
- [14] Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 125(3): 359-369.
- [15] 孔令锋, 王昭萍, 于瑞海, 等. 二倍体和三倍体太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)繁殖前后生化成分及氨基酸组成的比较研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2001(4): 44-49.
- Kong L F, Wang Z P, Yu R H, et al. Comparison of biochemical composition and amino acid contents between diploid and triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, pre-and-post spawning[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2001(4): 44-49 (in Chinese).
- [16] 王朔, 薛茗元, 杨琼, 等. 不同育性三倍体长牡蛎性腺发育过程中的营养成分比较[J]. *水产学报*, 2021, 45(1): 88-97.
- Wang S, Xue M Y, Yang Q, et al. Comparison of nutritional components of different fertility triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) during gonadal development[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(1): 88-97 (in Chinese).
- [17] Kennedy V S, Newell R I E, Eble A F. The eastern oyster *Crassostrea virginica*[M]. Maryland: Maryland

- Sea Grant College, 1996: 467-513.
- [18] Walker C W, Lesser M P, Unuma T. Sea urchin gametogenesis-structural, functional and molecular/genomic biology[J]. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 2013, 38: 25-43.
- [19] Harrold C, Pearse J S. Allocation of pyloric caecum reserves in FED and starved sea stars, *Pisaster giganteus* (Stimpson): somatic maintenance comes before reproduction[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1980, 48(2): 169-183.
- [20] Eckelbarger K J. Evolutionary radiation in polychaete ovaries and vitellogenic mechanisms: their possible role in life history patterns[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1983, 61(3): 487-504.
- [21] Gilchrist B M, Zagalsky P F. Isolation of a blue canthaxanthin-protein from connective tissue storage cells in *Branchinecta packardii* pearse (Crustacea: Anostraca) and its possible role in vitellogenesis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1983, 76(4): 885-893.
- [22] Buckup L, Dutra B K, Ribarcki F P, *et al.* Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 149(1): 59-67.
- [23] Mathieu M, Lubet P. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves—a brief review[J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 1993, 23(2-3): 123-129.
- [24] Epp J, Bricelj V M, Malouf R E. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1988, 121(2): 113-136.
- [25] Lenoir F, Robbins I, Mathieu M, *et al.* Isolation, characterization and glucose metabolism of glycogen cells (vesicular connective-tissue cells) from the labial palps of the marine mussel *Mytilus edulis*[J]. *Marine Biology*, 1989, 101(4): 495-501.
- [26] Yurchenko O V, Kalachev A V. Morphology of nutrient storage cells in the gonadal area of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)[J]. *Tissue and Cell*, 2019, 56: 7-13.
- [27] Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells[J]. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(2): 136-145.
- [28] Gabbott P A. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs[M]//Hochachka P W. The Mollusca: Volume 2: environmental biochemistry and physiology. New York: Academic Press, 1983: 165-217.
- [29] Pipe R K. Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*[J]. *Marine Biology*, 1987, 96(4): 519-528.
- [30] 黄晓春, 刘慧慧, 苏秀榕, 等. 7种经济贝类生殖腺脂肪酸含量的研究[J]. *水产科学*, 2005, 24(8): 20-22.
- Huang X C, Liu H H, Su X R, *et al.* Fatty acid levels in 7 economic shellfishes[J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(8): 20-22 (in Chinese).
- [31] Gabbott P A. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis[M]//Barnes H B. Ninth European marine biology symposium. Aberdeen: Aberdeen University Press, 1975: 191-211.

Histochemical study of glycogen and lipid of different fertility Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) during gonadal development

WANG Shuo^{1,2}, YU Hong^{1,3*}, LI Qi^{1,3}

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Dalian Key Laboratory of Genetic Resources for Marine Shellfish,

Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: Shellfish culture is one of the pillar industries of China's mariculture industry, and oyster is the species with the highest yield and output value. *Crassostrea gigas*, also known as Pacific oyster, is one of the leading species of oyster culture in China, which is characterized by high fertility, strong adaptability, rapid growth and rich nutrition. In order to solve the problem of diploid oysters with reduced meat quality due to spawning in summer, triploid oysters were successfully cultivated. Because of their poor fertility and high quality in breeding season, the market vacancy of diploid oysters in summer was made up for. The study of the regulatory mechanism of gonadal development has always been one of the hot research fields in developmental biology. Gonad development is accompanied by energy storage and utilization. Analysis of energy storage and consumption during gonadal development helps to reveal the regulation mechanism of gonadal development. Therefore, to carry out research on energy changes and related regulation mechanisms in the development of gonads of different fertility oysters has important scientific significance and important application value. In order to investigate the utilization and change of the main energy supply substances during the gonadal development of different fertility *C. gigas*, the gonadal tissues of triploid and diploid *C. gigas* were observed and analyzed by using the methods of PAS staining and oil red O staining. The results showed that a large amount of glycogen and lipid are accumulated in the gonadal connective tissue of both diploid and triploid *C. gigas* during the proliferation stage. With the development of gonad, the content of glycogen in the gonadal connective tissue of diploid and fertile triploid (3n α type) *C. gigas* decrease significantly, and almost no glycogen is detected at maturity stage, indicating that the glycogen in the gonadal connective tissue provides energy for gametogenesis. Lipids mainly existed in the connective tissue and cytoplasm of oocytes in the female diploid and 3n α gonad of *C. gigas*, indicating that lipids were an important component of oocyte development. The content of lipids in gonadal connective tissue of female diploid and 3n α type *C. gigas* does not decrease significantly with gonadal development, so it is speculated that glycogen may be converted into lipids to meet the material needs of gonad development. Lipids are significantly reduced during the gonadal development in diploid male *C. gigas*, indicating that the main function of lipids in the gonadal development of male *C. gigas* may be energy supply rather than structural composition. As important energy supply and components in the gonadal development of *C. gigas*, their content shows no significant change during the gonadal development of sterile triploid (3n β type) *C. gigas*, and this is closely related to the locked gametogenesis of the 3n β . It is speculated that glycogen and lipid accumulated at the early stage of gonadal development of 3n β can not be transported to germ cells, but remain in connective tissue due to the blocked gametogenesis, so that the sterile triploid *C. gigas* can still grow rapidly during the reproductive season. The results of this study provide important information for the regulation mechanism of oyster reproductive development and fertility control breeding.

Key words: *Crassostrea gigas*; triploid; glycogen; lipid; histochemistry

Corresponding author: YU Hong. E-mail: hongyu@ouc.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0900200); National Natural Science Foundation of China (31672649)