



青蛤染色体制备及核型分析

段海宝^{1,2}, 陈义华³, 董志国^{1,2*}, 张敏^{1,2}, 葛红星¹,
魏敏^{1,2}, 周丽青⁴, 符翔超¹, 孙泽鹏²

(1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

3. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 以青蛤成体鳃组织和性成熟的雌、雄青蛤性腺为材料, 采用常规制片方法, 分别制备青蛤二倍体染色体和单倍体染色体, 统计染色体数目。结果显示, 青蛤二倍体与单倍体染色体数目分别为 $2n=38$ 和 $n=19$; 核型分析发现, 青蛤核型组成为 $11m+6sm+2st$, $NF=76$, 未发现性染色体和随体染色体。本研究以青蛤成熟性腺为制备材料, 成功制备单倍体染色体, 与青蛤二倍体染色体互相印证, 弥补了以往研究的不足, 进一步丰富了对青蛤染色体数目及核型组成的认知。同时, 也为青蛤染色体水平全基因组测序组装提供更加科学的基础资料。

关键词: 青蛤; 染色体; 性染色体; 单倍体; 核型分析

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

青蛤 (*Cyclina sinensis*) 属瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 帘蛤目 (Venerida), 帘蛤科 (Veneridae), 是我国南北沿海习见的一种肉质鲜美、营养丰富的经济滩涂贝类^[1]。近年来, 随着近海环境的恶化和青蛤种质资源的退化, 使得青蛤自然资源日益减少。但由于其巨大的商业潜在价值, 迫切需要发掘青蛤优良的种质资源, 而开展良种选育需要遗传学和生物学基础作为支撑。

染色体是遗传物质的载体, 是研究细胞遗传学的基础^[2]。对染色体的研究, 不仅可以在分类系统中探讨其地位, 了解系统演化过程, 还可以为一些重要养殖种类杂交育种及分子生物学研究等提供理论依据和实践指导^[3]。据不完全

统计, 到2014年, 我国已经发现的软体动物有4 000余种, 已进行染色体核型研究的81种, 双壳纲 (Bivalvia) 贝类52种, 已对帘蛤目中染色体有研究的为帘蛤科9种、蛤蜊科 (Mactridae) 4种、紫云蛤科 (Psammobiidae) 1种、竹蛭科 (Solenidae) 3种、刀蛭科 (Cultellidae) 2种^[4]。关于青蛤染色体, 王立新等^[5]的研究结果表明青蛤染色体数为 $2n=36$, 核型分析结果为 $6m+1sm+11t$ 。但是其染色体形态与目前已发表的其他帘蛤科贝类染色体形态有很大不同, 且没有进行染色体配对, 着丝点位置不清晰, 这些都可能造成核型分析不准确。所以, 本研究运用更加成熟的染色体制备方法和核型分析技术对青蛤染色体再分析, 以期青蛤细胞遗传学研究提供更加准确的基

收稿日期: 2019-10-16 修回日期: 2019-12-24

资助项目: 国家贝类产业技术体系专项 (CARS-49); 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (18KJA240001); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费 (20603022018004); 江苏省渔业科技类项目 (Y2018-27); 江苏省优势学科海洋科学; 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX190979, SJCX190981)

通信作者: 董志国, E-mail: dzg7712@163.com

础资料, 进而推动青蛤优良种质资源开发与利用的进程。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料由国家贝类产业技术体系连云港综合实验站提供的小规格青蛤(壳长1.0~1.5 cm) 50粒以及性成熟青蛤50粒, 将所有青蛤分别于实验室内充氧养殖, 每天投喂小球藻(*Chlorella vulgaris*)和叉鞭金藻(*Dicrateria inornata*), 以保证青蛤的正常生理状态。

1.2 实验方法

参照周丽青等^[6]的实验方法制备青蛤二倍体染色体, 并稍作改动。解剖小规格青蛤剪取鳃瓣外缘组织, 置于提前配制的含有0.02%秋水仙素的过滤海水中, 室温处理30 min, 随后将鳃组织置于0.075 mol/L的KCl溶液中低渗40 min, 小心倒掉低渗液, 加入卡诺固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)反复固定3次, 使总固定时间为1 h, 固定温度为4 °C。制片前先用50%的冰醋酸将鳃组织解离为细胞悬液, 用热滴片法滴片, 滴片温度为56 °C, 而后10% Giemsa 染液染色30 min, 自然晾干, 镜检。

用发育成熟的青蛤性腺制备单倍体染色体。解剖, 分辨雌雄, 卵巢、精巢分别用100目、300目筛绢网过滤, 制备悬浊液。参照青蛤二倍体染色体制备方法, 每次需要换溶液时, 1 000 r/min离心2~3 min。制片前, 把握细胞悬液密度, 适当稀释, 避免因为太多细胞堆叠而影响染色体分散。

1.3 青蛤染色体计数与核型分析

选取染色体分散良好、形态完整的二倍体中期分裂相和单倍体减数第二次分裂中期分裂相, 显微拍照并利用Nikon NIS-Elements BR 3.1软件测量染色体绝对长度, 使用Office 2019软件进行数据整理, 并计算相对长度和臂比, 利用Photoshop 软件提取每条染色体, 并根据Levan等^[7]确定的染色体分类标准进行结果统计, 绘制染色体核型图。相关公式:

$$\text{相对长度} = \frac{\text{每条染色体长度}}{\text{染色体组总长度}} \times 100$$

$$\text{臂比} = \frac{\text{长臂长度}}{\text{短臂长度}}$$

2 结果

2.1 青蛤染色体数目的确定

青蛤二倍体染色体数目的确定 选取66个分散较好的青蛤中期染色体视野, 统计染色体的数目及各数目所占百分比。其中, 2n=38占比最高, 为42.42%(图1), 结果表明, 青蛤二倍体染色体众数为2n=38。

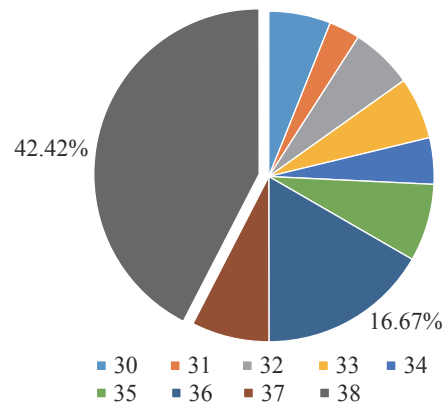


图1 青蛤中期分裂相二倍体染色体计数

图例中数字代表染色体数目, 图2同

Fig. 1 Mitotic metaphase diploid chromosome count of *C. sinensis*

Numbers in the legend represent the number of chromosomes, the same as Fig. 2

青蛤单倍体染色体数目的确定 对32个染色体分散较好的青蛤成熟性腺单倍体染色体数目进行统计, 结果表明, 染色体数目n=19占比最高, 为71.88%(图2), 这也证明了青蛤二倍体染色体2n=38。图3是青蛤性腺单倍体染色体分裂相。

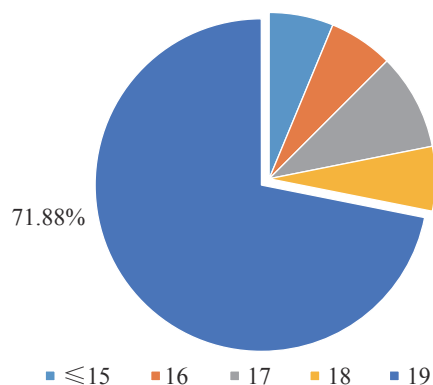


图2 青蛤性腺单倍体染色体计数

Fig. 2 Haploid chromosome count of gonad of *C. sinensis*

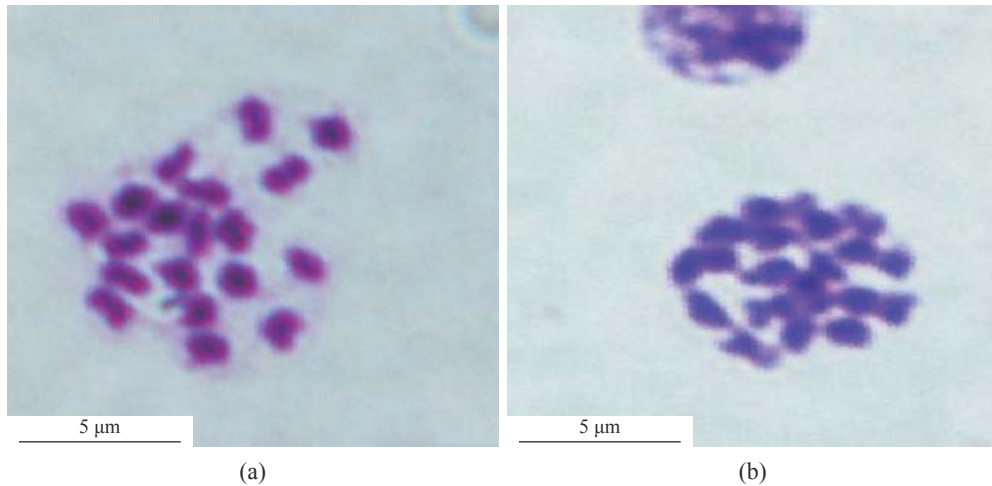


图 3 青蛤性腺单倍体染色体

(a)青蛤精巢单倍体染色体; (b)青蛤卵巢单倍体染色体

Fig. 3 Gonad haploid chromosome of *C. sinensis*

(a) testicle haploid chromosome of *C. sinensis*; (b) ovarian haploid chromosome of *C. sinensis*

2.2 青蛤二倍体染色体的核型分析

选取10个染色体收缩适中、分散良好的中期分裂相视野进行显微测量、数据分析, 计算每对染色体的相对长度和臂比, 数据以平均值±标准差(mean± SD)表示(表1)。结果显示, 青蛤染色体组型为11m+6sm+2st, 臂数NF=76, 未发现性染色体和随体。图4为青蛤核型分析图。

3 讨论

3.1 青蛤染色体的制备材料与方法

在青蛤染色体制片过程中发现, 寻找最优的制备材料是至关重要的, 除了选用具有较强细胞分裂增殖能力的稚贝和幼贝鳃组织以外, 还发现以性成熟期的青蛤精巢为制片材料能够获得较为清晰的单倍体图像, 但是由于减数分裂时存在多种复杂形态^[8], 且这一时期的染色体形态很小, 不利于核型分析^[9]。所以, 本研究以所得单倍体视野来统计青蛤单倍体染色体数, 不做核型分析。蔡岩等^[4]提出利用贝类生殖腺、胚胎或幼虫制备染色体会受到繁殖季节的限制, 但也有研究表明通过冷冻保存精卵而后解冻活化再受精^[10], 可以在一定程度上使得反季操作成为可能。关于以性腺制备单倍体染色体并做核型分析, 证明性染色体是否存在的想法, 还需进一步研究证实。

3.2 青蛤染色体总数与染色体组型

本研究结果在青蛤染色体总数及染色体组

表 1 青蛤染色体类型、相对长度及臂比

Tab. 1 Relative length and arm ratio of metaphase chromosome of *C. sinensis*

| 染色体序号 chromosome no. | 相对长度 relative length | 臂比 arm ratio | 类型 type |
|-------------------------|-------------------------|-----------------|------------|
| 1 | 1.31 ± 0.29 | 2.88 ± 0.43 | m |
| 2 | 1.05 ± 0.03 | 2.47 ± 0.63 | m |
| 3 | 1.62 ± 0.15 | 2.62 ± 0.52 | m |
| 4 | 1.11 ± 0.11 | 2.67 ± 0.41 | m |
| 5 | 1.49 ± 0.15 | 2.73 ± 0.62 | m |
| 6 | 1.26 ± 0.10 | 2.62 ± 0.61 | m |
| 7 | 1.33 ± 0.11 | 2.70 ± 0.50 | m |
| 8 | 1.16 ± 0.05 | 2.49 ± 0.44 | m |
| 9 | 1.60 ± 0.17 | 2.69 ± 0.57 | m |
| 10 | 1.39 ± 0.12 | 2.50 ± 0.48 | m |
| 11 | 1.11 ± 0.04 | 2.42 ± 0.35 | m |
| 12 | 2.32 ± 0.39 | 2.74 ± 0.39 | sm |
| 13 | 1.82 ± 0.19 | 2.60 ± 0.40 | sm |
| 14 | 2.02 ± 0.27 | 2.69 ± 0.38 | sm |
| 15 | 2.47 ± 0.61 | 2.75 ± 0.52 | sm |
| 16 | 1.79 ± 0.16 | 2.67 ± 0.34 | sm |
| 17 | 1.73 ± 0.16 | 2.50 ± 0.51 | sm |
| 18 | 3.20 ± 0.72 | 2.63 ± 0.34 | st |
| 19 | 3.87 ± 0.91 | 2.59 ± 0.45 | st |

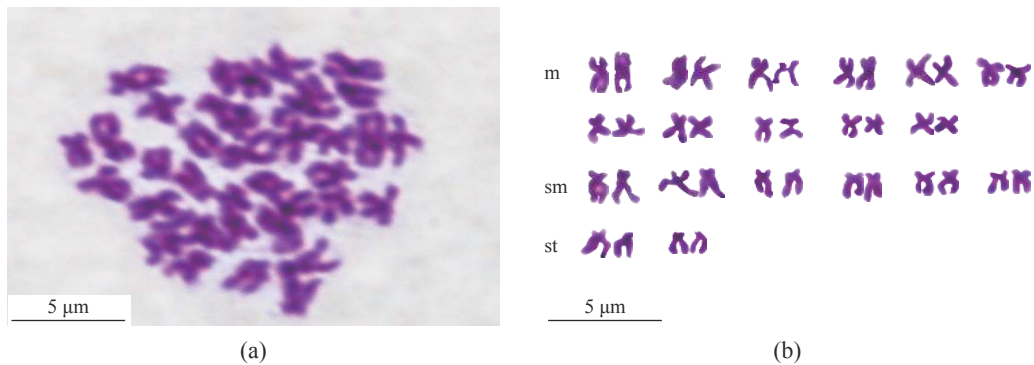


图4 青蛤中期分裂相染色体及核型

(a)青蛤中期分裂相染色体; (b)青蛤染色体核型

Fig. 4 Metaphase chromosome and karyotype of *C. sinensis*(a) metaphase chromosomes of *C. sinensis*; (b) karyotype of *C. sinensis*

型方面与王立新等^[5]对青蛤染色体的研究有很大程度的不同,早期研究结果为青蛤二倍体染色体 $2n=36$,染色体组型为 $6m+1sm+11t$ 。出现这种差别的原因可能与所用制片青蛤材料的数量、染色体统计中的有效样本数和实验研究手段存在一定的差异有关。另外,本研究中也观察到有相当一部分视野是非整数倍染色体,这可能是由于染色体制备过程中有丢失现象存在,也可能是青蛤的遗传组成或者受外界条件的影响,导致了染色体数目的永久性畸变^[11-12]。相同物种的染色体核型多样性在贝类中较为常见^[13],张建鹏等^[14]对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)、西氏鲍(*H. gigantea*)、绿鲍(*H. fulgens*)和杂色鲍(*H. diversicolor*)染色体核型的研究结果表明,4种鲍所拥有的染色体组型有明显的差别。研究者采用不同的秋水仙素浓度、低渗液浓度以及处理

时间也会影响到染色体的长度和形态^[15]。

郑小东等^[3]总结的89种贝类染色体组型中,大多数贝类具有半数以上的中部(M)和亚中部(SM)着丝粒染色体。在动物的进化过程中,端部着丝粒染色体是染色体的原始核型,具有较多中部染色体和亚中部染色体的种类要比具有较多端部着丝粒染色体和亚端部着丝粒染色体的种类更加高级或特化^[16-17]。这在一定程度上支持了本研究中对青蛤核型的研究结果,也表明了青蛤具有一定的遗传稳定性。青蛤二倍体染色体为 $2n=38$,也符合多数帘蛤科贝类的染色体具有一定遗传保守性的特征(表2)。周丽青等^[6]在栉江珧(*Atrina pectinata*)染色体研究中发现,栉江珧存在初级的性别分化,且属于XX/XY型性别决定方式,并对性染色体进行了定位。除此之外,其他双壳贝类中尚未发现明显的性染色体,本

表2 帘蛤科贝类染色体研究现状

Tab. 2 Current status of chromosome research of Veneridae

| 序号 no. | 种名 species | 核型 karyotype | 染色体数目 chromosome number (2n) | 参考文献 reference |
|-----------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------|
| 1 | 菲律宾蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i> | 14m + 5sm | 38 | [18] |
| 2 | 文蛤 <i>Meretrix meretrix</i> | 9m + 7sm + 3t 9m + 10sm | 38 | [19] [20] |
| 3 | 紫石房蛤 <i>Saxidomus purpurata</i> | 16m + 1sm + 2st | 38 | [21] |
| 4 | 硬壳蛤 <i>Mercenaria mercenaria</i> | 14m + 4sm + 1st | 38 | [22] |
| 5 | 波纹巴非蛤 <i>Paphia undulata</i> | 14m + 12sm + 4st | 38 | [23] |
| 6 | 等边浅蛤 <i>Gomphina aequilatera</i> | 8m + 10sm | 36 | [24] |
| 7 | 日本镜蛤 <i>Dosinia japonica</i> | 5m + 6m + 4st | 30 | [25] |
| 8 | 青蛤 <i>Cyclina sinensis</i> | 11m + 6sm + 2st | 38 | 本研究 |
| 9 | 江户布目蛤 <i>Protothaca jadoensis</i> | 4m + 11t | 30 | [26] |

研究结果与大多数双壳贝类一致, 未发现青蛤存在性染色体。

3.3 青蛤系统发育地位

本研究利用成熟的制片方法和先进的仪器、软件, 再认识青蛤染色体核型, 所得结果又在一定程度上深化了对青蛤遗传地位已有的看法。有研究表明, 青蛤与等边浅蛤(2n=36)有着较为密切的亲缘关系^[27], 而本研究结果表明青蛤染色体2n=38, 所以就染色体数目而言, 青蛤与等边浅蛤可能不存在较为密切的亲缘关系; 但是青蛤与文蛤(2n=38)^[19]在染色体数目上相同, 二者可能存在较为密切的亲缘关系。程汉良等^[28]基于16S rDNA序列对帘蛤科贝类的系统发育进行研究, 结果表明, 青蛤与文蛤有着较为密切的亲缘关系, 而与等边浅蛤在分子发育系统上亲缘关系较远。赵婷等^[29]对我国重要帘蛤科贝类16S rDNA序列系统学分析也得出类似的结果。此外, m/sm染色体组型较稳定, 而st/t染色体较多变, 端部着丝粒染色体是染色体的较原始核型^[17]。比较青蛤和文蛤的染色体组型可以发现, 青蛤没有端部着丝粒染色体, 可能是较文蛤在进化系统中更为高级的帘蛤科贝类。但常建波等^[20]对文蛤染色体组型的研究结果中, 文蛤染色体均为m或sm, 可能又较青蛤在帘蛤科系统发育中更高级。关于贝类分类和早期进化规律, 以及解决诸如此类的矛盾结果, 还需要更多的研究数据证明和更多分子水平上的探讨。

综上, 本研究成功地在青蛤成熟性腺中制备了较为完整的单倍体染色体, 为贝类染色体研究以及细胞遗传学研究提供了新思路; 对青蛤染色体数目和染色体组型的新发现, 修订了以往的研究成果, 进一步丰富了对青蛤染色体数目及核型组成的认知, 有助于双壳贝类尤其是帘蛤科贝类的系统发育研究和遗传学研究, 对青蛤细胞遗传学和相关研究具有重要的科学和应用价值。

参考文献:

- [1] 于业绍, 陆平, 王慧, 等. 青蛤生境及生长[J]. 水产学报, 1995, 19(3): 276-279.
- Yu Y S, Lu P, Wang H, et al. Habitat and growth of clam (*Cyclina sinensis* Gmelin)[J]. Journal of Fisheries of China, 1995, 19(3): 276-279(in Chinese).
- [2] 张莎, 俞树惠, 邱高峰. 克氏原螯虾染色体及其核型[J]. 水产学报, 2018, 42(10): 1513-1519.
- Zhang S, Yu S H, Qiu G F. Chromosome and karyotype of the crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(10): 1513-1519(in Chinese).
- [3] 郑小东, 王昭萍, 王如才, 等. 双壳类动物染色体研究现状及进展[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(3): 101-108.
- Zheng X D, Wang Z P, Wang R C, et al. Progress on bivalve chromosome studies: a review[J]. Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas, 2000, 18(3): 101-108(in Chinese).
- [4] 蔡岩, 周永灿, 冯永勤, 等. 中国贝类染色体研究现状与进展[J]. 热带生物学报, 2014, 5(3): 297-306.
- Cai Y, Zhou Y C, Feng Y Q, et al. Review of chromosome studies of mollusks in China[J]. Journal of Tropical Biology, 2014, 5(3): 297-306(in Chinese).
- [5] 王立新, 相建海, 周令华. 青蛤的染色体研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(1): 94-99.
- Wang L X, Xiang J H, Zhou L H. Chromosome study of *Cyclina sinensis* Gmelin[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2001, 29(1): 94-99(in Chinese).
- [6] 周丽青, 王雪梅, 吴彪, 等. 栉江珧染色体制备及核型分析[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 66-72.
- Zhou L Q, Wang X M, Wu B, et al. Chromosome preparation and karyotypes analysis of both male and female *Atrina pectinata*[J]. Progress in Fishery Science, 2018, 39(5): 66-72(in Chinese).
- [7] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [8] 张礼生, 张青文, 蔡青年, 等. 烟青虫精母细胞减数分裂及单倍体核型研究[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4): 18-23.
- Zhang L S, Zhang Q W, Cai Q N, et al. Spermatocytes monoploid and karyotype of *Helicoverpa assulta*[J]. Journal of China Agricultural University, 2004, 9(4): 18-23(in Chinese).
- [9] 赵洋. 杂交扇贝的细胞遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- Zhao Y. Cytogenetic study on hybrid scallops[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2003 (in Chinese).
- [10] Paredes E. Exploring the evolution of marine

- invertebrate cryopreservation-landmarks, state of the art and future lines of research[J]. *Cryobiology*, 2015, 71(2): 198-209.
- [11] Thiriou-Quévieux C, Noël T, Bougrier S, *et al.* Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 1988, 75(1-2): 89-96.
- [12] Dixon D R. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock[J]. *Marine Biology Letters*, 1982, 3(3): 155-161.
- [13] Cai M Y, Ke C H, Luo X, *et al.* Karyological studies of the hybrid larvae of *Haliotis diversicolor supertexta* female and *Haliotis discus discus* male[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29(3): 735-740.
- [14] 张健鹏, 王铜毅, 骆轩, 等. 四种鲍45S *rDNA*在染色体上的比较定位[J]. 水产学报, 2019, 43(12): 2459-2467.
- Zhang J P, Wang T Y, Luo X, *et al.* Comparative chromosome mapping of 45S *rDNA* in four species of abalone[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(12): 2459-2467(in Chinese).
- [15] 孙振兴. 一种观察贝类染色体的制片法[J]. 动物学杂志, 1991, 26(4): 34-35.
- Sun Z X. A method for observing the shellfish chromosome[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1991, 26(4): 34-35(in Chinese).
- [16] 陈宜峰, 罗丽华, 单祥年, 等. 中国灵长类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- Chen Y F, Luo L H, Shan X N, *et al.* Chinese primate chromosome[M]. Beijing: Science Press, 1981 (in Chinese).
- [17] 王梅林, 郑家声, 朱丽岩, 等. 我国海洋鱼类和贝类染色体组型研究进展[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 277-284.
- Wang M L, Zheng J S, Zhu L Y, *et al.* Advances on karyotype study of marine fish and shellfish in China[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2000, 30(2): 277-284(in Chinese).
- [18] 王金星, 赵小凡, 周岭华, 等. 三种贝类的核型分析[J]. 海洋学报, 1998, 20(2): 102-107.
- Wang J X, Zhao X F, Zhou L H, *et al.* Karyotypes of three species of marine bivalve molluscs[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1998, 20(2): 102-107(in Chinese).
- [19] 吴萍, 董建萍, 倪建国, 等. 文蛤染色体的研究[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(2): 106-109.
- Wu P, Dong J B, Ni J G, *et al.* The study on chromosomes of *Meretrix meretrix*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2002, 11(2): 106-109(in Chinese).
- [20] 常建波, 魏利平, 杨建敏, 等. 文蛤染色体核型及三倍体诱导的初步研究[J]. 水产学报, 1996, 20(3): 269-274.
- Chang J B, Wei L P, Yang J M, *et al.* A preliminary study on the karyotype and triploid induction in *Meretrix meretrix*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1996, 20(3): 269-274(in Chinese).
- [21] Sun Z X, Shao Y Q, Guo S C, *et al.* Karyotypes of three species of the marine Veneroida molluscs[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 22(4): 671-678.
- [22] 郑小东, 张涛, 黄水英, 等. 硬壳蛤的核型研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(8): 71-74.
- Zheng X D, Zhang T, Huang S Y, *et al.* The karyotype of hard clam *Mercentaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)[J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(8): 71-74(in Chinese).
- [23] 蔡明夷, 郭洋, 柯才焕, 等. 波纹巴非蛤染色体核型分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2012, 51(5): 935-938.
- Cai M Y, Guo Y, Ke C H, *et al.* Karyotype analysis on *Paphia undulata*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*, 2012, 51(5): 935-938(in Chinese).
- [24] 于瑞海, 王昭萍, 邸炜鹏, 等. 等边浅蛤染色体核型分析的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2010(3): 61-64.
- Yu R H, Wang Z P, Di W P, *et al.* Analysis of chromosomal karyotype of *Gomphina veneriformis*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2010(3): 61-64(in Chinese).
- [25] 阙华勇, 齐秋贞, 邱文仁. 帘蛤目(瓣鳃纲)四个种类的核型研究[C]//贝类学论文集(VIII). 北京: 学苑出版社, 1999: 75-85.
- Que H Y, Qi Q Z, Qiu W R. Karyotype of four species in Veneroida (Lamellibranchia)[C]//Proceedings of conchology(VIII). Beijing: Xueyuan Publishing House, 1999: 75-85 (in Chinese).
- [26] 李鹏. 北方沿海三种双壳贝类染色体的研究[D]. 烟台: 鲁东大学, 2008.
- Li P. Studies on the chromosomes of three species of bivalve shellfish along the northern coast[D]. Yantai: Ludong University, 2008 (in Chinese).

- [27] 李鹏, 孙振兴. 2种双壳贝类染色体的观察研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(12): 5012-5013.
Li P, Sun Z X. Observation on the chromosomes in 2 species of bivalve[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2008, 36(12): 5012-5013(in Chinese).
- [28] 程汉良, 周旻纯, 陈冬勤, 等. 基于16S rDNA序列的帘蛤科贝类分子系统发育研究[J]. *水产科学*, 2012, 31(11): 657-662.
Cheng H L, Zhou M C, Chen D Q, *et al.* Phylogenetic analysis of Veneridae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial 16S rDNA[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(11): 657-662(in Chinese).
- [29] 赵婷, 吴琪, 潘宝平. 我国重要帘蛤科(Veneridae)贝类的16S rRNA序列系统学分析[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(6): 1500-1505.
Zhao T, Wu Q, Pan B P. Molecular phylogeny of Veneridae (Mollusca, Bivalvia) based on 16s rRNA sequences[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(6): 1500-1505(in Chinese).

Chromosome preparation and karyotype analysis of *Cyclina sinensis*

DUAN Haibao^{1,2}, CHEN Yihua³, DONG Zhiguo^{1,2*}, ZHANG Min^{1,2}, GE Hongxing¹,
WEI Min^{1,2}, ZHOU Liqing⁴, FU Xiangchao¹, SUN Zepeng²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The clam *Cyclina sinensis* is an economically important shellfish in China, and it is urgent to explore the excellent germplasm resources of *C. sinensis*. This requires the support of accurate genetic and biological basic materials. In order to accurately understand the number of chromosome and its karyotype composition of *C. sinensis*, we prepared diploid chromosomes and haploid chromosomes from the gill tissue and mature gonad of *C. sinensis*, respectively. The results showed that the chromosome number of diploid was $2n = 38$ and haploid was $n = 19$. On the basis of the above experiments, the well dispersed visual field of diploid chromosomes was measured by microphotography, and the karyotype was analyzed. The result of experiment indicates that the karyotype is $11m+6sm+2st$, $NF=76$, and no heterosome and satellite chromosome were found. In this study, the haploid chromosome was successfully prepared by the mature gonads of the clam, which was to provide a new idea for molluscs chromosome studying. Moreover, the new discovery on chromosome number and karyotype of *C. sinensis* makes up for the results of previous studies, which was $2n = 36$. And it contributed to the more correct direction of phylogenetic research and genetic research of bivalve molluscs, also provided more scientific basis for whole genome sequencing assembly of *C. sinensis*.

Key words: *Cyclina sinensis*; chromosome; heterosome; haploid; karyotype analysis

Corresponding author: DONG Zhiguo. E-mail: dzg7712@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-49); Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (18KJA240001); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022018004); Project of Jiangsu Fisheries Science and Technology (Y2018-27); Priority Academic Program Development of Jiangsu (Marine Sciences); Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX190979, SJCX190981)