

菲律宾蛤仔雌核发育二倍体与单倍体染色体制备及核型



黎强^{1,2}, 聂鸿涛^{1,2*}, 王滨³, 周贺², 霍忠明^{1,2}, 闫喜武^{1,2}

1. 大连海洋大学, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023; 3. 大连金砣水产食品有限公司, 辽宁 大连 116400

摘要:

【目的】研究菲律宾蛤仔雌核发育二倍体、单倍体和正常二倍体的核型。

【方法】选取菲律宾蛤仔雌核发育二倍体、单倍体以及正常二倍体幼虫(对照组), 采用热滴片法分别制作染色体滴片, 统计染色体数目并进行核型分析。

【结果】菲律宾蛤仔雌核发育二倍体和正常二倍体染色体数目为 38 条, 单倍体为 19 条。核型分析结果显示, 菲律宾蛤仔雌核发育二倍体和正常二倍体核型公式为 $2n=18m+20sm$, $NF=76$, 单倍体核型为 $n=9m+10sm$, $NF=38$, 本实验从染色体形态上未发现性染色体和随体。

【结论】菲律宾蛤仔仅有 m 和 sm 两种类型的染色体, 雌核发育二倍体核型同正常二倍体核型相同, 单倍体染色体类型同正常二倍体一致且数目为二倍体的一半。本研究以菲律宾蛤仔担轮幼虫为材料, 利用热滴片法获得了菲律宾蛤仔雌核发育二倍体、单倍体和正常二倍体的染色体中期分裂相及核型分析结果, 丰富了菲律宾蛤仔雌核发育和单倍体染色体相关研究以及对菲律宾蛤仔染色体数目及核型组成的认知。同时, 对菲律宾蛤仔细胞遗传学以及遗传育种相关研究具有重要参考价值。

关键词: 菲律宾蛤仔; 雌核发育; 单倍体; 核型分析; 担轮幼虫; 染色体

第一作者: 黎强, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: 2017784141@qq.com



通信作者: 聂鸿涛, 从事水产遗传育种与繁殖研究, E-mail: htnie@dlou.edu.cn



资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901400); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-49); 辽宁省“兴辽英才计划”青年拔尖人才(XLYC2403165); 辽宁省教育厅基本科研项目(LJ212410158027); 大连市杰出青年科技人才项目(2024RJ014)

收稿日期: 2024-03-10

修回日期: 2024-05-12

文章编号:

1000-0615(2025)06-069614-09

中图分类号: S 968.31

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 隶属于双壳纲 (Lamellibranchia) 帘蛤目 (Venerida) 帘蛤科 (Veneridae) 蛤仔属 (*Ruditapes*), 是我国重要的海产经济贝类^[1]。据联合国粮食及农业组织 (FAO) 统计, 2022 年菲律宾蛤仔世界总产量约为 426.6 万 t, 是海洋滩涂贝类养殖的重要种类^[2]。近年来, 由于沿海环境逐渐恶化, 人为过度捕捞等原因, 导致菲律宾蛤仔自然资源逐渐减少, 种质资源日益退化^[3]。菲律宾蛤仔“南苗北养”的模式导致北方种群出现混杂, 近几年也出现养殖成活率低等问题^[4]。因此, 开展菲律宾蛤仔的种质资源保护与遗传育种研究变得十分重要。



染色体相关研究是细胞遗传学的基础, 在现代分类学、生物进化以及遗传育种等领域被广泛应用^[5]。在贝类中, 已经开展了大量核型分析相关研究, 如西施舌 (*Coelomactra antiquata*)^[6]、硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*)^[7]、青蛤 (*Cyclina sinensis*)^[8]、波纹巴非蛤 (*Paphia undulata*)^[9]、彩虹明樱蛤 (*Moerella iridescens*)^[10] 等。关于菲律宾蛤仔核型分析相关研究目前仅见于王金星等^[11]及 Borsa 等^[12], 他们的研究表明, 菲律宾蛤仔染色体为 $2n=38$ 条, 核型分别为 $28m+10sm$ 和 $18m+20sm$ 。雌核发育是一种能在较短的时间内提高家系遗传纯合度的育种方法, 能够快速建立纯系, 并且雌核发育个体是遗传学分析重要的材料^[13]。在贝类中, 雌核发育研究起步较晚, 研究内容主要集中在诱导条件地摸索、雌核发育二倍体遗传学分析以及雌核发育后代细胞学研究等方面^[14], 而关于菲律宾蛤仔雌核发育材料的染色体相关研究还未见报道。

本研究选用前期诱导的雌核发育菲律宾蛤仔及正常二倍体幼虫为实验材料, 利用热滴染色体制备方法对菲律宾蛤仔雌核发育二倍体、单倍体及正常二倍体进行核型分析, 为菲律宾蛤仔遗传育种及细胞遗传学研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菲律宾蛤仔雌核发育二倍体幼虫为 2023 年 7—8 月在大连金砣水产食品有限公司贝类育苗场进行培育, 菲律宾蛤仔亲本采自山东威海沿海, 为性腺发育良好的 2 龄种贝。将所有菲律宾蛤仔分别于育苗池中充气培养, 每天投喂单胞藻。对性腺发育成熟的菲律宾蛤仔亲贝进行人工催产, 使雌雄亲本单个产卵和排精, 分别获得精子和卵子, 镜检确保无污染后进行雌核发育诱导实验。雌核发育二倍体诱导方法参考聂涛涛等^[13]在皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hananai*) 和栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 雌核发育二倍体研究中的诱导方法, 并稍作调整, 使用 $230 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外线照射精子 9 s, 照射剂量为 $2\,070 \mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$, 之后同卵子进行受精, 通过显微镜观察受精卵, 当 80% 的受精卵排出第一极体 (PB1) 时采用细胞松弛素 B (CB, 0.75 mg/L) 持续处理 20 min, 随后采用 0.1% 的二甲基亚砷

海水溶液冲洗受精卵, 最后将受精卵置于干净的海水中进行培养。未经 CB 加倍处理的为单倍体组, 精子未经紫外线照射的为正常二倍体组, 雌核发育二倍体组、单倍体组和正常二倍体组幼虫在相同条件下培养, 待胚胎发育至担轮幼虫时期进行染色体制备的取样。实验过程严格遵守实验动物伦理规范。

1.2 实验方法

菲律宾蛤仔雌核发育幼虫染色体滴片制备参考袁美云等^[15]的方法, 并稍作改动。取少许担轮幼虫于离心管中 (单倍体组取原肠胚进行实验), 加入 0.1% 秋水仙素海水溶液处理 3 h, 随后转移至 0.075 mol/L 的 KCl 溶液中反渗透 80 min, 离心去除 KCl 溶液, 加入预冷的卡诺固定液 (甲醇: 冰醋酸=3:1, 体积比) 固定 3 次, 每次不少于 15 min, -20°C 过夜, 次日取出离心去其上清液后, 加入体积分数为 50% 的冰醋酸吹打, 采用热滴片法制片, 然后用 Giemsa 染液扣染 30 min, 自然晾干后镜检。

1.3 染色体计数与核型分析

选取染色体形态完整, 分散均匀的雌核发育二倍体中期分裂相、雌核发育单倍体中期分裂相以及正常二倍体中期分裂相进行染色体计数, 使用 CCD 相机 (Leica DF 450C) 拍摄。利用 Photoshop 21.2 (2020) 软件分别进行染色体长臂和短臂的测量, 用于 Microsoft Excel 2010 软件进行数据整理, 计算染色体相对长度和臂比, 分离每条染色体并且进行配对, 进行染色体的分类与结果统计, 绘制核型图^[8,16]。

2 结果

2.1 染色体数目的确定

菲律宾蛤仔雌核发育二倍体、单倍体及正常二倍体染色体数目统计结果显示, 正常二倍体组统计的分裂相数目为 60 个, 染色体数目 $2n=38$ 的核型占比为 83% (图 1-a); 单倍体组统计的分裂相数目为 83 个, 染色体数目 $n=19$ 的核型占比为 67.47%; 雌核发育组统计的分裂相数目为 79 个, 染色体数目 $2n=38$ 的核型占比为 41.77%。

2.2 核型分析

每组选取 10 个染色体形态清晰分布均匀

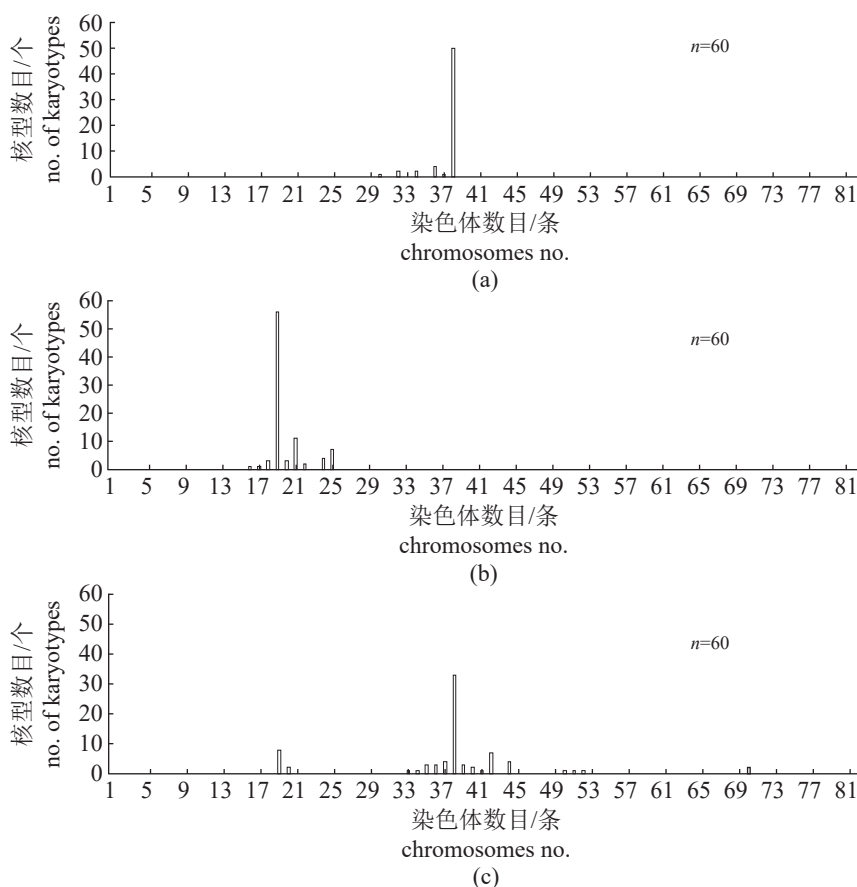


图1 菲律宾蛤仔中期分裂相染色体数目统计

(a) 正常二倍体组; (b) 单倍体组; (c) 雌核发育组; “n”为细胞数目。

Fig. 1 Frequency distribution of chromosome number in metaphase of *R. philippinarum*

(a) normal diploid group; (b) haploid group; (c) gynogenetic group; “n” means number of cells.

的分裂相进行长臂和短臂的测量, 计算相对长度和臂比, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示。雌核发育二倍体、单倍体及正常二倍体染色体相对长度、臂比及类型结果见表1。菲律宾蛤仔正常二倍体和雌核发育二倍体核型公式同为 $2n=18m+20sm$, 臂数 $NF=76$ 。单倍体核型公式为 $n=9m+10sm$, $NF=38$ 。图2为菲律宾蛤仔核型图。

3 讨论

3.1 菲律宾蛤仔染色体制片

贝类的担轮幼虫细胞具有很强的分裂能力^[10], 因此, 本研究采用菲律宾蛤仔的担轮幼虫为实验材料, 而王金星等^[11]和Borsa等^[12]在对菲律宾蛤仔核型分析研究中分别采用的是幼体和成体的鳃。成体鳃组织的细胞分裂能力相对幼虫而言较差, 制片所得的染色体中期分裂

相数目有限, 但相较于担轮幼虫不受季节影响^[17]。贝类雌核发育诱导后代发育至成体较为困难, 因此雌核发育后代一般用幼虫进行核型分析^[13]。菲律宾蛤仔单倍体幼虫发育停滞在原肠胚期, 在单倍体组本研究选用囊胚期胚胎进行染色体制片。周丽青等^[18]在栉江珧 (*Atrina pectinata*) 染色体制备中, 采用鳃丝创面愈合组织进行热滴片, 取得了较好的效果。在青蛤^[8]、波纹巴非蛤^[9]、毛蚶 (*Scapharca subcrenata*)^[11]、等边浅蛤 (*Gomphina veneriformis*)^[19]、三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)^[20] 等种类中同样采用鳃组织进行染色体制片。在个体较大的双壳类, 曾起^[21]对池蝶蚌 (*H. schlegelii*) 染色体核型鉴定研究中, 采用的是肾细胞进行的制片。汪晓晶等^[20]在三角帆蚌的核型分析研究中, 采用内脏团作为材料。在繁殖季节, 幼虫是做核型分析的理想材料, 其他时间段则可以用鳃代替^[10]。秋水仙素具有诱导效率高、价格便宜等优点, 所

表 1 菲律宾蛤仔雌核发育二倍体、单倍体及正常二倍体染色体相对长度、臂比及类型

Tab. 1 Relative chromosome length, arm ratio and type of normal diploids, haploids and gynogenetic diploids							
染色体序号 chromosome no.	正常二倍体 control diploid		单倍体 haploid		雌核发育二倍体 gynogenetic diploid		染色体类型 classification
	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	
1	5.80±0.20	1.26±0.03	5.60±0.50	1.27±0.11	5.90±0.60	1.45±0.20	m
2	5.50±0.10	1.10±0.09	5.50±0.40	1.09±0.05	5.90±0.30	1.27±0.14	m
3	5.40±0.30	1.42±0.04	5.30±1.20	1.15±0.07	5.80±1.70	1.14±0.12	m
4	5.20±0.20	1.15±0.08	5.00±0.50	1.32±0.15	5.50±1.20	1.34±0.16	m
5	5.20±0.40	1.11±0.10	4.90±0.90	1.34±0.17	5.30±0.20	1.18±0.14	m
6	5.00±0.80	1.37±0.07	4.90±1.10	1.20±0.06	5.30±0.60	1.30±0.16	m
7	5.00±0.40	1.03±0.03	4.80±1.70	1.46±0.09	5.30±0.30	1.03±0.03	m
8	4.90±0.40	1.21±0.06	4.50±0.70	1.04±0.01	4.80±0.20	1.39±0.16	m
9	4.30±0.40	1.34±0.06	4.30±2.00	1.50±0.05	4.80±0.60	1.12±0.11	m
10	6.10±0.20	1.76±0.03	6.00±0.40	2.11±0.39	6.30±1.30	2.50±0.34	sm
11	5.60±0.60	1.72±0.01	5.90±0.80	2.26±0.54	6.20±0.90	2.72±0.19	sm
12	5.60±0.40	1.72±0.08	5.60±0.40	1.72±0.03	5.90±0.80	1.83±0.06	sm
13	5.60±0.80	1.71±0.01	5.50±0.80	2.41±0.42	5.80±1.20	1.94±0.08	sm
14	5.40±0.50	1.97±0.09	5.50±0.90	1.96±0.31	5.70±0.50	1.87±0.06	sm
15	5.40±0.40	1.88±0.06	5.40±0.40	2.03±0.40	5.50±0.80	1.77±0.05	sm
16	5.40±0.60	1.73±0.01	5.40±0.70	1.82±0.14	5.60±1.00	1.71±0.01	sm
17	5.00±0.60	2.23±0.10	5.30±0.10	1.87±0.16	5.30±0.50	2.14±0.13	sm
18	5.00±1.10	1.83±0.08	5.20±1.30	1.74±0.04	4.90±1.10	1.72±0.01	sm
19	4.80±1.90	2.50±0.23	5.20±0.70	1.73±0.03	4.20±0.40	2.03±0.06	sm

以贝类核型分析研究常采用秋水仙素进行处理, 也有研究表明采用植物血球凝集素处理能显著提高鳃细胞的分裂能力^[22]。

3.2 菲律宾蛤仔染色体数目及核型

本实验结果同以往研究结果都表明菲律宾蛤仔染色体数目 2n=38 条, 但是在染色体类型上存在不同的结果。在贝类进化中, 染色体数目往往被认为是保守的, 大多数染色体数目为 38 条(表 2), 而彩虹明樱蛤^[10]、等边浅蛤^[17]、日本镜蛤^[24]、江戸布目蛤^[25] 染色体数目分别为 30、30、36、36 条, 这表明同菲律宾蛤仔亲缘关系相对较远^[8, 10]。硬壳蛤染色体数目 2n=38, 可能同菲律宾蛤仔亲缘关系较近^[7]。也有学者表示帘蛤科种类染色体数目最初为 2n=38 条, 染色体数目的增加和减少是贝类核型进化的两个方向^[10], 而蔡岩等^[32] 指出帘蛤科贝类染色体数目少于 38 条的种类可能是过度类型。Borsa 等^[12] 在菲律宾蛤仔核型研究中所取得的结果同

本实验相似, 而王金星等^[11] 的研究表明菲律宾蛤仔核型为 28m+10sm, 二者在中部(m)和亚中部着丝粒(sm)类型染色体数目差异较大, 这可能是使用不同材料和统计核型数量不同造成的差异^[8], Dixon 也指出环境条件的不同可能也会导致遗传上的变化^[33]。贝类大多具有 m 和 sm 类型染色体, 端部着丝点染色体(t)是贝类原始的染色体类型^[5], 具有 m 和 sm 类型染色体物种一般被认为比具有 t 和亚端部着丝点染色体(st)物种进化更加高级^[34-35], 说明菲律宾蛤仔在进化上可能比波纹巴非蛤、青蛤等更高级(表 2)。

在栉孔扇贝雌核发育二倍体诱导研究中, 对雌核发育后代染色体制片和计数结果显示, 雌核发育后代与母本染色体数目同为 38 条, 单倍体染色体数目为 19 条^[36]。Li 等^[37-38] 在长牡蛎(*C. gigas*)和皱纹盘鲍单倍体诱导研究。Wang 等^[39] 在兰州鲇(*Silurus lanzhouensis*) 倍性和染色体研究中均对染色体数目进行了统计, 但是并

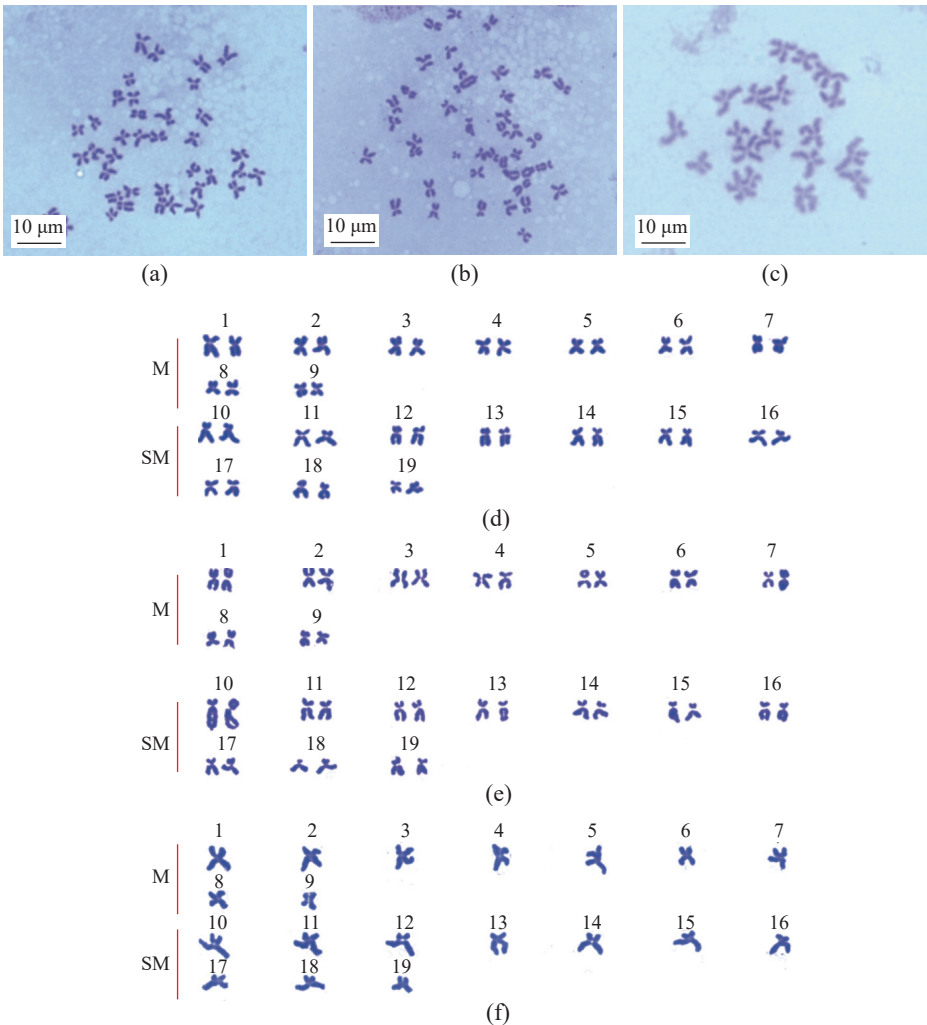


图 2 菲律宾蛤仔雌核发育二倍体、单倍体及正常二倍体染色体中期分裂相

(a) 正常二倍体中期分裂相; (b) 雌核发育二倍体中期分裂相; (c) 单倍体中期分裂相; (d) 正常二倍体染色体核型; (e) 雌核发育二倍体染色体核型; (f) 单倍体染色体核型。M. 中部着丝粒染色体; SM. 亚中部着丝粒染色体。

Fig. 2 Chromosome metaphase of gynogenetic diploids, haploids and normal diploids of *R. philippinarum*

(a) the metaphase of normal diploid; (b) the chromosome metaphase of gynogenetic diploid; (c) the chromosome metaphase of haploid; (d) normal diploid chromosome karyotype; (e) gynogenetic diploid chromosome karyotype; (f) haploid chromosome karyotypes. M. mesocentric chromosome; SM. submetacentric chromosome.

未进行核型分析。刘启智等^[40]研究表明, 雌核发育锦鲤 (*Cyprinus carpio*) 核型与母本基本一致。刘静等^[41]对雌核发育牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 研究也取得类似的结果。毛庄文^[42]采用异源精子诱导草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 雌核发育的研究显示, 母本同雌核发育后代具有相同的染色体类型, 但操文杰等^[43]对彭泽鲫 (*C. auratus* var. *pengsenensis*) 雌核发育子代的异精效应研究中发现子代同亲本染色体数目和种类都存在差异。在本研究中菲律宾蛤仔雌核发育后代与正常二倍体个体核型没有明显差异, 单倍体只具有一套染色体, 染色体类型同正常

二倍体一致。

4 结论

综上, 本研究对热滴片制作染色体滴片的方法进行了调整, 该方法较为可靠, 对其他贝类核型滴片制作具有参考价值。本实验首次开展了菲律宾蛤仔雌核发育二倍体、单倍体及正常二倍体的核型研究, 丰富了贝类雌核发育后代染色体核型分析研究资料, 进一步印证了前人的研究, 为菲律宾蛤仔系统发育、细胞学和遗传育种研究提供了参考, 对菲律宾蛤仔种质资源保护也具有积极意义。

表 2 贝类核型研究现状

Tab. 2 Current research status of shellfish karyotypes

染色体序号 chromosome no.	物种 species	染色体数目 (2n) chromosome no.	核型 karyotype	参考文献 references
1	西施舌 <i>C. antiquata</i>	38	2n=14m + 16sm + 8st	[6]
2	硬壳蛤 <i>M. mercenaria</i>	38	2n=28m+8sm+2st	[7]
3	青蛤 <i>C. sinensis</i>	38	2n=22m+12sm+4st	[8]
4	波纹巴非蛤 <i>P. undulata</i>	38	2n=14m + 12sm + 4st + 8t	[9]
5	彩虹明樱蛤 <i>M. iridescens</i>	36	2n=8m + 16sm + 12s	[10]
6	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	38	2n=18m+16sm+2st+2t	[11]
7	长竹蛏 <i>Solen strictus</i>	38	2n=30m+6sm+2t	
8	菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	38	2n=28m+10sm	
9	岩牡蛎 <i>Crassostrea nippona</i>	30	2n=20m	[15]
10	等边浅蛤 <i>G. aequilatera</i>	36	2n=16m + 20sm	[19]
11	三角帆蚌 <i>H. cumingii</i>	38	2n=24m+10sm+4st	[23]
12	池螺蚌 <i>H. schlegelii</i>	38	2n=26 m+10 sm+2 st	[21]
13	三角帆蚌 <i>H. cumingii</i>	38	2n=24m+sm10+st4	[20]
14	日本镜蛤 <i>Dosinia japonica</i>	30	2n=5m + 6m+ 4st	[24]
15	江户布目蛤 <i>Protothaca jadoensis</i>	30	2n=4m + 11t	[25]
16	小荚蛏 <i>Siliqua minimai Gmelin</i>	38	2n=12m+14sm+10st+2t	[26]
17	宽壳全海笋 <i>Barnea dilatata</i>	38	2n=24m + 8sm + 6st	[27]
18	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	38	2n= 20m + 12sm + 6st	[28]
19	泥蚶 <i>Tegillarca granosa</i>	38	2n=22m + 12sm + 4st	
20	橄榄蚶 <i>Estellacar olivacea</i>	38	2n=18m + 18sm + 2st	
21	圆背角无齿蚌 <i>Anodonta woodiana pacifica</i>	38	2n=24 m+14 sm	[29]
22	大獭蛤 <i>Lutraria maxima</i>	34	2n=20m +12sm +2st	[30]
24	文蛤 <i>Meretrix meretrix</i>	38	2n=9m + 7sm + 3t	[30]
25	紫石房蛤 <i>Saxidomus purpurata</i>	38	2n=16m + 1sm + 2st	[31]

参考文献 (References):

[1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 17-50.

Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 17-50 (in Chinese).

[2] FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2022[R]. Rome: FAO, 2022.

[3] 包振民, 万俊芬, 王继业, 等. 海洋经济贝类育种研究进展 [J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(4): 567-573.

Bao Z M, Wan J F, Wang J Y, *et al.* Advance in the studies on marine economic shellfish breeding[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2002, 32(4): 567-573 (in Chinese).

[4] 闫喜武, 张国范. 蛤仔育种学 [M]. 北京: 科学出版社, 2018: 20-23.

Yan X W, Zhang G F. Manila clam breeding study[M]. Beijing: Science Press, 2018: 20-23 (in Chinese).

[5] 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).

[6] 饶小珍, 许友勤, 陈寅山, 等. 西施舌的核型分析 [J]. 动物学杂志, 2003, 38(2): 2-5.

Rao X Z, Xu Y Q, Chen Y S, *et al.* Karyotype analysis of *Coelomactra antiquata*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2003, 38(2): 2-5 (in Chinese).

[7] 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).
- [8] 段海宝, 陈义华, 董志国, 等. 青蛤染色体制备及核型分析 [J]. 水产学报, 2020, 44(5): 735-741.
- Duan H B, Chen Y H, Dong Z G, *et al.* Chromosome preparation and karyotype analysis of *Cyclina sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(5): 735-741 (in Chinese).
- [9] 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).
- [10] 冯森磊, 任国梁, 甘树胜, 等. 彩虹明樱蛤染色体制备及核型分析 [J]. 水产科学, 2022, 41(6): 1052-1056.
- Feng S L, Ren G L, Gan S S, *et al.* Chromosome preparation and karyotype analysis of clam *Moerella iridescens*[J]. Fisheries Science, 2022, 41(6): 1052-1056 (in Chinese).
- [11] 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).
- [12] Borsa P, Thiriot-Quievreux C. Karyological and allozymic characterization of *Ruditapes philippinarum*, *R. aureus* and *R. decussatus* (Bivalvia, Veneridae)[J]. Aquaculture, 1990, 90(3-4): 209-227.
- [13] 聂鸿涛, 李琪. 皱纹盘鲍和栉孔扇贝雌核发育二倍体遗传学研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 20-23.
- Nie H T, Li Q. Genetic studies on gynogenetic diploids in Pacific abalone and Zhikong scallop[M]. Beijing: Science Press, 2016: 20-23 (in Chinese).
- [14] Manan H, Hidayati A B N, Lyana N A, *et al.* A review of gynogenesis manipulation in aquatic animals[J]. Aquaculture and Fisheries, 2022, 7(1): 1-6.
- [15] 袁美云, 毛连菊, 周玮. 岩牡蛎的染色体核型分析 [J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(4): 318-320.
- Yuan M Y, Mao L J, Zhou W. Chromosome karyotypic analysis of oyster *Crassostrea nippona*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(4): 318-320 (in Chinese).
- [16] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [17] 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 P, 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).
- [18] 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 Sciences, 2018, 39(5): 66-72 (in Chinese).
- [19] 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).
- [20] 汪晓晶, 王亚军, 石安静, 等. 三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 核型分析 [J]. 四川大学学报 (自然科学版), 2000, 37(2): 252-256.
- Wang X J, Wang Y J, Shi A J, *et al.* Research on chromosomes of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2000, 37(2): 252-256 (in Chinese).
- [21] 曾起. 池蝶蚌染色体核型鉴定及不同温度下性腺转录组分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- Zeng Q. Chromosome karyotype identification and gonad transcriptome analysis at different temperatures of *Hyriopsis schlegelii*[D]. Nanchang: Nanchang University, 2021 (in Chinese).
- [22] 贾志良, 李智盈, 包振民, 等. 增加贝类染色体分裂相的方法初探 [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 232-236.
- Jia Z L, Li Z Y, Bao Z M, *et al.* On methods of increasing the metaphase of shellfish[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(2): 232-236 (in Chinese).
- [23] 杨品红, 杨武冬, 王晓艳. 洞庭湖区三角帆蚌染色体及核型研究 [J]. 湖南文理学院学报 (自然科学版), 2008, 20(1): 64-68.
- Yang P H, Yang W D, Wang X H. Research on chromosomes of *Hyriopsis cumingii* in Dongting lake area[J]. Journal of Hunan University of Arts and Science (Natural Science Edition), 2008, 20(1): 64-68 (in Chinese).
- [24] 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).

- [25] 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).
- [26] 陆荣茂, 张永普, 林志华, 等. 小菱蛭的核型分析 [J]. 海洋科学, 2007, 31(9): 34-38.
- Lu R M, Zhang Y P, Lin Z H, *et al.* The preliminary study on karyotype of *Siliqua minimai* Gmelin[J]. Marine Sciences, 2007, 31(9): 34-38 (in Chinese).
- [27] 陆荣茂, 柴雪良, 董迎辉, 等. 宽壳全海笋的染色体核型分析 [J]. 台湾海峡, 2008, 27(1): 43-46.
- Lu R M, Chai X L, Dong Y H, *et al.* Karyotype of *Barnea dilatata*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2008, 27(1): 43-46 (in Chinese).
- [28] 陆荣茂, 林志华, 张永普, 等. 毛蚶、泥蚶、橄榄蚶的核型比较分析 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 625-629.
- Lu R M, Lin Z H, Zhang Y P, *et al.* Comparison on the karyotypes of *Scapharca subcrenata*, *Tegillarca granosa* and *Estellarca olivacea*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(5): 625-629 (in Chinese).
- [29] 闻海波, 顾若波, 徐钢春, 等. 圆背角无齿蚌的染色体核型分析 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2009, 28(2): 157-160.
- Wen H B, Gu R B, Xu G C, *et al.* Karyotypes on round mussel (*Anodonta woodiana pacifica*)[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2009, 28(2): 157-160 (in Chinese).
- [30] 潘英, 苏以鹏. 大獭蛤的核型研究 [J]. 海洋科学, 2007, 31(9): 87-90.
- Pan Y, Su Y P. The karyotype of *Lutraria maxima* Jonas[J]. Marine Sciences, 2007, 31(9): 87-90 (in Chinese).
- [31] 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.
- [32] 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).
- [33] Thiriot-Quiévreux 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.
- [34] 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).
- [35] 喻子牛, 孔晓瑜, 谢宗堉, 等. 真鲷 *Pagrosomus major* 和黑鲷 *Sparus macrocephalus* 的核型及 Ag-NOR 带研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(3): 107-115.
- Yu Z N, Kong X Y, Xie Z Y, *et al.* Studies on the karyotypes and Ag-NOR banding of *Pagrosomus major* and *Sparus macrocephalus*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1993, 23(3): 107-115 (in Chinese).
- [36] 潘英, 李琪, 于瑞海, 等. 栉孔扇贝第 1 卵裂抑制型雌核发育二倍体的研究 [J]. 海洋学报, 2005, 27(6): 154-161.
- Pan Y, Li Q, Yu R H, *et al.* Gynogenetic diploid induced by suppression of first cleavage of *Chlamys farreri*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 27(6): 154-161 (in Chinese).
- [37] Li Q, Osada M, Kashiwara M, *et al.* Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological features of sperm of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Fisheries Science, 2000, 66(1): 91-96.
- [38] Li Q, Osada M, Kashiwara M, *et al.* Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*[J]. Tohoku Journal of Agricultural Research (Japan), 1999, 50(1): 1-10.
- [39] Wang T, Li Z, Yu Z X, *et al.* Production of YY males through self-fertilization of an occasional hermaphrodite in Lanzhou catfish (*Silurus lanzhouensis*)[J]. Aquaculture, 2021, 539: 736622.
- [40] 刘启智, 肖军, 罗凯坤, 等. 雌核发育橙黄色锦鲤的遗传、性腺发育及外形特征 [J]. 水产学报, 2013, 37(3): 390-396.
- Liu Q Z, Xiao J, Luo K K, *et al.* Genetic, gonadal development and shape characteristics researches of gynogenetic orange ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 390-396 (in Chinese).
- [41] 刘静, 尤锋, 王新成, 等. 人工诱导雌核发育牙鲆的染色体及核型证明 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(1): 68-72.
- Liu J, You F, Wang X C, *et al.* Chromosome and karyotype evidence of artificial-induced gynogenesis in the olive flounder *Paralichthys olivaceus* (T. ET S.)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(1): 68-72 (in Chinese).
- [42] 毛庄文. 改良雌核发育草鱼群体的建立及其遗传特性研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2020.
- Mao Z W. Establishment of improved gynogenetic grass carp

- population and its genetic characterization[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2020 (in Chinese).
- [43] 操文杰, 张静蓉, 张庆飞, 等. 鳃和翘嘴鲌精子诱导彭泽鲫雌核发育子代的异精效应研究 [J]. 水产学报, 2023, 47(1): 019615.
- Cao W J, Zhang J R, Zhang Q F, *et al.* Research on the allogynogenetic biological effects in the second generation gynogenetic of *Carassius auratus* var. *pengsenensis* induced with sperms from *Elopichthys bambusa* and *Culter alburnus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(1): 019615 (in Chinese).

Chromosome preparation and karyotype analysis of gynogenetic diploids and haploids in *Ruditapes philippinarum*

LI Qiang^{1,2}, NIE Hongtao^{1,2*}, WANG Bin³, ZHOU He², HUO Zhongming^{1,2}, YAN Xiwu^{1,2}

1. Engineering Research Center of Shellfish Culture and Breeding in Liaoning Province,

Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

3. Dalian Jintuo Aquatic Food Co., Ltd., Dalian 116400, China

Abstract: Gynogenesis is an important breeding method for rapid establishment of pure lines. Karyotype analysis of gynogenetic offspring of *Ruditapes philippinarum* has not been reported. In order to clarify the karyotype of gynogenetic diploid, haploid and normal diploid of *R. philippinarum*. In this experiment, the gynogenetic diploid, haploid and normal diploid larvae of *R. philippinarum* were selected. The chromosome drops were made by air-drying technique, and the number of chromosomes was counted and karyotype analysis was carried out. The results showed that the number of chromosomes in gynogenetic diploid and normal diploid of *R. philippinarum* was 38, and the haploid was 19. The results of karyotype analysis showed that the karyotype formula of gynogenetic diploid and normal diploid of *R. philippinarum* was $2n=18m+20sm$, $NF=76$, and the haploid karyotype was $n=9m+10sm$, $NF=38$. No sex chromosome and satellite were found in chromosome morphology. Studies have shown that clams have only two types of chromosomes, m and sm. The karyotype of gynogenetic diploid is the same as that of normal diploid, and the type of haploid chromosome is the same as that of normal diploid and the number is half of that of diploid. In this study, the metaphase division phase and karyotype analysis results of gynogenetic diploid, haploid and normal diploid of *R. philippinarum* were obtained by air-drying technique using the trochophore larvae of *R. philippinarum* as materials, which enriched the related research of gynogenetic and haploid chromosomes of *R. philippinarum* and the cognition of chromosome number and karyotype composition of *R. philippinarum*. At the same time, it has important reference value for the study of cytogenetics and genetic breeding of *R. philippinarum*.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; gynogenesis; haploid; karyotype; trochophore; chromosome

Corresponding author: NIE Hongtao. E-mail: htnie@dlou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901400); China Agricultural Research System (CARS-49); the Liao Ning Revitalization Talents Program (XLYC2403165); the Research Project of Liaoning Provincial Department of Education (LJ212410158027); the Outstanding Young Scientific and Technological Talents Foundation of Dalian (2024RJ014)