

研究报告

A Letter

薄片牡蛎的核型及 18S-28S 核糖体 rRNA 基因的染色体定位

赵文溪^{*}, 张楠^{*}, 王嫣^{*}, 石耀华^{*}, 顾志峰^{*}, 王爱民^{*}

教育部热带生物资源重点实验室, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海洋生物实验教学中心, 海南大学海洋学院, 海口, 570228

✉通讯作者: wy2005@163.com, aimwang@163.com; ✉作者

*同等贡献作者

海洋生物学学报, 2012 年, 第 1 卷, 第 1 篇 doi: 10.5376/jmb.cn.2012.01.0001

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 1 期 20-25 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

赵文溪等, 2012, 薄片牡蛎的核型及 18S-28S 核糖体 rRNA 基因的染色体定位, 海洋生物学学报 Vol.1 No.1 pp.1-7 (doi: 10.5376/jmb.cn.2012.01.0001)

引用格式(英文):

Zhao et al., 2012, Karyotypes and Chromosomal Mapping of Major Ribosomal rRNA Genes in the Leaf Oyster (*Dendostrea folium*), Haiyang Shengwuxue Xuebao (Journal of Marine Biology) Vol.1 No.1 pp.1-7 (doi: 10.5376/jmb.cn.2012.01.0001)

摘要 以薄片牡蛎(*Dendostrea folium*)成体鳃组织为材料制备有丝分裂中期染色体标本, 对其染色体核型进行了分析, 并运用荧光原位杂交技术(FISH)将 18S-28S 核糖体 RNA 基因定位于中期染色体上。FISH 探针是通过 PCR 扩增介于 18S-28S rRNA 基因之间的 ITS 和 5.8S rRNA 基因序列, 并在 PCR 扩增过程中掺入了 Biotin-11-dUTP 进行生物素标记。结果显示, 薄片牡蛎的单倍染色体数目为 $n=10$, 全部为中部着丝粒染色体。与大多数已知巨砺属牡蛎的染色体核型相似。ITS 探针在薄片牡蛎中期分裂体相上产生两簇 FISH 信号, 分别杂交于 2 号染色体短臂的近端粒区域。本研究首次报道了薄片牡蛎的中期染色体核型以及 18S-28S 核糖体 RNA 基因在染色体上的定位。

关键词 薄片牡蛎; 染色体; 核型; 荧光原位杂交; 18S-28S rRNA 基因

Karyotypes and Chromosomal Mapping of Major Ribosomal rRNA Genes in the Leaf Oyster (*Dendostrea folium*)

Zhao Wenxi^{*}, Zhang Nan^{*}, Wang Yan^{*}, Shi Yaohua^{*}, Gu Zhifeng^{*}, Wang Aimin^{*}

Key Laboratory of Tropical Biological Resources, MOE, Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiological Technology, Marine Biology Experiment Teaching Demonstration Center, Ocean College, Hainan University, Haikou, 570228

✉Corresponding author: wy2005@163.com, aimwang@163.com; ✉Authors

Abstract Karyotype and chromosomal location of the major ribosomal RNA genes were studied in the leaf oyster (*Dendostrea folium*) using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Metaphase chromosomes were obtained from gill tissue of adult oysters. Probes were prepared by PCR amplification from the internal transcribed spacers (ITS, containing the 5.8S rRNA genes) between the 18S and 28S ribosomal RNA genes, and labeled by PCR incorporation of Biotin-11-dUTP. The results showed that the leaf oyster (*D. folium*) had a haploid number of 10 chromosomes with a karyotype of ten metacentric chromosomes (10 M), which was similar to most species in genus *Crassostrea*. FISH with the ITS probes generated two signals per metaphase, which were hybridized to the telomere regions of the short arms of Chromosome 2. This study is the first report of karyotype and chromosomal assignment of the major RNA genes in *D. folium*.

Keywords Leaf oyster; *Dendostrea folium*; Chromosome; Karyotype; FISH; 18S-28S rRNA gene

研究背景

染色体作为生物遗传物质的载体,有着特殊的结构和功能。但染色体是众多基因高度凝缩的结构,很难洞察其内部每个基因变化的细节。染色体核型研究是从形态和数目上确定基因组的染色体组织形式,而基因组重复元件在染色体上的 FISH 定位,使个别染色体具有了物理地标。对染色体的鉴定和识别是基因组研究的必要基础,有

助于了解其遗传组成、遗传变异的规律、近缘种的鉴定以及染色体的重排。而染色体的重排和分化又是生物生殖隔离和物种形成的重要机制(White, 1978; King, 1995),因此相关的系统研究具有重要意义。

近年来,由于牡蛎科的巨砺属(*Crassostrea*)和牡蛎属(*Ostrea*)的少数种类在世界水产养殖业中产量和规模上的重要地位,国际上对牡蛎的养

殖与繁殖、遗传改良、抗病抗逆机理, 分子标记开发及其辅助育种等各方面的研究逐步深入。其中太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)作为双壳贝类的代表, 首先完成了全基因组的测序工作。同时, 在巨砺属和牡蛎属的许多种类中进行了染色体核型研究(Nakamura, 1985), 染色体的特性和条带分析(Rodriguez-Romero et al., 1979; Insua and Thiriot-Quévieux, 1993; Leitão et al., 1999a; 1999b)。此外, 还进行了核仁组织者区(NOR)(Thiriot-Quévieux and Insua, 1992; Ladron de Guevara et al., 1994)、染色体上重复元件, 如 18S-28S 核糖体 RNA 基因(Zhang et al., 1999; Xu et al., 2001; Cross et al., 2003; Wang et al., 2004)、5S 核糖体 RNA 基因(Wang et al., 2005)和脊椎动物端粒序列(TTAGG)n (Guo and Allen, 1997; Wang and Guo, 2001)等的荧光原位杂交(FISH)定位。Wang 等(2005)还利用地高辛标记的噬菌体 P1 克隆鉴定和识别了美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的染色体。有关染色体的综合研究为巨砺属种类的系统发育和生殖隔离研究提供补充证据, 揭示了染色体水平的基因组变化, 为牡蛎的遗传改良、三倍体育种和基因组学研究奠定了基础。随着 FISH 技术的发展, 该技术越来越多地应用于双壳贝类染色体的识别鉴定, 如扇贝(Wang et al., 2004; Huang et al., 2007; Zhang et al., 2007)、贻贝(Insua et al., 2001)、硬壳蛤(Wang and Guo, 2007)和冲浪蛤(Wang and Guo, 2008)等。渐成系统的研究结果揭示了染色体在双壳贝类基因组进化过程中的变化趋势和进化意义。Wang and Guo (2004)根据扇贝科(Pectinidae)种类染色体核型以及 18S-28S 和 5S 核糖体 RNA 基因的 FISH 定位分析, 结合牡蛎相应染色体的研究成果, 提出了双壳贝类在进化过程中至少进行过一次染色体加倍事件的假设, 即染色体数目 $n=19$ 的扇贝相当于四倍体, $n=10$ 的牡蛎相当于二倍体, 相应地, $n=14$ 的珍珠贝相当于三倍体。但是, 要系统研究双壳贝类染色体的进化趋势和变迁机制, 在更广泛的种类, 尤其是亲缘关系较近的种类中进行系统性完整的染色体研究是非常必要的。

薄片牡蛎(*Dendostrea folium*)隶属于软体动物门(Mollusca)双壳纲(Bivalvia)珍珠贝目(Pterioida)牡蛎科(Ostreidae), 齿缘牡蛎属(*Dendostrea*), 主要分布于亚热带和热带海区, 常栖息在潮间带低

潮线至潮下带。在中国主要分布在广东、广西、海南岛和台湾等地。由于其体型较小和分布的限制, 其细胞学及遗传学特征尚不清楚。本文首次报道了薄片牡蛎的中期染色体核型以及 18S-28S 核糖体 RNA 基因在染色体上的 FISH 定位, 为牡蛎科动物染色体变化趋势的研究提供证据, 为揭示其系统进化过程中类染色体的变化趋势和染色体水平的基因组变化, 以及该属种类的系统发育和生殖隔离研究提供补充证据, 并为其遗传改良、三倍体育种和基因组学研究奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 染色体计数及核型分析

对薄片牡蛎鳃细胞中期分裂相染色体数目进行统计。117 个分裂相中, 染色体数目为 20 条的分裂相有 100 个, 出现频率为 85.5%。小于和大于 20 条染色体的分裂相分别为 10 个(8.5%)和 7 个(6.0%)。由此可以判断薄片牡蛎的二倍体染色体数目为 20。

挑选 10 个分散好, 形态清晰的中期分裂相进行染色体臂长测量, 对相对长度及臂比进行统计, 对染色体类型进行分析判断(表 1)。

根据染色体的相对长度、着丝粒的位置和形态特征, 可把全部染色体配成 10 对同源染色体。这 10 对同源染色体全部为中部着丝粒染色体, 无亚中部、亚端部与端部着丝粒染色体, $2n=20m$, 染色体的总臂数 $NF=40$ 。其染色体中期分裂相及核型图见图 1。

1.2 18S-28S rRNA 基因的 FISH 分析

以薄片牡蛎 DNA 为模板, 以 18S-28S rRNA 基因引物进行 PCR 扩增, 扩增片段长度约为 1 200 bp, 标记 Biotin-16-dUTP 后的片段长度约为 1 400 bp (如图 2)。

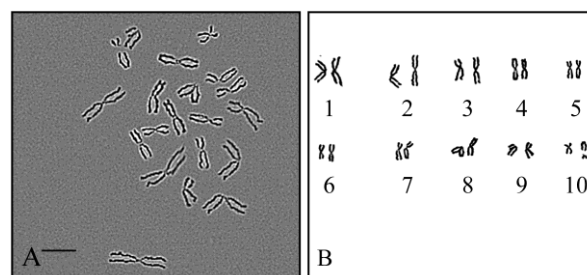


图 1 薄片牡蛎染色体中期分裂相(A)及核型图(B) (标尺=5 μm)
 Figure 1 The metaphase chromosomes (A) and Karyotypes (B) of leaf oyster (*D. folium*) (scale bar=5 μm)

表1 薄片牡蛎染色体相对长度、臂比统计结果及染色体分类
 Table 1 Karyotype analysis of 10 metaphases in leaf oyster (*D. folium*)

染色体编号 Chromosome no.	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	类型 Type
1	6.30±0.05	1.15±0.04	m
2	6.25±0.03	1.15±0.06	m
3	6.25±0.03	1.15±0.03	m
4	5.88±0.09	1.16±0.03	m
5	5.30±0.17	1.15±0.03	m
6	4.42±0.16	1.17±0.06	m
7	4.42±0.13	1.25±0.09	m
8	4.47±0.12	1.24±0.12	m
9	4.08±0.06	1.17±0.06	m
10	3.48±0.17	1.15±0.03	m

采用荧光原位杂交技术, 对薄片牡蛎染色体标本进行标记。结果发现, 18S-28S rDNA在薄片牡蛎染色体上检测到两簇荧光信号, 位于第2号染色体臂的近端粒区域(图3)。

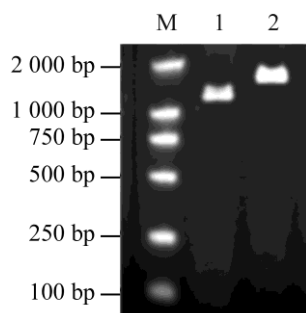


图2 18S-28S rRNA基因引物在薄片牡蛎中的PCR扩增产物(Lane 1)和Biotin-16-dUTP标记的PCR扩增产物(Lane 2)
 Figure 2 PCR Products of of ITS between 18S-28S rRNA genes (Lane 1) and Biotin-16-dUTP labeled sequence (Lane 2) in leaf oyster (*Dendostrea folium*)

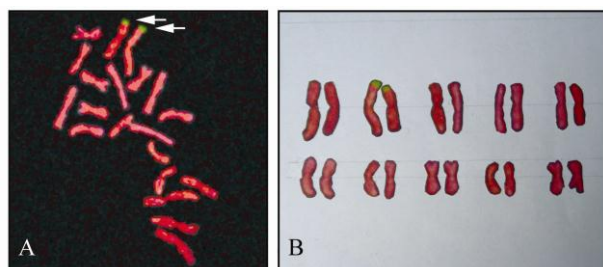


图3 18S-28S rDNA基因在薄片牡蛎染色体上的FISH定位
 注: A: 中期分裂相(箭头); B: 染色体核型
 Figure 3 Fluorescence in situ hybridization (FISH) signals (arrows) and chromosomal location of the major rRNA genes in leaf oyster (*D. folium*)
 Note: A: Metaphase; B: Karyotypes

2 讨论

牡蛎是一种营养价值很高的海产品, 目前已发现的有100多种, 全世界濒海各国几乎都有养殖。中国沿海所产的牡蛎约有20多种, 作为主要的养殖种类有巨砺属的近江牡蛎(*Crassostrea Rivularis*)、褶牡蛎(*C. plicatula*)、长牡蛎(*C. gigas*)、大连湾牡蛎(*C. talienw*)和牡蛎属的密鳞牡蛎(*Ostrea denselamellosa*)等(王宁等, 2003)。现今已报道染色体核型的牡蛎有二十六种(郑小东等, 2000), 得到公认的牡蛎染色体数目均为 $2n=20m$ 。本文所研究的薄片牡蛎(*D. folium*), 其染色体数 $2n=20m$, 染色体的总臂数为 $NF=40$, 全部为中部着丝粒染色体, 与国内外报道的大多数牡蛎的染色体核型相似。迄今为止, 各种相关的研究表明, 牡蛎科已知染色体组型的种类其组型较原始简单, 种与种之间变化不大。核型仅由中部着丝粒染色体(m)和亚中部着丝粒染色体(sm)组成, 其间差异仅表现为m和sm占比例的不同。Ahmed (1973)曾解释这一现象是由于两侧倒位或者着丝粒移动造成的。部分同种牡蛎 $2n$ 染色体数目相同, 染色体类型却存在差异, 如美洲巨牡蛎(*Crassostrea virginiva*), 有报道其核型为 $12m+8sm$ (Marquez, 1992), 也有报道其核型为 $16m+4sm$ (Leit ão et al., 1999a)和 $18m+2sm$ (Xu et al., 2001)。造成这种差异的原因可能是低渗或秋水仙素处理的时间不同, 导致染色体伸展程度的差异; 也有可能是实验材料不同, 有的以鳃组织为材料, 有的以早期胚胎等为材料(卵黄可能形成比较重的背景, 影响染色体的伸展和观察); 或者是在后期分析过程中, 人为判断染色体着丝粒位置的主观影响。

而FISH技术可以弥补以上单纯靠研究核型来

识别和鉴定染色体的不足。尤其在牡蛎科中, 因为种类间染色体核型的差异较小, 染色体组中sm型染色体的数目, 带有18S-28S rRNA基因的染色体的大小和性状成为不同种间染色体的主要差异和染色体鉴定的依据。Wang等(2004)曾利用ITS 1序列在染色体组上的FISH定位, 将巨砺属中分布于大西洋的*C. virginica*、*C. rhizophorae*与分布于太平洋的*C. gigas*、*C. plicatula*和*C. ariakensis*区分开来。其中两个大西洋的牡蛎种类具有1~2个sm型染色体, 而太平洋的三种牡蛎均无亚中型着丝粒染色体。并且在三种太平洋种类中18S-28S rRNA基因定位于染色体组中最短的染色体的长臂(10q)端粒区域, 而在两种大西洋种类则定位于第二长染色体的短臂(2p)端粒位置。在本研究中, 主要分布于印度洋和太平洋的齿缘牡蛎属的薄片牡蛎, 其相应rRNA基因的定位与两种分布于大西洋的巨砺属种类相似, 也是定位于第二长染色体的短臂(2p)端粒位置, 但染色体核型(20 m)却与分布于太平洋的三种牡蛎更为接近。这说明不仅是巨砺属, 处于印度-太平洋热带亚热带海区的牡蛎科的小型种类如齿缘牡蛎属的染色体的变异在核型上也是相当保守的。而地理隔离和基因突变在牡蛎的物种形成和生殖隔离中起重要作用(Wang et al., 2004), 那么同分布于太平洋地区的大型巨砺属和小型齿缘牡蛎属种类间生殖隔离的存在, 这种染色体分化可能就是原因之一。

分布于印度洋与太平洋区域的小型牡蛎主要有牡蛎属, 小蛎属(*Saccostrea*)和缘齿牡蛎属。目前牡蛎的染色体核型和条带研究主要集中于巨砺属和部分牡蛎属种类, 对这些小型牡蛎的染色体的研究还非常有限。但从巨砺属牡蛎染色体的研究结果看, 对这些小型牡蛎染色体核型和鉴定的研究, 将会提供染色体在生殖隔离和物种形成过程中所起作用的证据, 或会发现非常有趣的结果。

主要 rRNA (18S-28S)基因在生物的基因组中通常集中串联存在, 而不是分散于基因组中。由于其一个或多个位点有成千甚至上万个拷贝, 很容易通过 FISH 检测到其在染色体上的定位。具有同样特征并已证明在双壳贝类近缘种中具有多态分布、可做为 FISH 探针的基因组重复元件还有 5S rRNA 基因(Insua et al., 2001)、组蛋白 H3 基因(Zhang et al., 2007)和微卫星序列(Bouilly et al., 2008)。尽管如此, 可用的 FISH 探针依然非常有限, 单凭这些有限的探针进行 FISH 定位研究要阐明生物进化过程中染

色体的变迁动力学和变化规律是非常困难的。此外高分辨率中期染色体分类项的制备技术也将对这一研究领域的突破性发现提供必要的支持。

3 材料与方法

3.1 材料

薄片牡蛎(*Dendostrea folium*)采自海南省陵水黎安港海域。随机挑选雌雄个体各三只用于染色体制备, 寄养于实验室水槽内。标本经广东海洋大学蔡英亚教授鉴定, 贝壳存于海南大学海洋生物实验教学中心标本馆。

3.2 染色体制备

染色体制备参照黎明等(2009)。将6只薄片牡蛎置含0.01% PHA海水中处理24 h, 之后放入含0.005%秋水仙素海水中处理8 h。活体取鳃组织, 置KCl低渗液中剪碎。冰浴低渗处理30 min, 500目筛绢过滤至刻度离心管中。1 500 r/min离心10 min, 弃上清。加入新配的卡诺固定液至6 mL, 用吸管吹打至细胞散开, 冰浴固定20 min, 重复3次。4℃过夜。1 500 r/min离心10 min, 弃上清, 加入新配的卡诺固定液至2 mL, 制成细胞悬液。向干净的预热至56℃的载玻片上滴加细胞悬液。空气干燥, 用10%吉姆萨使用液染色30 min (扣染), 用流水冲洗标本载玻片。空气干燥。标本制成后在油镜下观察, 确定染色体众数(2n), 并选择分散好的中期分裂相10个, 在油镜下拍摄, 用Photoshop CS对图像进行清晰化处理, 用Motic Images染色体分析软件对染色体进行测量, 并计算相对长度(相对长度=每条染色体长度×100/单倍染色体总长)、臂指数(臂指数=长臂的长度/短臂的长度), 求得10个完整中期分裂相染色体的平均值和标准误, 按Leavan等的标准分类, 确定染色体类型(王子淑, 1987)。依据相对长度, 染色体类型排队编号, 获得染色体核型图。

3.3 荧光标记探针的制备

牡蛎基因组DNA提取: 称取用于制备染色体标本的薄片牡蛎个体闭壳肌(酒精固定)样品0.02 g左右, 用清水冲洗后剪碎, 加入SDS 缓冲液和蛋白酶K消化, 用酚-氯仿法进行提取。DNA提取方法参见石耀华等(2007)。

探针合成与标记: 扩增18S-28S核糖体rRNA基因间ITS序列的引物由上海生工合成, 前后端引物序列分别为: 5'-GTTTCTGTAGGTGAACCTGC-3'、5'-CTCGTCTGATCTGAGGTCG-3' (Huang et al.,

2006)。PCR反应体系(总体积为100 μL)含有1 $\mu\text{mol/L}$ 的前、后端引物, 1 \times buffer, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 分别为0.2 mmol/L的dATP、dGTP、dCTP以及0.13 mmol/L的dTTP; 0.07 mmol/L Biotin-16-dUTP, 2.5 U *Taq* DNA聚合酶20 μL , 1 μg 牡蛎基因组DNA。PCR反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 30个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 维持。

3.4 18S-28S rRNA基因在染色体上的FISH定位

FISH定位方法参照黎明等(2009), 染色体标本预处理: 向带有染色体标本的载玻片滴加100 μL RNA酶后小心地放到盖玻片上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下在湿盒中孵育0.5~2 h。轻轻拿掉盖玻片, 室温下2 \times SSC洗涤3次, 每次3 min。在-20 $^{\circ}\text{C}$ 的70%、90%和100%的冷乙醇中脱水, 每步3~5 min。玻片脱水后空气干燥。随后玻片放入70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴、盛有新变性液(含70%甲酰胺的2 \times SSC)的染色缸中, 2 min后取出, 立即用冷乙醇脱水, 而后空气干燥(步骤同上)。

探针的变性与杂交: 将100%乙醇沉淀的探针溶于37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的杂交缓冲液(50%去离子甲酰胺, 10%硫酸葡聚糖, 2 \times SSC)中, 浓度为5~20 ng/ μL 。探针在80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育10 min, 然后直接放在冰上。向37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的载玻片滴加12~15 μL 探针并加上盖玻片, 指甲油封片。载玻片放入密闭湿盒中, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中过夜。

免疫检测及复染: 小心去除盖玻片周围的指甲油, 在洗液A (2 \times SSC含50% v/v甲酰胺)、B (2 \times SSC)中各洗涤3次, 每次5 min。擦去过量的洗液。每张载玻片滴加40 μL 阻断液(5% BSA 3 mL, 20 \times SSC 1 mL, 三蒸水1 mL, TWEEN20 5 μL), 加盖玻片37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育20 min。轻轻取下盖玻片, 擦干过量的阻断剂。加30 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的Avidin-FITC (Roche)生物素抗体使用液, 加盖片孵育。去掉盖玻片, 在3个含37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的洗脱液(4 \times SSC)的染色缸中振荡清洗载玻片, 每个5 min。之后每张载玻片滴加30 μL 浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的PI/DAPI复染, 盖上盖玻片, 指甲油封片后置于干燥、避光的片盒中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。荧光显微镜观察FISH结果, FITC的激发波长为490 nm。细胞被PI染成红色, 而经FITC标记的探针所在的位置发出绿色荧光。

作者贡献

赵文溪与张楠共同完成了薄片牡蛎样品处理和染色体制备以及 FISH 定位实验, 贡献相同; 王嫣负责实验的指导, 图片与数据分析和论文写作; 石耀华、顾志峰参与研究计划的制定和样品采集; 王爱民指导研究计划制定和提供实验材料。

参考文献

- Ahmed M., 1973, Cytogenetics of oysters, *Cytologia*, 38(2): 337-346
- Bouilly K., Chaves R., Leitão A., Benabdelmouna A., and Guedes-pinto H., 2008, Chromosomal organization of simple sequence repeats in the *Pacific oyster (Crassostrea gigas)*: (GGAT)₄, (GT)₇ and (TA)₁₀ chromosome patterns. *Journal of Genetics*, 87(2):119-125 <http://dx.doi.org/10.1007/s12041-008-0018-2> PMID:18776639
- Cross I., Vega L., and Rebordinos L., 2003, Nucleolar organizing regions in *Crassostrea angulata*: Chromosomal location and polymorphism, *Genetica*, 119(1): 65-74 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1024478407781> PMID:12903748
- Guo X.M., and Allen Jr. S.K., 1997, Fluorescence in situ hybridization of the vertebrate telomere sequence to chromosome ends of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, *J. Shellfish Res.*, 16(1): 87-89
- Huang X.T., Bao Z.M., Bi K., Hu J.J., Zhang C., Zhang Q.Q., and Hu X.L., 2006, Chromosomal localization of the major ribosomal RNA genes in scallop *Chlamys farreri*, *Acta Oceanologica Sinica*, 25(3): 108-115
- Huang X.T., Hu J.J., Hu X.L., Zhang C., Zhang L.L., Wang S., Lu W., and Bao Z.M., 2007, Cytogenetic characterization of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*, by multiple staining techniques and fluorescence in situ hybridization, *Genes & Genetic Systems*, 82(3): 257-263 <http://dx.doi.org/10.1266/ggs.82.257>
- Insua A., Freire R., Rós J., and Méndez J., 2001, The 5S rDNA of mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*: Sequence variation and chromosomal location, *Chromosome Research*, 9(6): 495-505 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011636714052> PMID:11592484
- Insua A., and Thiriou-Quiréux C., 1993, Karyotype and nucleolar organizer regions in *Ostrea puelchana* (Bivalvia: Ostreidae), *Veliger*, 36: 215-219
- King M., ed., 1995, Species evolution: The role of chromosome change, Cambridge University Press, Britain, pp.1-360
- Ladron de Guevara B., Winkler F., and Palma C., 1994, Karyotype description and the position of the nucleolar organizer region (NOR) in the chilean oyster *Tiostrea chilensis* (Philippi) Chanley and Dinamani, in: Beaumont A. R. (ed.), Genetics and evolution of aquatic organisms, Chapman and Hall, London, pp.390-405
- Leitão A., Boudry P., Labat J P, Thiriou-Quiréux C., 1999a, Comparative karyological study of cupped oyster species, *Malacologia*, 41(1): 175-186
- Leitão A., Thiriou-Quiréux C., and Boudry P., 1999b, A G-chromosome banding study of three cupped oyster

- species: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and *Crassostrea virginica* (Mollusca: Bivalvia), Genetics Selection Evolution, 31: 519-527 <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9686-31-5-519> PMID:2707433
- Li M., Wang Y., Gu Z.F., Shi Y.H., and Wang A.M., 2009, Optimization of methods for preparation of metaphase chromosome in bivalve, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 29(3): 515-518 (黎明, 王嫣, 顾志峰, 石耀华, 王爱民, 2009, 双壳贝类染色体标本制备技术的优化, 基因组学与应用生物学, 29(3): 515-518)
- Marquez E.G., 1992, Comparacion de cariotipos entre entre las ostras *Crassostrea virginica* (Gmelin), *C. rhizophorae* (Guilding) y *Pinctada imbricata* (Rodling) Carribean, Journal of Science, 28(1): 51-55
- Nakamura H.K., 1985, A review of molluscan cytogenetic information based on the CISMOCH-computerized index system for molluscan chromosomes. Bivalvia, Polyplacophora and Cephalopoda, Venus, 44: 193-225
- Rodriguez-Romero F., Laguarda-Figueras A., Uribe-Alcocer M., and Rojas-Lara M.L., 1979, Distribution of "G" bands in the karyotype of *Crassostrea virginica*, Venus, 38: 180-184
- Shi Y.H., Gui J.F., Wang Y., Wang A.M., and Qu Y.B., 2007, Studies on the genetic diversity of three cultured populations of *Pinctada maxima*, Shuisheng Shengwu Xuebao (Acta Hydrobiologica Sinica), 31(1): 131-134 (石耀华, 桂建芳, 王嫣, 王爱民, 曲艳波, 2007, 大珠母贝 3 个养殖种群的遗传多样性初步分析, 水生生物学报, 31(1): 131-134)
- Thiriou-Quievreux C., and Insua A., 1992, Nucleolar organizer region variation in the chromosomes of three oyster species, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 157(1): 33-40 [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90072-I](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(92)90072-I)
- Wang N., Jiang G.L., and Li L.D., 2003, Reserch development of oyster's chromsome and manipulation, Haiyang Kexue (Marine Sciences), 27(10): 22-27 (王宁, 姜国良, 李立德, 2003, 牡蛎的染色体及操作技术研究进展, 海洋科学, 27(10): 22-27)
- Wang Y.P., and Guo X.M., 2001, Chromosomal mapping of the vertebrate telomere sequence (TTAGGG)_n in four bivalve molluscs by fluorescence *in situ* hybridization, J. Shellfish Res., 20(3): 1187-1190
- Wang Y.P., and Guo X.M., 2004, Chromosomal rearrangement in pectinidae revealed by rRNA loci and implications for bivalve evolution, Biol. Bull., 207(3): 247-256 <http://dx.doi.org/10.2307/1543213> PMID:15616355
- Wang Y.P., and Guo X.M., 2007, Chromosomal mapping of major ribosomal rRNA genes in the hard clam (*Mercenaria mercenaria*) using fluorescence *in situ* hybridization, Mar. Biol., 150(6): 1183-1189 <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-006-0453-7>
- Wang Y.P., and Guo X.M., 2008, Chromosomal mapping of the major ribosomal RNA genes in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say), Journal of Shellfish Research, 27: 307-311 [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[307:CMOTMR\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[307:CMOTMR]2.0.CO;2)
- Wang Y.P., Xu Z., and Guo X.M., 2004, Differences in the rDNA-bearing chromosome divide the Asian-Pacific and Atlantic species of *Crassostrea* (Bivalvia, Mollusca), Biol. Bull., 206(1): 46-54 <http://dx.doi.org/10.2307/1543197> PMID:14977729
- Wang Y., Xu Z., and Guo X.M., 2005, Chromosomal mapping of 5S ribosomal RNA genes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* gmelin by fluorescence *in situ* hybridization, J. Shellfish Res., 24(4): 959-964
- Wang Z.S., ed., 1987, Genetics of human and animal cells in experimental technique, Sichuan University Press, Sichuan, China, pp.95-97 (王子淑, 主编, 1987, 人体及动物细胞遗传学实验技术, 四川大学出版社, 中国, 四川, pp.95-97)
- White M.J.D., ed., 1978, Modes of Speciation, San Francisco, USA, pp.45-57
- Xu Z., Guo X.M., Gaffney P.M., and Pierce J.C., 2001, Chromosomal location of the major ribosomal RNA genes in *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*, The Veliger, 22: 44
- Zhang L.L., Bao Z.M., Wang S., Huang X.T., and Hu J.J., 2007, Chromosome rearrangements in pectinidae (Bivalvia: Pteriomorpha) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops, Genetica, 130(2): 193-198 <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-006-9006-8> PMID:16909332
- Zhang Q.Y., Yu G., Cooper R.K., and Tierseh T.R., 1999, Chromosomal location by fluorescence *in situ* hybridization of the 28S ribosomal RNA gene of the eastern oyster, J. Shellfish Res., 18: 431-435
- Zheng X.D., Wang Z.P., Wang R.C., Yu R.H., and Kong L.F., 2000, Progress on bivalve chromosome studies: A review, Haiyang Kexue Ji Jinzhann (Advances in Marine Science), 18(3): 101-108 (郑小东, 王昭萍, 王如才, 于瑞海, 孔令峰, 2000, 双壳类染色体研究现状及进展, 海洋科学进展, 18(3): 101-108)