

李科, 任翊卓, 韩学凯, 等. 无效基因 *fruitless* 参与卤虫 *Artemia franciscana* 的生殖调控研究[J]. 海洋学报, 2023, 45(10): 114–122, doi:10.12284/hyxb2023139

Li Ke, Ren Yizhuo, Han Xuekai, et al. Reproductive regulation of *fruitless* gene in brine shrimp *Artemia franciscana*[J]. Haiyang Xuebao, 2023, 45(10): 114–122, doi:10.12284/hyxb2023139

无效基因 *fruitless* 参与卤虫 *Artemia franciscana* 的生殖调控研究

李科^{1,3}, 任翊卓², 韩学凯^{1,3*}, 刘雪^{1,3}, 隋丽英^{1,3*}

(1. 天津科技大学 亚洲区域卤虫参考中心, 天津 300457; 2. 河北环境工程学院 入海河流及近岸海域生态修复河北省工程研究中心, 河北 秦皇岛 066102; 3. 天津科技大学 海洋资源化学与食品技术教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要: *fruitless* (*fru*) 是在昆虫与甲壳动物求偶、交配行为以及生殖发育过程中发挥关键作用的基因。卤虫不仅是水产育苗的重要开口饲料, 而且是生物学研究的重要实验生物。本实验通过对卤虫 *Artemia franciscana* 转录组的筛选, 获得了 *fru* 基因的开放阅读框 (ORF) 并进行生物信息学分析, 利用 qPCR 技术研究了它在卤虫生殖腺发育的不同阶段的表达情况, 最后利用 RNAi 显微注射技术, 深入探索了它的功能。经过生物信息学分析, *fru* 基因的 ORF 长度为 1 215 bp, 其中包含了 404 个氨基酸, 其分子量和等电点分别为 45.19 kDa 和 5.28, 属于酸性亲水性蛋白, 且不含信号肽和跨膜结构; 结构域预测显示 *fru* 存在 BTB_POZ 和 HTH 两个结构域, 二级结构主要由 α -螺旋和无规则卷组成, 三级结构与其对应。qPCR 结果显示, *fru* 基因的表达量在卵囊的晚期胚胎中表现出明显的增加趋势, 其表达量显著高于其他发育阶段 ($P < 0.01$); 而在精巢的未成熟期, *fru* 基因的表达量也有所增加, 其表达量显著高于成熟早期、中期和晚期 ($P < 0.01$)。经过 RNA 干扰, 我们发现 *fru* 基因的表达量有了显著的下降 ($P < 0.01$), 并且经过受到干扰的雌虫后代都为休眠卵。这表明 *fru* 基因对于 *A. franciscana* 的生殖和发育有着重要的影响, 甚至可能是影响卤虫繁殖方式的关键因素。通过本次研究, 我们获得了关于 *fru* 基因在卤虫生殖发育中的作用及其相关分子机制的重要信息, 可以帮助我们更好地理解这一重要的生物学过程。

关键词: 卤虫; *fru* 基因; 性腺; 基因表达特征; RNAi; 生殖发育

中图分类号: Q74; P735

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2023)10-0114-09

1 引言

fruitless (*fru*) 基因在果蝇中首次被发现, 其编码蛋白含有一个二聚体化相关的 BTB 功能结构域, 并在 C 末端具有锌指 (ZnF) 结构域作为与 DNA 结合的识别区^[1]。*fru* 基因是性别特异性剪接的^[2-3], 近年来对果

蝇性行为的神经和遗传机制的研究表明 *fru* 基因可调节果蝇求偶电路形成并影响其对信息素的敏感性^[4-6], 从而改变果蝇的求偶行为。研究表明, *fru* 基因敲降不但可导致雄性德国小蠊 (*Blattella germanica*) 求偶行为发生障碍^[1], 而且会降低桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的交配率, 延长其交配

收稿日期: 2023-04-09; 修订日期: 2023-06-15。

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (18JCQNJC78500); 天津市科技支撑计划项目 (17ZXZYN00060); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT-17R81)。

作者简介: 李科 (1998—), 男, 山东省菏泽市人, 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: li_ke@mail.tust.edu.cn

* 通信作者: 韩学凯, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: hanxk@tust.edu.cn; 隋丽英, 女, 博士, 教授, 研究方向为卤水生物资源开发与利用。E-mail: suily@tust.edu.cn

时间^[7-8]。此外, *fru* 基因敲降后还会导致雄性沙漠蝗 (*Schistocerca gregaria*) 繁殖力下降^[9]。尽管甲壳类动物与昆虫之间进化关系较近^[10-11], 但目前有关于 *fru* 基因在甲壳动物中的报道较少。已有研究发现, *Sp-fru2* 基因在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 卵巢和精巢的发育和成熟过程中发挥重要作用^[12]; 在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 中, *fru* 基因有 *Esfru1* 和 *Esfru2* 两种可变剪接异构体, 而 *Esfru2* 可能与螃蟹的雄性性别决定有关^[13], 同样在红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 中, *fru* 基因在精巢中的表达水平高于在卵巢, 并参与其性别决定和分化过程^[14]。由此可见, *fru* 基因在参与昆虫和甲壳动物的求偶交配、性别决定及生殖发育等方面都起着重要作用。

卤虫 (Brine shrimp, *Artemia*) 是一种普遍存在于全球各地的小型甲壳动物^[15], 它们不仅可以栖息在沿海盐场和内陆盐湖的高盐水体中, 还可以作为卤水生态系统的重要组成部分, 起到调节生态的作用, 卤虫是高盐水体中浮游植物的主要消费者, 也是水鸟的食物^[16-17]。卤虫卵易保存, 孵化操作方便, 无节幼体营养丰富, 是海水鱼虾蟹水产苗种重要的鲜活饵料^[18]。此外, 卤虫拥有孤雌和两性两种生殖方式, 以及产休眠卵和幼体两种后代繁殖方式, 其较短的世代、特殊的休眠和去休眠机制、易于实验室培养等特征, 使其成为研究表观遗传学、发育生物学和进化生物学良好的实验材料。卤虫的性别决定受到 WZ-ZZ 性别决定系统的影响^[19-20], 同时, *masc* 也被认为是调节卤虫性别分化的关键因素^[21]。此外, p90 RSK 也能够参与卤虫卵母细胞的成熟、休眠胚胎的周期以及胚胎的发育, 小热休克蛋白 p26 也能够对休眠生殖的进行起到重要的作用^[22]; 本实验室最近研究表明 *piwi* 基因敲降也会影响卤虫产后代的方式, 诱导卤虫产休眠卵^[23]。

鉴于 *fru* 基因在昆虫和甲壳动物生殖和性别决定方面起着关键的作用, 在本研究中, 我们选择了 *Afruitless franciscana* 作为研究对象, 通过生物信息学分析, qPCR 检测和 RNAi 技术探索了其在卤虫生殖发育方面的功能。

2 材料与方法

2.1 实验材料

本实验在 28℃ 的光照条件下 (24 L : 0 D), 对 *A. franciscana* (VinhChau strain) 进行孵化培养, 每升卤水放置 500 只卤虫, 每天投喂新鲜盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 3 次, 每次 3 mL, 投喂量随卤虫发育而增加。根据孙瑜霞^[24] 关于两性卤虫胚胎发育的描述, 收

集雌性卤虫卵黄发生早期 (孵化后约 16 d)、卵黄发生晚期 (孵化后约 19 d)、早期胚胎 (孵化后约 20 d)、晚期胚胎 (孵化后约 25 d) 各个时期的卵巢。通过观察雄性卤虫精巢的形态特征及成熟程度, 将雄虫分为未成熟期 (孵化后约 8 d)、成熟早期 (孵化后约 13 d)、成熟中期 (孵化后约 19 d)、成熟晚期 (孵化后约 25 d) 并收集各个时期的精巢, 液氮冷冻解剖好的组织, 随后放于 -80℃ 冰箱中进行保存。

2.2 总 RNA 的提取及反转录

取卤虫的精巢组织和卵巢组织进行总 RNA 的提取 (Trizol 法), 检测 RNA 质量和浓度后, 将符合要求的样品放置于 -80℃ 冰箱保存。通过 TaKaRa 试剂盒将 RNA 样品反转录为 cDNA 存于 -20℃ 冰箱备用。

2.3 卤虫 *fru* 基因的获得及分析

经过筛选, 我们从 *A. franciscana* 转录组数据库中获取了 *fru* 基因序列 (PRJNA541424), 该序列包含完整的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF)。使用 Primer Premier 5 软件设计了特异性引物 (表 1) 以确保基因序列的准确性, 并将它们拼接在一起, 最终进行比对。使用 PCR 技术对卤虫 cDNA 进行扩增, 并使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 确定目标基因条带, 最终得到单一且清晰的 PCR 产物。引物合成和序列测序均由北京华大基因科技有限公司完成。

2.4 卤虫 *fru* 基因的生物信息学分析

通过 ORF Finder-NCBI、ExPASy-ProtParam、TM-HMM Server V 2.0、SignalP-5.0 Server、PSORT II Prediction、CDD、SOPMA 以及 SWISS-MODEL 等在线软件 (表 2), 对 *fru* 基因的开放阅读框、理化性质、亲/疏水性、跨膜结构、信号肽、亚细胞定位、保守结构域、二级和三级结构进行了预测。此外, 通过 MEGA11 软件, 对 ML 系统进化树进行了构建。

2.5 *fru* 基因在卤虫生殖腺不同发育时期的表达分析

通过 qPCR (美国伯乐 Bio-rad) 对卤虫卵巢和精巢不同发育时期组织中的表达水平进行检测 (TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒), 使用 GAPDH 作为内参, 对每个组织样本进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复, 采用 PCR (预变性 3 min, 变性 10 s, 60℃ 退火 30 min, 共进行 40 次循环), 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定各个组织样本中目标基因的相对表达量, 最后使用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时, 表明差异显著; 当 $P < 0.01$ 时, 表明差异极显著。

2.6 dsRNA 的合成及显微注射

采用 Primer Premier 5 软件设计合成 *fru* 基因和 *EGFP* 基因 (阴性对照) 的 dsRNA 引物, *fru* 基因 ORF

表 1 *fru* 基因的引物信息
Table 1 The primer information of *fru* gene

引物名称	序列(5'—3')	退火温度/°C	片段大小/bp	用途
<i>fru</i> -F1	ACTTTGGTTCAACTTCTTA	55	1 117	基因扩增
<i>fru</i> -R1	TTCTTGTCATTCCATCAT			
<i>fru</i> -F	TGTTTCCAAGTGAGCCATGC	58	105	qPCR
<i>fru</i> -R	TTGCTGAGTACTGCTGACCT			
GAPDH-F	GGTCGTGACTTGACGGACTATCT	57	120	内参基因
GAPDH-R	AGCGGTTGCCATTCTTGT			
<i>dsfru</i> -F	T7- TAGTGACCAGACCCAAGA	58	431	dsRNA合成
<i>dsfru</i> -R	T7- TGTTTCTGTCTCCCGTTA			
<i>dsEGFP</i> -F	T7-CAGTGCTTCAGCCGCTACCC	58	350	dsRNA合成
<i>dsEGFP</i> -R	T7-AGTTCACCTTGATGCCGTTCTT			

表 2 生物信息学在线分析软件
Table 2 Online analysis software in bioinformatics

在线软件	用途	网址
ORF Finder-NCBI	开放阅读框分析	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
ExPASy-ProtParam	理化性质分析	https://web.expasy.org/protparam/
ExPASy-ProtScale	亲水性/疏水性分析	https://web.expasy.org/protscale/
TMHMM Server V 2.0	跨膜结构预测	https://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
SignalP-5.0 Server	信号肽分析	https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
CDD	保守结构域预测	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html
PSORT II Prediction	亚细胞定位	https://psort.hgc.jp/form2.html
SOPMA	二级结构预测	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=npsa_sopma.html
SWISS-MODEL	三级结构预测	https://swissmodel.expasy.org/

片段经 PCR 扩增和纯化后连接至 pGM-T 载体上,并从中提取出质粒。为了获得 dsRNA,我们使用体外转录试剂盒对质粒进行体外转录,并对其进行纯化,以确保消化反应的质量^[25]。按上述方法合成 *EGFP* 基因的 dsRNA。我们选取生存能力良好、卵黄发生早期的雌虫,设置为对照组(*dsEGFP*)和干扰组(*dsfru*),每组 60 只,并在其外骨骼和肠道之间的开放循环体腔内进行微量注射。将含有 dsRNA 的磷酸缓冲液与 0.1% 酚红按 1:1 的比例混合得到 dsRNA 微注射液,每只雌虫注射 1 μ L 含 1 000 ng dsRNA 的微注射液。注射成功的卤虫放入 50 mL 试管中单独培养,并进行雌雄配对。当雌虫发育到卵黄发生晚期、早期胚胎、晚期胚胎时收集卵囊,每个时期设置 3 个平行,每个平行收集 5 个卵囊,利用 qPCR 测定干扰效果。剩余的对照组和干扰组雌性卤虫各 15 只继续培养至产生

后代,记录并观察产生后代情况,并使用 SPSS 25.0 软件进行卡方检验。

3 结果与分析

3.1 *fru* 基因 ORF 序列的扩增及测序

对 *fru* 基因的 PCR 产物进行电泳检测,条带清晰且单一。拼接比对后发现,扩增序列长度与目的基因相符,经过验证后得到卤虫 *fru* 基因 ORF 序列,序列长度为 1 215 bp,共编码 404 个氨基酸。

3.2 *fru* 基因的相似性分析及系统进化树构建

氨基酸序列比对结果显示,卤虫 *fru* 蛋白同其他物种的 *fru* 蛋白相对较近,范围在 35.57%~45.95% 之间(表 3),与甲壳纲、昆虫纲中的鼠妇(*Armadillidium vulgare*)、牛角刺槐蚁(*Pseudomyrmex gracilis*)等相关物种的 *fru* 基因氨基酸序列相似性较高;果蝇(*Dro-*

表3 卤虫 *fru* 基因编码蛋白的氨基酸序列与其他物种的相似性比较Table 3 Comparison of amino acid sequence similarities of proteins encoded by *Artemia franciscana* and other species *fru* gene

序列号	物种名称	序列相似性/%
RXG68647.1	鼠妇(<i>Armadillidium vulgare</i>)	45.95
XP_020279362.1	牛角刺槐蚁(<i>Pseudomyrmex gracilis</i>)	42.11
KOB68495.1	冬尺蠖蛾(<i>Operophtera brumata</i>)	41.44
XP_015115225.1	胡蜂(<i>Diachasma alloenum</i>)	41.23
XP_012350829.1	小蜜蜂(<i>Apis florea</i>)	40.35
XP_014274254.1	茶翅蜡(<i>Halyomorpha halys</i>)	40.35
XP_032451896.1	寄生蜂(<i>Nasonia vitripennis</i>)	40.35
OXU22454.1	灿金小蜂(<i>Trichomalopsis sarcophagae</i>)	40.35
XP_016919575.1	中华蜜蜂(<i>Apis cerana</i>)	40.35
CAA9998384.1	烟盲蜡(<i>Nesidiocoris tenuis</i>)	39.67
ALC42845.1	果蝇(<i>Drosophila busckii</i>)	39.64
KYN44668.1	北方皱切叶蚁(<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>)	38.62
XP_050694347.1	中华绒螯蟹(<i>Eriocheir sinensis</i>)	44.35
XP_053653254.1	红螯螯虾(<i>Cherax quadricarinatus</i>)	35.57

sophila busckii)、北方皱切叶蚁(*Trachymyrmex septentrionalis*)和红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)的相似性较低。基于 *fru* 蛋白质序列构建 ML 系统进化树(图 1),表明卤虫 *fru* 基因氨基酸序列与其他物种有较大差异。

3.3 *fru* 基因编码蛋白的理化性质预测分析

fru 基因编码蛋白的分子式为 $C_{1954}H_{3069}N_{555}O_{638}S_{20}$, 它的分子质量为 45.19 kDa, 理论等电点为 5.28, 不稳定指数为 39.97, 氨基酸总数达 404, 谷氨酸和丝氨酸的含量最高, 达到 8.4%, 亮氨酸的含量也很高, 达到了 7.2%。负电荷的氨基酸有 59 个, 而正电荷的氨基酸有 44 个。经过亲/疏水性分析, 这种蛋白质具有较高的亲水性, 其平均亲水性小于 0(-0.621)。残基分布结果显示, 最高峰值为 1.389(69 位点处的异亮氨酸), 最小峰值为 -3.267(201 位点处的谷氨酸)(图 2a)。

3.4 *fru* 基因编码蛋白的信号肽、亲/疏水性及亚细胞定位预测分析

经过信号肽分析后发现, *fru* 基因编码蛋白无信号肽(图 2b)。亚细胞定位发现该蛋白主要分布在细胞核内(47.8%), 其次为细胞质(34.8%)、线粒体(8.7%), 在细胞骨架(4.3%)和高尔基体(4.3%)中分布最少。

3.5 *fru* 基因编码蛋白的保守结构域与跨膜结构预测

fru 基因编码蛋白无跨膜结构域(图 2c)。经过对

fru 基因编码蛋白的结构域预测, 发现它具有两个结构域: BTB_POZ(第 28~111 位氨基酸)和 HTH(第 283~319 位氨基酸)(图 2d)。

3.6 *fru* 基因编码蛋白的高级结构预测

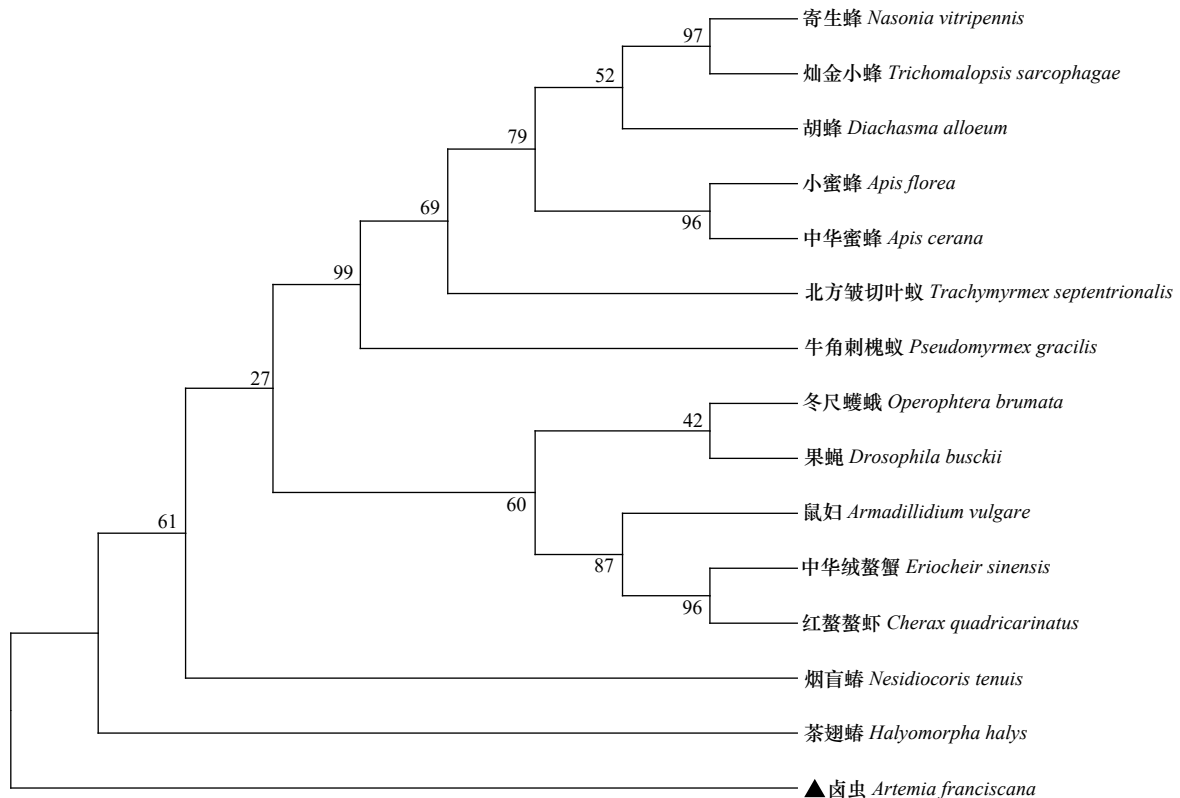
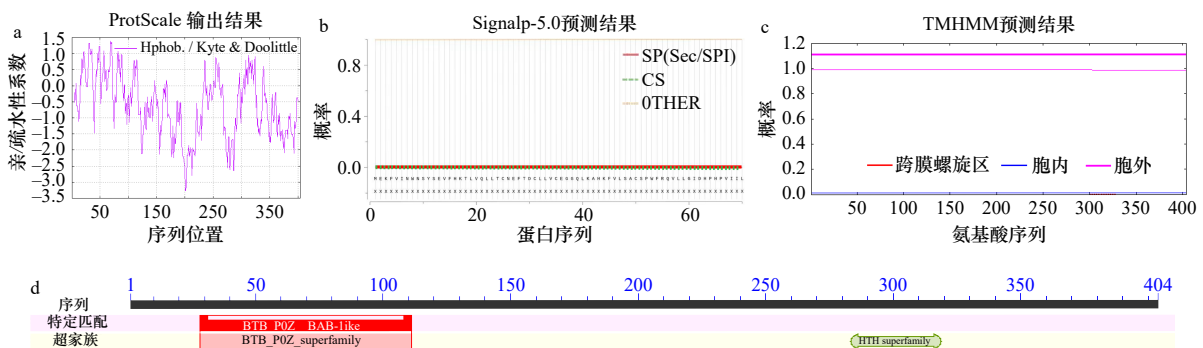
经过二级结构预测, *fru* 蛋白的二级结构元素可以归纳为 4 种: α -螺旋、延伸链、 β -转角以及无规则卷, 其中无规则卷占比最高, 达到 156 个, 如图 3a 所示。通过对蛋白质的三级结构模型的分析, 发现其主要特征是无规则卷、 α -螺旋以及延伸链, 这些特征与我们的二级结构预测一致(图 3b)。

3.7 *fru* 基因在卤虫生殖腺不同发育时期的表达分析

研究发现, *fru* 基因的表达量在卤虫卵巢和精巢的发育过程中都有显著的变化, 其中, 在卵巢的发育过程中, 表达量先出现下降, 然后上升, 最终又出现下降的趋势。*fru* 基因在精巢中未成熟期的表达量明显高于其他发育阶段, 表达量显著增加($P < 0.01$), 成熟早期和晚期相比差异不大; 晚期胚胎时期的 *fru* 基因表达量最高, 显著高于其他发育阶段($P < 0.01$)(图 4)。

3.8 RNA 干扰后 *fru* 基因的表达及对产出后代的影响

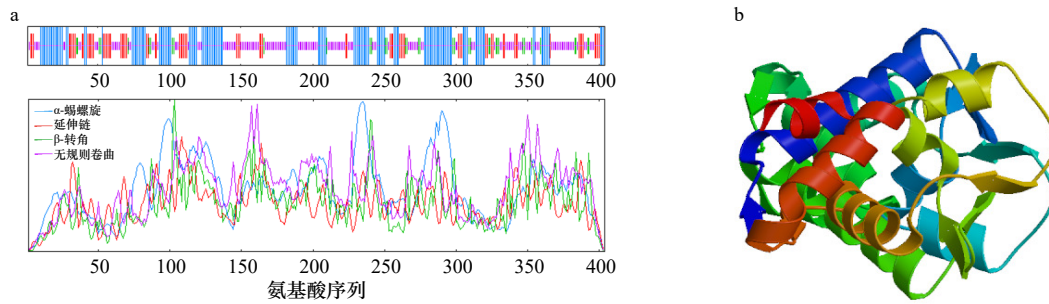
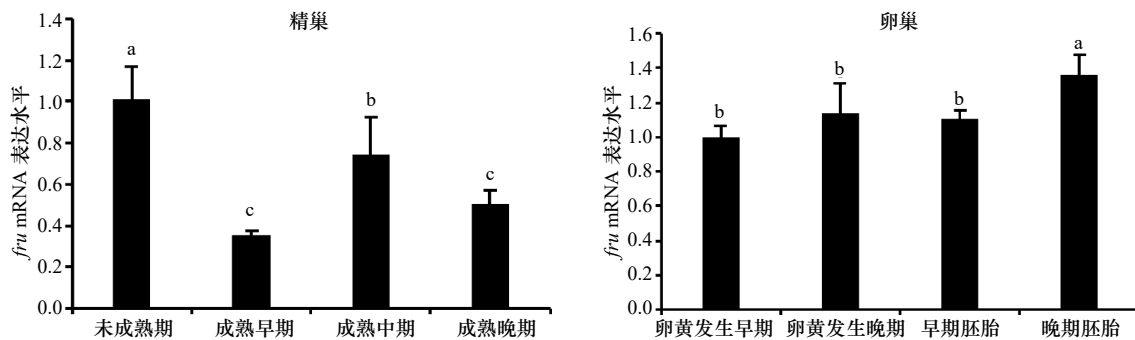
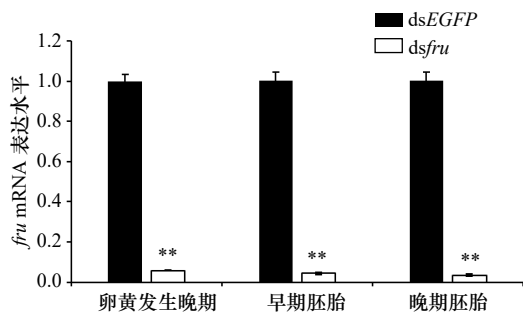
经过注射 *dsfru*, 雌性卤虫卵黄发育晚期、早期胚胎和晚期胚胎阶段都能够检测到 *fru* 基因的表达量, 而且与对照组的 *dsEGFP* 相比, 表达量显著下降($P < 0.01$), 干扰效率达到了 94%、96% 和 97%, 这表明

图 1 卤虫 *fru* 基因编码蛋白的氨基酸序列系统进化树Fig. 1 Phylogenetic tree of amino acid sequence of the protein encoded by the *fru* gene of *Artemia franciscana*图 2 卤虫 *fru* 基因编码蛋白生物信息学分析Fig. 2 Bioinformatics analysis of the protein encoded by the *fru* gene of *Artemia franciscana*a. 亲水性分析; b. 信号肽分析; c. *fru* 蛋白跨膜结构预测; d. *fru* 蛋白保守结构域预测a. Hydrophilic analysis; b. signal peptide analysis; c. prediction of *fru* protein transmembrane structure; d. prediction of *fru* protein conserved domain

RNA 敲除实验取得了成功(图 5)。经过显微注射后发现,在 15 只注射 *dsfru* 的雌性卤虫中,有 6 只存活,而在 15 只注射 *dsEGFP* 的雌性卤虫中,有 11 只存活。对照组(*dsEGFP*)和干扰组(*dsfru*)的后代产出方式不同,其中,对照组的卤虫中有 9 只产出无节幼体,2 只产出休眠卵,而实验组的卤虫则全部产出休眠卵。经过卡方检验,我们发现对照组和干扰组在产卵和产幼方面存在显著差异($P < 0.01$)。因此,我们认为 *fru* 基因的敲除能够促进卤虫产生休眠卵。

4 讨论

卤虫 *fru* 基因的 ORF 总长度为 1 215 bp, 编码 404 个氨基酸, 这与 Li 等^[13]描述的中华绒螯蟹的 *fru* 基因序列结果相似。生物信息学分析显示, *fru* 基因编码蛋白分子质量为 45.19 kDa, GRAVY 为 -0.612 , 推测该蛋白为亲水性蛋白; 氨基酸含量最多的是谷氨酸和丝氨酸, 均占比为 8.4%, 其次是亮氨酸 (7.2%), 由于负电荷残基数大于正电荷残基数, 因此这种蛋

图3 卤虫 *fru* 基因编码蛋白的高级结构Fig. 3 Advanced structure of the protein encoded by *fru* gene in *Artemia franciscana*a. *fru* 蛋白二级结构; b. *fru* 蛋白三级结构a. Secondary structure of *fru* protein; b. tertiary structure of *fru* protein图4 卤虫 *fru* 基因生殖腺不同发育时期的表达结果Fig. 4 Expression results of *fru* gene in gonads of *Artemia franciscana* at different developmental stages相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$); 不同字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)The same letter indicate the difference is not significant ($P > 0.05$); different letters indicate significant differences ($P < 0.01$)图5 RNA干扰后 *fru* 基因在卤虫不同时期卵巢中的表达Fig. 5 Expression of *fru* gene in ovary of *Artemia franciscana* at different developmental stages after RNA interference**表示与对照有极显著性差异 ($P < 0.01$)** a significant difference from the control ($P < 0.01$)

白质具有负电荷特征,其 pI 值达到 5.28,表明其偏酸性;此外,它的不稳定指数也达到了 39.97,这表明它具有一定的稳定性,可以被认为是一种稳定的酸性亲水性蛋白。卤虫 *fru* 基因编码蛋白保守结构域与中华绒螯蟹和红螯螯虾的结果相同^[13-14],主要由一个 BTB 结构域组成,而夏威夷果蝇 (*Drosophila silvestris*) 和寄

生蜂 (*Nasonia vitripennis*) 等包含 BTB 结构域和锌指结构域^[26-27]。我们推测可能是锌指结构域在卤虫 *fru* 基因中缺失,进化成更复杂的调控区域,或由其他结构或位点发挥作用。

本研究通过 qPCR 检测 *fru* 基因在卤虫生殖腺中不同发育时期的表达量来探究其对卤虫的调控功能,结果表明 *fru* 基因在卤虫精巢发育过程中表达水平呈现先下降后上升再下降的趋势,这与 *fru* 基因在雄性德国小蠊 (*Blattella germanica*) 生殖腺中的表达趋势是一致的^[1],在雄性卤虫中未成熟期表达量最高, *fru* 基因作为雄性求偶行为的主要调节因子^[5],可能在卤虫精巢发育过程中发挥着作用。 *fru* 基因在卵巢整个发育过程中呈现出与精巢相反的表达趋势, *fru* 基因在晚期胚胎表达量显著高于其他发育时期,这与拟穴青蟹中 *fru* 基因的表达趋势有所不同^[12],这可能是由于 *fru* 基因在不同物种中行使功能不同。除此之外,卤虫 *fru* 基因的表达水平显示该基因在卵巢中的表达高于在精巢中的表达,这表明 *fru* 基因可能在卤虫 *A. franciscana* 的生殖和繁育方式中起到尤为重要的作用。

卤虫的生物学机制包括抗逆性、滞育、细胞分

裂、发育分化和繁殖等^[28-31]。为了更好地了解 *fru* 基因的作用,我们对处于卵黄发生早期的雌性卤虫进行了显微注射,并使用 qPCR 技术检测了 RNA 干扰后雌性卤虫的干扰效率,结果显示, *fru* 基因的干扰效率高达 95% 以上,这一结果非常显著。尽管对照组 (*dsEGFP*) 和干扰组的胚胎发育周期与正常未进行显微注射卤虫的胚胎发育周期一致,但是由于 RNA 干扰的原因,干扰组的卤虫胚胎出现了滞育,从而导致了休眠卵的出现。在以往的研究中,对于 *fru* 基因的研究通常在雄性中进行,并影响雄性的求偶行为或者生育力下降^[1, 9, 14, 32-34],在沙漠蝗 (*Schistocerca gregaria*) 中, *fru* 基因的敲降不仅可以使交配的时间延缓,还会导致繁育能力降低(精子数量显著减少)^[32],表明 *fru* 基因可能在沙漠蝗交配和繁殖相关过程中起着重要

作用。在本次研究中, *fru* 基因的敲除会显著改变雌性卤虫的胚胎发育,从而影响其生殖和发育,这种现象很有可能是由于卤虫的繁殖模式所决定的。有趣的是,雌性卤虫在交配之前会释放一种信息素去触发雄性卤虫的求偶行为^[35],而 *fru* 基因与这种信息素之间可能存在着某种联系, *fru* 基因和信息素、内分泌激素共同发挥作用,在内部和外部的双重调控下^[36],影响卤虫 *A. franciscana* 的生殖行为。

本研究首次鉴定了两性生殖卤虫 *A. franciscana* 的 *fru* 基因,结果表明 *fru* 基因在卤虫生殖发育及生殖方式决定过程中起重要作用,为后期开展 *fru* 基因的分子机制和功能研究提供了基础数据,并对完善甲壳动物生殖发育调控基础理论及推进卤虫的遗传育种工作具有重要意义。

参考文献:

- [1] Clynen E, Ciudad L, Bellés X, et al. Conservation of *fruitless*' role as master regulator of male courtship behaviour from cockroaches to flies[J]. *Development Genes and Evolution*, 2011, 221(1): 43-48.
- [2] Ito H, Fujitani K, Usui K, et al. Sexual orientation in *Drosophila* is altered by the satori mutation in the sex-determination gene *fruitless* that encodes a zinc finger protein with a BTB domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(18): 9687-9692.
- [3] Ryner L C, Goodwin S F, Castrillon D H, et al. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene[J]. *Cell*, 1996, 87(6): 1079-1089.
- [4] Tanaka R, Higuchi T, Kohatsu S, et al. Optogenetic activation of the *fruitless*-labeled circuitry in *Drosophila* subobscura males induces mating motor acts[J]. *Journal of Neuroscience*, 2017, 37(48): 11662-11674.
- [5] Wu Shunfan, Guo Chao, Zhao Huan, et al. Drosulfakinin signaling in *fruitless* circuitry antagonizes P1 neurons to regulate sexual arousal in *Drosophila*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4770.
- [6] Peng Qionglin, Chen Jie, Pan Yufeng. From *fruitless* to sex: on the generation and diversification of an innate behavior[J]. *Genes, Brain and Behavior*, 2021, 20(8): e12772.
- [7] 陈瑶瑶, 古枫, 钟国华, 等. *Fruitless* 在桔小实蝇求偶和交配行为中的作用 [J]. *昆虫学报*, 2020, 63(8): 924-931.
Chen Yaoyao, Gu Feng, Zhong Guohua, et al. Role of *fruitless* in courtship and mating behaviors in *Bactrocera dorsalis* (Diptera Tephritidae)[J]. *ActaEntomologicaSinica*, 2020, 63(8): 924-931.
- [8] 郑人文. *Fruitless* 在家蚕求偶行为中的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
Zheng Renwen. Functional characterization of *fruitless* in courtship behavior in silkworm[D]. Chongqing: Southwest University, 2016.
- [9] Boerjan B, Tobback J, De Loof A, et al. Fruitless RNAi knockdown in males interferes with copulation success in *Schistocerca gregaria*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(5): 340-347.
- [10] Glenner H, Thomsen P F, Hebsgaard M B, et al. The origin of insects[J]. *Science*, 2006, 314(5807): 1883-1884.
- [11] Budd G E, Telford M J. The origin and evolution of arthropods[J]. *Nature*, 2009, 457(7231): 812-817.
- [12] 邱必巡. 拟穴青蟹 *fruitless* 基因鉴定及在性腺发育中的表达与调控研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2021.
Qiu Bixun. Cloning, expression and regulation of *fruitless* gene in gonadal development of mud crab (*Scylla paramamosain*)[D]. Shantou: Shantou University, 2021.
- [13] Li Peiyao, Liu Yuan, Luo Danli, et al. Two spliced isoforms of the sex-determination gene *fruitless* in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 208-209: 75-83.
- [14] Lin Dawei, GuoYongjun, Chen Xiuli, et al. Identification and expression pattern of the sex determination gene *fruitless*-like in *Cherax quadricarinatus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 259: 110704.
- [15] Triantaphyllidis G, Abatzopoulos T, Sorgeloos P. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca)[J]. *Journal of Biogeography*, 1998, 25(2): 213-226.
- [16] Lopes-dos-Santos R M A, Groot R, Sui Liying, et al. Halophilic bacteria as a food source for the brine shrimp *Artemia*[J]. *Aquaculture*, 2019, 500: 631-639.
- [17] Sánchez M I, Green A J, Castellanos E M. Temporal and spatial variation of an aquatic invertebrate community subjected to avian predation at the Odiel salt pans (SW Spain)[J]. *Archiv für Hydrobiologie*, 2006, 166(2): 199-223.

- [18] Sorgeloos P, Dhert P, Candreva P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp. , in marine fish larviculture[J]. *Aquaculture*, 2001, 200(1/2): 147–159.
- [19] Han Xuekai, Ren Yizhuo, Ouyang Xuemei, et al. Construction of a high-density genetic linkage map and QTL mapping for sex and growth traits in *Artemia franciscana*[J]. *Aquaculture*, 2021, 540: 736692.
- [20] De Vos S, Bossier P, Van Stappen G, et al. A first AFLP-based genetic linkage map for brine shrimp *Artemia franciscana* and its application in mapping the sex locus[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57585.
- [21] Li Dongrui, Ye Huili, Yang Jinshu, et al. Identification and characterization of a *Masculinizer* (*Masc*) gene involved in sex differentiation in *Artemia*[J]. *Gene*, 2017, 614: 56–64.
- [22] King A M, MacRae T H. The small heat shock protein p26 aids development of encysting *Artemia* embryos, prevents spontaneous diapause termination and protects against stress[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43723.
- [23] 任翊卓, 韩学凯, 左佳俊, 等. *Piwi* 基因参与两性卤虫 (*Artemia franciscana*) 的生殖调控研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2021, 52(6): 1567–1576.
- Ren Yizhuo, Han Xuekai, Zuo Jiajun, et al. Thereproductive regulation of *piwi* in bisexual *Artemia franciscana*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(6): 1567–1576.
- [24] 孙瑜霞. 卤虫休眠胚胎形成过程中相关基因分子克隆及功能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- Sun Yuxia. Identification and characterization of genes in *Artemia* and the roles in the diapause embryo formation[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [25] 王志伟. 对虾 VEGF 信号通路在 WSSV 感染过程中的功能研究 [D]. 北京: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2017.
- Wang Zhiwei. Studies on the functions of VEGF signaling pathway in shrimp during WSSV infection[D]. Beijing: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2017.
- [26] Davis T, Kurihara J, Yoshino E, et al. Genomic organisation of the neural sexdetermination gene *fruitless* (*fru*) in the Hawaiian species *Drosophila siluestris* and the conservation of the *Fru* BTB protein-protein-binding domain throughout evolution[J]. *Hereditas*, 2000, 132(1): 67–78.
- [27] Bertossa R C, van de Zande L, Beukeboom L W. The *fruitless* gene in *Nasonia* displays complex sex-specific splicing and contains new zinc finger domains[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26(7): 1557–1569.
- [28] Liu Yulei, Zhao Yang, Dai Zhongmin, et al. Formation of diapause cyst shell in brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*, and its resistance role in environmental stresses[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(25): 16931–16938.
- [29] Dai Zhongmin, Li Ran, Dai Li, et al. Determination in oocytes of the reproductive modes for the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*[J]. *Bioscience Reports*, 2011, 31(1): 17–30.
- [30] Copf T, Schröder R, Averof M. Ancestral role of *caudal* genes in axis elongation and segmentation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(51): 17711–17715.
- [31] Chen Dianfu, Lin Cheng, Wang Hongliang, et al. An La-related protein controls cell cycle arrest by nuclear retrograde transport of tRNAs during diapause formation in *Artemia*[J]. *BMC Biology*, 2016, 14(1): 16.
- [32] Boerjan B, Tobback J, Vandersmissen H P, et al. *Fruitless* RNAi knockdown in the desert locust, *Schistocerca gregaria*, influences male fertility[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58(2): 265–269.
- [33] Demir E, Dickson B J. *fruitless* splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*[J]. *Cell*, 2005, 121(5): 785–794.
- [34] Ito H, Sato K, Kondo S, et al. *Fruitless* represses *robo1* transcription to shape male-specific neural morphology and behavior in *Drosophila*[J]. *Current Biology*, 2016, 26(12): 1532–1542.
- [35] Tapia C, Parra L, Pacheco B, et al. Courtship behavior and potential indications for chemical communication in *Artemia franciscana* (Kellog 1906)[J]. *Gayana*, 2015, 79(2): 152–160.
- [36] Zhao Songhui, Deanhardt B, Barlow G T, et al. Chromatin-based reprogramming of a courtship regulator by concurrent pheromone perception and hormone signaling[J]. *Science Advances*, 2020, 6(21): eaba6913.

Reproductive regulation of *fruitless* gene in brine shrimp *Artemia franciscana*

Li Ke^{1,3}, Ren Yizhuo², Han Xuekai^{1,3}, Liu Xue^{1,3}, Sui Liying^{1,3}

(1. Asia Regional *Artemia* Reference Center, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Hebei Engineering Research Center for Ecological Restoration of Rivers and Coastal Areas, Hebei University of Environmental Engineering, Qinhuangdao 066102, China; 3. Key Laboratory of Marine Resource Chemistry and Food Technology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *fruitless* (*fru*) gene plays an important role in courtship, mating behavior and reproductive development of insects and crustaceans. *Artemia* is not only the crucial live food in fish and crustacean larviculture, but also an ideal experimental organism for biological study. In this experiment, the open reading frame (ORF) of *fru* gene was obtained from the transcriptome of *Artemia franciscana* and analyzed bioinformatically. qPCR was used to study the expression characteristics of this gene at different stages of gonad development in the *Artemia*, and its function was explored by RNAi microinjection. Bioinformatics analysis showed that the ORF length of *fru* gene was 1 215 bp, which contains 404 amino acids, while its molecular weight and isoelectric point were 45.19 kDa and 5.28, and it was an acidic hydrophilic protein with no signal peptide or transmembrane structure; structural domain prediction showed that there are two structural domains of *fru*, BTB_POZ and HTH. The secondary structure is dominated by α -helix and irregular coil, and the tertiary structure corresponds to it. The qPCR results showed that the expression of *fru* gene showed a significant increase in late embryos stage, and its expression was significantly higher than that of early oocyte, later oocyte and early embryo stages in the ovary ($P < 0.01$); while the expression of *fru* gene also increased in immature stage of the testis, and its expression was significantly higher than that of early, middle and late maturation stages ($P < 0.01$). After RNA interference, we found that there was a significant decrease in the expression of the *fru* gene ($P < 0.01$), and all the offspring produced were cysts. This suggests that the *fru* gene has an important effect on reproduction and development of *A. franciscana*, and may be a key factor influencing the reproductive mode of *Artemia*. Through this study, we obtained important information about the role of *fru* gene in the reproductive development of *Artemia* and their related molecular mechanisms, which can help us better understand this important biological process.

Key words: *Artemia*; *fru* gene; gonad; gene expression character; RNAi; reproductive development