

Zhu H, Deng D G, Jin Q D, *et al.* Functional verification of genes related to helmet development in *Daphnia galeata*: based on RNA interference and morphological observation analysis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(4): 042605. [朱豪, 邓道贵, 金齐德, 等. 盔形溥头盔发育相关基因的功能验证: 基于RNA干扰与形态观测分析 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(4): 042605.]

盔形溥头盔发育相关基因的功能验证: 基于RNA干扰与形态观测分析

朱豪 邓道贵 金齐德 尹熠辉 韩灵凤 王梓昕 刘佳虹 付林然

(淮北师范大学生命科学学院, 淮北 235000)

摘要: 为探究盔形溥头盔形成的分子机理, 本文在RNA干扰下研究了盔形溥的两个与头盔发育相关基因(*DgTrypsin*和*DgFerritin*)的表达及头盔形态变化。结果表明, 在2%大肠杆菌浓度下, 与EGFP组相比, *DgTrypsin*组盔形溥的头盔长、相对头盔长、头盔长与头宽的比值均显著减少, *DgTrypsin*基因的表达量显著下降了27.45%, 而*DgFerritin*组盔形溥的头盔长、相对头盔长、头盔长与头宽的比值及*DgFerritin*基因的表达量均无显著差异。在5%大肠杆菌浓度下, 与EGFP组相比, *DgTrypsin*和*DgFerritin*组下盔形溥的头盔长、相对头盔长、头盔长与头宽的比值均显著减少, 其基因表达量分别显著下降了55.96%和40.39%。由此可见, 较高水平的RNA干扰对盔形溥头盔形态变化和两个相关基因表达量的抑制作用更强, *DgTrypsin*和*DgFerritin*基因参与了盔形溥的头盔发育。该研究结果将为进一步探讨溥属种类形态发生的分子机制提供参考。

关键词: *DgTrypsin*基因; *DgFerritin*基因; 头盔; 盔形溥; RNA干扰

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)04-042605-08

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0250 **CSTR:** 32229.14.SSSWXB.2025.0250



枝角类, 隶属于节肢动物门、甲壳纲、双甲目, 是淡水生态系统的重要组成部分^[1]。它们一般以细菌、藻类、有机碎屑等微小颗粒为食, 同时又是淡水鱼类等捕食者的优质饵料。由于枝角类具有体型小、营养价值高、繁殖快和孤雌生殖等特征^[2, 3], 一些种类已作为许多研究的模式生物^[4-7]。在水生生态系统中, 捕食者所释放的信息素能够诱导溥属枝角类形成有效防御机制, 从而使得溥属种类避免被捕食^[8]。通常, 在捕食者信息素诱导下, *Daphnia mitsukurina*的首次成熟体长变小, 其产出的后代体长也减小^[9]。另一些研究表明, 捕食者信息素还能够导致溥属种类的棘刺、颈齿及头宽等形态发生变化^[10-12]。鳙(*Aristichthys nobilis*)信息素诱导后的转录组测序表明, 盔形溥(*Daphnia galeata*)的胰蛋白酶(*Trypsin*)和铁蛋白(*Ferritin*)基因的相对表达量显著上调^[13, 14]。

不同动物中胰蛋白酶的主要功能均是催化蛋

白质的水解, 将蛋白质分解成小肽和氨基酸。胰蛋白酶是参与动物蛋白质消化的关键酶^[15]。无脊椎动物中的胰蛋白酶还在生物体对抗外部细菌感染和组织再生过程中发挥着重要作用^[16, 17]。同时, 胰蛋白酶在鱼类早期发育阶段发挥着至关重要的作用^[18, 19], 不仅能够直接影响幼鱼的存活和发育^[20], 还与鱼类的摄食密切相关^[21]。此外, 胰蛋白酶还参与昆虫和甲壳动物的蜕皮过程。一个胰蛋白酶基因的沉默导致东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis*)幼虫在蜕皮1d后的翅膀和背部出现严重缺陷表型^[22]。在眼斑龙虾(*Panulirus argus*)蜕皮期间, 胰蛋白酶的活性达到了最大值^[23]。Liu等^[24]发现, 位于棉铃(*Helicoverpa armigera*)幼虫角质层中的胰蛋白酶, 在其蜕皮和变态发育的过程中表达。有研究表明, 铁蛋白在维持生物体正常生命活动如幼体发育和代谢等方面发挥着关键作用^[25-27]。在拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)中, 铁蛋白mRNA在其个

收稿日期: 2025-07-25; 修订日期: 2025-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(31870451和32001155)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870451 and 32001155)]

作者简介: 朱豪(2001—), 男, 硕士研究生; 主要研究枝角类分子进化。E-mail: 2093133294@qq.com

通信作者: 邓道贵(1969—), 男, 教授; 主要研究方向为浮游生物生态学研究。E-mail: dengdg@chnu.edu.cn

体发育阶段呈现出高表达^[28]。铁蛋白参与了文蛤(*Meretrix meretrix*)壳的形成过程^[29]。在日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)中, 铁蛋白基因*SjFer0*的RNA干扰显著影响了其体长的生长^[30]。刘俊娜等^[31]发现, 重链铁蛋白基因 *HvFer 1*在调控茄二十八星瓢虫(*Henosepilachna vigintioctopunctata*)幼虫发育、成虫鞘翅表型等方面起着至关重要的作用。

目前, 胰蛋白酶和铁蛋白基因在蚤属枝角类中的功能研究较少见。在鱼类信息素存在下, 实验前期已利用转录组技术筛选了与盔形蚤头盔发育相关的基因^[13, 14]。本文挑选了两个可能与盔形蚤头盔发育相关的候选基因, 即*DgTrypsin* (基因编号为Cluster-2973.8449)^[13]和*DgFerritin* (基因编号为Cluster-2384.9831)^[14], 并通过RNA干扰实验研究了这两个基因的表达水平及其对盔形蚤体型尤其是头盔发育的影响, 以验证胰蛋白酶和铁蛋白基因参与盔形蚤头盔的发育, 这将为进一步揭示枝角类与形态发生相关的分子机制提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料的培养

斜生四链藻(*Tetrademus obliquus*), 购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(FACHB-417), 培养基为BG-11培养基, 在智能光照培养箱中培养, 培养条件为温度(25±1)℃、光照强度2200 lx、光暗比12h:12h。待斜生四链藻达到指数生长期后收集, 并于4℃下保存备用。

盔形蚤来自巢湖表层沉积物中休眠卵的孵化。将孵化的盔形蚤个体放入50 mL烧杯(含有40 mL培养液), 培养液为曝气48h以上的过滤自来水(pH为7.8—8.2, 溶解性总固体含量为530—570 mg/L)。盔形蚤在智能光照培养箱中长期培养, 培养条件为光照强度2200 lx、光暗比12h:12h、温度(25±1)℃, 每天更换培养液和食物, 食物为20 mg/L的斜生四链藻(湿重)。

1.2 盔形蚤*DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的系统进化树

盔形蚤*DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的筛选来自金齐德^[13]和曹雅芹等^[14]的实验结果。利用MEGA11软件, 基于Neighbor-Joining (邻接法)^[32]构建盔形蚤*DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的氨基酸系统发育树, 两个基因的建树外群分别是脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)。

1.3 dsRNA的制备

EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)是

一种绿色荧光蛋白, 诱导后产生的dsEGFP不沉默任何重要的内源基因, 也不干扰动物细胞的正常生理过程, 可作为RNAi的阴性对照^[33, 34]。

根据目的基因序列设计并合成相应引物, 通过PCR扩增得到目的基因, 与L4440载体连接组装, 转入Top10感受态细胞中培养、增殖, 以获得重组DNA, 再进行测序、酶切检测鉴定其正确性, 进而获得L4440-*DgTrypsin*、L4440-*DgFerritin*和L4440-*EGFP*重组质粒, 这些重组质粒均由通用生物(安徽)股份有限公司构建。再将上述质粒分别转化至大肠杆菌HT115感受态细胞中, 并在含四环素(10 μg/mL)和氨苄青霉素(100 μg/mL)的LB固体平板上筛选阳性克隆。挑取单菌落接种于含有双抗(四环素和氨苄青霉素)的LB液体培养基中, 振荡培养至OD₆₀₀≈0.8时, 加入IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside)诱导dsRNA的表达^[35]。

1.4 RNA干扰实验

用含有*DgTrypsin*、*DgFerritin*和*EGFP*基因的dsRNA的大肠杆菌培养盔形蚤, 开展RNA干扰实验。结合本实验室之前的研究结果^[36, 37], 设置*EGFP* (对照组)、*DgTrypsin*和*DgFerritin*三个实验组合。另外, 设置2%浓度组(2%大肠杆菌+98%斜生四链藻)和5%浓度组(5%大肠杆菌+95%斜生四链藻)两个RNA干扰组, 总食物生物量为20 mg/L(湿重)。每个实验组设置3个平行, 每个平行15只实验蚤, 每个实验组合共计45只实验蚤。将盔形蚤第三代产出小于6h的幼蚤作为实验蚤, 分别放入50 mL烧杯(含40 mL培养液)中培养, 每个烧杯中放入1只实验蚤。实验期间, 显微镜下测量每只实验蚤每个龄期的体长、头盔长和头宽, 每天更换培养液和食物。实验持续时间为10d。在实验结束前, 使用YUESHI YB710显微镜对盔形蚤进行拍照, 显示不同实验组中盔形蚤个体的形态。在实验结束后, 3个实验组中的所有盔形蚤均被及时收集, 放入EP管中, 使用RNA试剂盒(TaKaRa, 中国大连)提取盔形蚤的总RNA, 再使用超微量分光光度计(MD2000D, Biofuture)检测总RNA的质量和浓度。使用试剂盒[All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix (with dsDNase), 百时美]将提取的RNA进行反转录, 得到的cDNA用于后续实验。*DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的表达量用LightCycler[®] 96荧光定量PCR仪测定。实验期间, 所有产出的幼蚤均及时移出烧杯, 培养液为曝气48h以上的过滤自来水。

1.5 盔形蚤*DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的表达检测

将上述各实验组的cDNA作为模板进行实时荧

光定量PCR检测。设置3个重复,内参基因为*ACT* (*Actin*)^[14]。用Beacon Designer软件设计特异性引物(表1),PCR反应体系:95℃10min,95℃10s、60℃30s,共40个循环。*DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的表达式用LightCycler®96 qPCR仪进行检测,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

1.6 数据分析

实验数据均采用SPSS21.0软件进行处理,使用Tukey HSD多重比较分析不同处理组间的统计学差异。

2 结果

2.1 *DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的序列和结构分析

基于转录组测序分析^[13,14],盔形蚤*DgTrypsin*基因全长约1420 bp,包含1个543 bp的开放阅读框(ORF),编码180个氨基酸。ExPASy ProtParam预测其蛋白分子式为C₄₃₂₅H₇₂₃₂N₁₄₂₀O₁₈₁₃S₂₉₆,分子量约为117.63 kD,理论等电点(pI)为5.01。*DgFerritin*基因全长约为925 bp,包含一个597 bp的开放阅读框(ORF)、编码198个氨基酸,ExPASy ProtParam预测其蛋白分子式为C₂₈₆₄H₄₈₀₅N₉₂₅O₁₂₀₅S₁₇₅,分子量约77.08 kD,理论等电点(pI)为5.1。

系统进化树分析显示,盔形蚤*DgTrypsin*基因的氨基酸序列与蚤状蚤、*Daphnia pulicaria*的亲缘关系较近且聚为一支,与其他蚤属种类的亲缘关系较远(图1A)。盔形蚤*DgFerritin*基因的氨基酸序列

与*D. pulicaria*亲缘关系最近,与大型蚤(*Daphnia magna*)、隆线蚤(*Daphnia carinata*)的亲缘关系较远,其次是蚤状蚤(图1B)。

2.2 dsRNA的诱导结果

L4440载体质粒大小约为150 bp, L4440-*DgFerritin*和L4440-*DgTrypsin*重组质粒的表达片段分别为604和555 bp。电泳结果显示, L4440-*DgFerritin*和L4440-*DgTrypsin*重组质粒分别约为750和700 bp(图2),与两个重组质粒的预期长度相一致,表明*DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的dsRNA被特异性表达。

2.3 RNA干扰下盔形蚤形态及其相关基因表达量的变化

在2%大肠杆菌浓度下,所有实验组的盔形蚤个体均发育至第5龄期。与EGFP组相比,*DgTrypsin*组中盔形蚤在第5龄时的头盖长、体长、相对头盖长及头盖长与头宽的比值均显著减小($P<0.05$),而*DgFerritin*组中的盔形蚤均无显著性差异(表2)。与EGFP组相比(图3A),在*DgFerritin*组中的头盖形态变化不明显(图3B),而盔形蚤在*DgTrypsin*组中的头盖相对短钝(图3C)。此外,在各实验组中,其平行组中盔形蚤个体的头盖形态差异不明显。

在5%大肠杆菌浓度下,所有实验组的盔形蚤均发育至第5龄期。在RNA干扰实验中,盔形蚤在第5龄时*DgTrypsin*组和*DgFerritin*组的头盖长、相对头盖长及头盖长与头宽的比值均显著小于EGFP组($P<0.01$;表2),且在盔形蚤*DgTrypsin*组的体长也显著小于EGFP组($P<0.01$;表2)。与EGFP组相比(图3D),盔形蚤*DgFerritin*组的头盖相对短小(图3E),而*DgTrypsin*组的个体明显变小(图3F)。同样,在各实验组中,其平行组中盔形蚤个体的头盖形态差异不明显。

在2%和5%大肠杆菌浓度实验中,*DgFerritin*和*DgTrypsin*组中约20%—30%盔形蚤个体均出现不怀卵或胚胎消解的现象。

在2%大肠杆菌浓度下,与EGFP组相比,盔形蚤在*DgFerritin*组中*DgFerritin*基因的表达量

表1 引物的名称和序列

Tab. 1 Name and sequence of primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'—3')
<i>DgFerritin</i> -F	GCCGTAAAGTCGTATTGATT
<i>DgTrypsin</i> -F	CTCTGGCTCTGACTATGG
<i>ACT</i> -F	CCACACTGTCCCCATTTATGAA
<i>DgFerritin</i> -R	TTGGTATTAGACTCGTCGTT
<i>DgTrypsin</i> -R	TTGTTCTCTTGACGGTAA
<i>ACT</i> -R	CGCGACCAGCCAAATCC

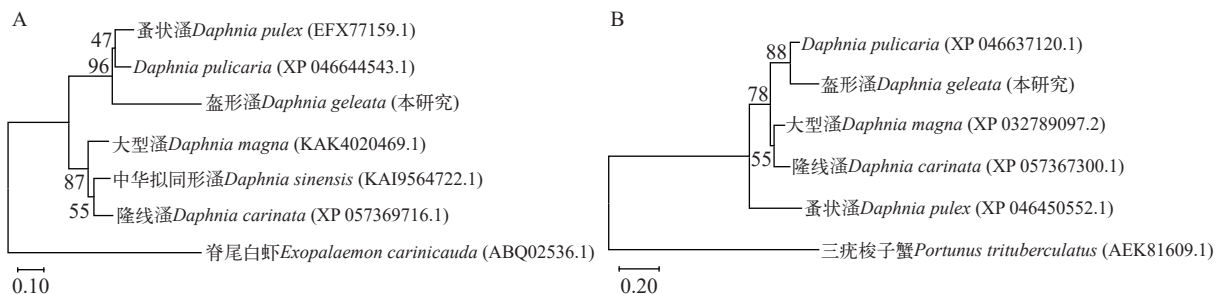


图1 *DgTrypsin* (A)和*DgFerritin* (B)基因的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of amino acid sequence of *DgTrypsin* (A) and *DgFerritin* (B) genes

降低了7.92%, 无显著差异, 而在*DgTrypsin*组中*DgTrypsin*基因的表达量显著降低了27.45% ($P<0.01$; 图4)。在5%大肠杆菌浓度下, 干扰组中盔形蚤*DgFerritin*和*DgTrypsin*的相对表达量与*EGFP*组相比分别显著降低了40.39%和55.96% ($P<0.01$; 图4)。

3 讨论

在本研究中, 系统进化树分析显示, 盔形蚤*DgTrypsin*基因与蚤状蚤、*D. pulicaria*聚为一支, 表明这些种类在胰蛋白酶基因功能上具有较高的保守性, 且该基因可能在其共同祖先中已具备一定的发育调控功能。值得注意的是, 盔形蚤在系统进化树中形成独立分支, 暗示*DgTrypsin*基因在盔形蚤的发育调控中可能经历了特定的功能分化。相比之下, 盔形蚤*DgFerritin*基因与*D. pulicaria*聚为一支, 暗示它们的亲缘关系较近, 且该基因还广泛分布在其他蚤属种类中, 可能参与了体内铁代谢、抗氧化等基本生理过程。

通常, 甲壳动物外被厚的外骨骼。因此, 在甲壳动物的生长发育过程中, 须蜕皮才能生长。研究表明, 捕食者的存在能够诱导蚤属甲壳动物的身体形态发生变化^[38-40]。随着转录组和RNAi技术被广泛应用于生物基因的筛选和功能验证^[13, 41-43], 一些与甲壳动物蜕皮和形态相关的基因被筛选和验证。*CYP302A1*基因的沉默能够导致中华拟同形蚤(*Daphnia sinensis*)蜕皮时间延长及胚胎发育异常^[42]。Miyakawa等^[44]发现, 形态发生基因(*Hox 3*、*extra-denticle*和*escargot*)、保幼激素通路基因(*JHAMT*和*Mer*)及胰岛素信号通路基因(*InR*和*IRS-1*)均与蚤状蚤的颈齿形成密切相关。Cao等^[14]观察到, *Dagcut*基因(*Daphnia galeata* cuticle protein gene)的沉默导致了盔形蚤壳刺形态的异常, 甚至所产幼蚤的壳刺也出现了弯曲。在本研究中, *DgTrypsin*和*DgFerritin*

基因的沉默能够显著影响盔形蚤的头盔发育。

研究表明, 胰蛋白酶在节肢动物(尤其是甲壳动物)发育和蜕皮过程中发挥着重要作用。Jiang等^[45]发现, 胰蛋白酶基因的表达量在拟穴青蟹的蚤状幼体阶段出现波动, 最高表达水平出现在蚤状幼体Ⅰ阶段, 而在蚤状幼体Ⅲ期和Ⅴ期呈现较低水平; 蜕皮后, 拟穴青蟹的胰蛋白酶转录显著增强。Wei等^[22]观察到, 胰蛋白酶基因的沉默导致了东亚飞蝗蜕皮液中蛋白酶和角质层降解活性的显著降低, 同时在蜕皮过程中其角质层仅在背部和腹部之间部分退化, 且在幼虫蜕皮1d后其翅膀和背胸部出现了严重缺陷的现象。在本研究中, 2%和5%大肠杆菌浓度下, 与对照组相比, *DgTrypsin*组中盔形蚤的头盔长和相对头盔长均显著减少, 可能是胰蛋白酶基

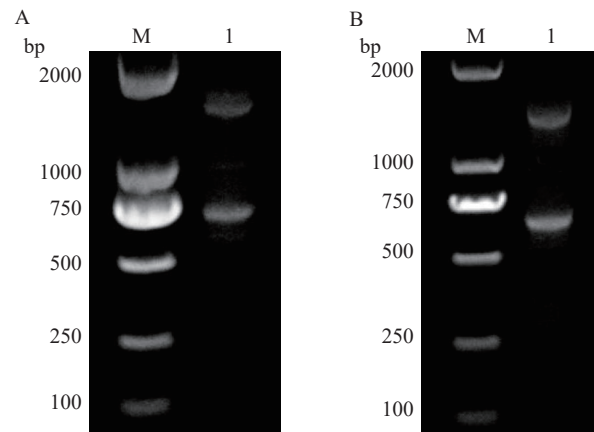


图2 dsRNA诱导图

Fig. 2 The induction of double strand RNA

M. DNA分子标准量; A-1. IPTG诱导携带L4440-*DgFerritin*重组质粒的菌株; B-1. IPTG诱导携带L4440-*DgTrypsin*重组质粒的菌株

M. DNA molecular standard quantity; A-1. The strain carrying L4440-*DgFerritin* recombinant plasmid induced by IPTG; B-1. The strain carrying L4440-*DgTrypsin* recombinant plasmid induced by IPTG

表2 RNA干扰后盔形蚤在第5龄时的形态学参数 (平均值±标准差)

Tab. 2 Morphometric parameters of *D. galeata* at 5th instar after RNAi (mean±SD)

	实验组	体长(mm)	头盔长(mm)	相对头盔长	头盔长与头宽的比值
2%大肠杆菌	<i>EGFP</i>	0.8783±0.0687 ^a	0.1650±0.0127 ^a	0.1886±0.0177 ^a	0.6034±0.0482 ^a
	<i>DgTrypsin</i>	0.8033±0.0790 ^b	0.1300±0.0169 ^b	0.1620±0.0167 ^b	0.5256±0.0599 ^b
	<i>DgFerritin</i>	0.8750±0.0526 ^a	0.1567±0.0114 ^a	0.1793±0.0126 ^a	0.5846±0.0537 ^a
5%大肠杆菌	<i>EGFP</i>	0.8533±0.0823 ^a	0.1483±0.0182 ^a	0.1742±0.0181 ^a	0.5444±0.0485 ^a
	<i>DgTrypsin</i>	0.7350±0.0325 ^b	0.1100±0.0117 ^b	0.1497±0.0151 ^b	0.4600±0.0463 ^b
	<i>EGFP</i>	0.8400±0.0718 ^a	0.1575±0.0316 ^a	0.1874±0.0342 ^a	0.5881±0.0856 ^a
	<i>DgFerritin</i>	0.8033±0.0431 ^a	0.1260±0.0197 ^b	0.1565±0.0205 ^b	0.4896±0.0563 ^b

注: 小写字母表示对照组与基因组之间的显著差异($P<0.05$)

Note: Lowercase letters indicate significant differences between the control group and treatment group ($P<0.05$)

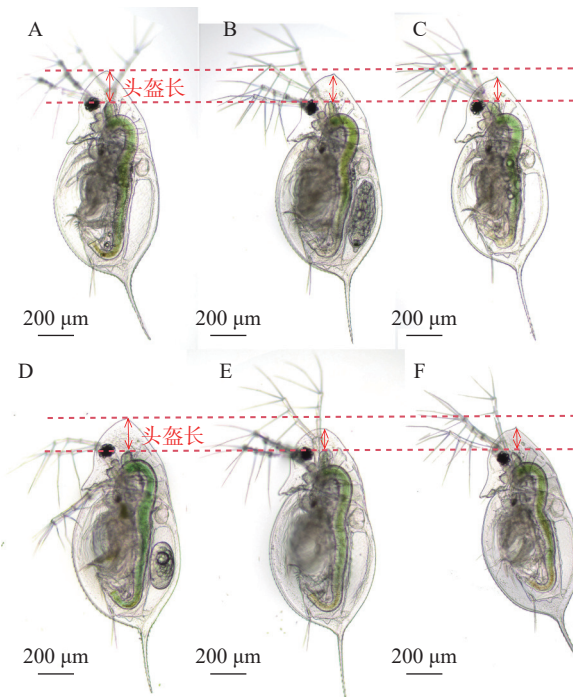


图3 盔形溞在RNA干扰下的形态变化

Fig. 3 Morphological changes of *D. galeata* after RNAi

2%大肠杆菌浓度: A. EGFP组第5龄盔形溞; B. *DgFerritin*组第5龄盔形溞; C. *DgTrypsin*组第5龄盔形溞; 5%大肠杆菌浓度: D. EGFP组第5龄盔形溞; E. *DgFerritin*组第5龄盔形溞; F. *DgTrypsin*组第5龄盔形溞

2% *E. coli* concentration: A. *D. galeata* at the 5th instar in the EGFP group; B. *D. galeata* at the 5th instar in the *DgFerritin* group; C. *D. galeata* at the 5th instar in the *DgTrypsin* group. 5% *E. coli* concentration: D. *D. galeata* at the 5th instar in the EGFP group; E. *D. galeata* at the 5th instar in the *DgFerritin* group; F. *D. galeata* at the 5th instar in the *DgTrypsin* group

因的沉默显著影响了其体内蛋白质的分解及蜕皮激素中相关物质的合成,进而延缓了*DgTrypsin*组盔形溞的身体生长,同时影响了盔形溞参与头盔发育的能量分配。

铁蛋白也是生物有机体不可缺少的蛋白质,对维持生物体的稳态和个体发育起着较大作用^[26,28]。Śmietana等^[46]观察到,在甲壳动物*Faxonius limosus*中,*Ferritin*基因与其肌肉代谢密切相关。在低盐度条件下,转染铁蛋白*PtFer*基因重组质粒的细胞存活率显著高于转染无插入片段的质粒细胞,表明在低盐胁迫下铁蛋白对三疣梭子蟹具有保护作用^[47]。当环境条件适宜时,*Acartia tonsa*滞育卵转变为发育状态的过程中,铁蛋白的参与起着至关重要的作用^[26]。此外,在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中,Fanis等^[48]发现,铁蛋白H和L转录物在其胚胎发生过程中共表达,且两个亚基与胚胎发育密切相关。在桡足类中,铁蛋白还可以参与铁

的储存、幼虫发育和应激反应^[27]。刘俊娜等^[31]对茄二十八星瓢虫3龄幼虫的铁蛋白基因干扰后发现,后4龄幼虫到蛹期的时间显著延长,蛹的部分枝刺和斑点无法正常形成,且羽化后的成虫鞘翅出现异常等现象。同样地,对褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stal)幼虫铁蛋白基因的干扰,出现了幼虫身体局部组织黑化和部分幼虫发育停滞甚至死亡的现象^[49]。上述研究表明,铁蛋白在参与生物体的生长发育和形态发生中起重要作用。在本研究中,与对照组相比,尽管在2%大肠杆菌浓度下,盔形溞在*DgFerritin*组中*DgFerritin*基因的表达量无显著降低,盔形溞的头盔长和体长也无显著减少。但在5%大肠杆菌浓度下,与对照组相比,盔形溞在*DgFerritin*组的头盔长和相对头盔长均显著减少,且*DgFerritin*基因的表达量显著降低了40.39%。这表明高浓度大肠杆菌的干扰能够有效降低铁蛋白基因的相对表达量,进而影响到盔形溞形态的发育,导致盔形溞在成熟时的头盔形态相对于对照组更圆钝。此外,在实验过程中,平行组中出现了一些盔形溞个体因无法正常蜕皮而死亡的现象,暗示*DgFerritin*基因的沉默也影响了盔形溞的正常生长。由此可见,*DgTrypsin*基因和*DgFerritin*基因与盔形溞头盔的发育密切相关。

鱼类信息素诱导溞属枝角类表型可塑性的现

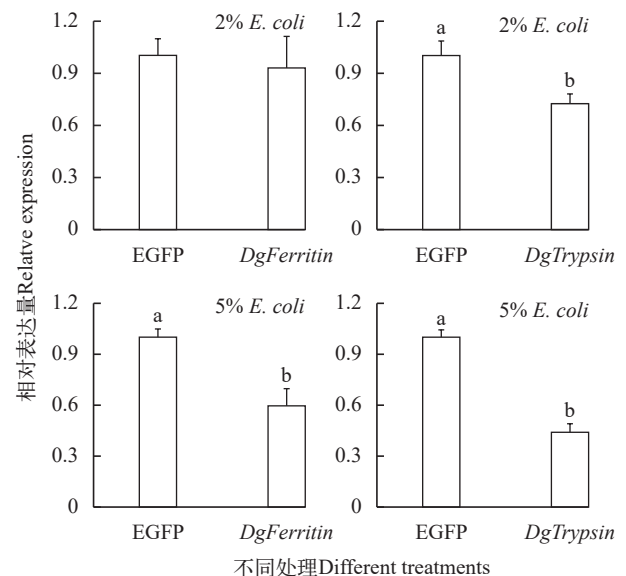


图4 盔形溞*DgFerritin*和*DgTrypsin*基因表达量在RNA干扰后的变化

Fig. 4 The changes of *DgFerritin* and *DgTrypsin* gene expression levels in *D. galeata* after RNAi

不同小写字母显示不同处理组间的显著差异($P < 0.05$)

Different lowercase letters indicate significant differences in different treatments ($P < 0.05$)

象是普遍存在的^[9, 10], 但导致其发生的分子机制研究显得明显不足。根据对鲮信息素处理组与对照组的转录组测序结果, 筛选出盔形蚤与头盔形态相关的候选基因^[13, 14]。通过RNAi实验, 本文进一步验证了*DgTrypsin*和*DgFerritin*两个基因参与盔形蚤的头盔发育。本研究结果一方面强化了捕食者诱导蚤属枝角类表型可塑性的分子基础, 另一方面为进一步探讨和开发枝角类与形态发育相关基因功能提供重要参考。但由于本实验RNAi的持续时间较短且缺乏更多的生活史参数, 盔形蚤*DgTrypsin*和*DgFerritin*基因的功能仍需开展更深入的探究。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Burgis M. Ecology of Freshwaters: a view for the twenty-first century, Fourth Edition: Book Reviews [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2011, **104**(1): 234-235.
- [2] Ebert D. *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution [J]. *EvoDevo*, 2022, **13**(1): 16.
- [3] Seda J, Petrussek A. *Daphnia* as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks [J]. *Journal of Limnology*, 2011, **70**(2): 337.
- [4] Tkaczyk A, Bownik A, Dudka J, et al. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review [J]. *Science of The Total Environment*, 2021(**763**): 143038.
- [5] Bownik A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: a review [J]. *Science of The Total Environment*, 2017(**601/602**): 194-205.
- [6] Liu Z, Malinowski C R, Sepúlveda M S. Emerging trends in nanoparticle toxicity and the significance of using *Daphnia* as a model organism [J]. *Chemosphere*, 2022(**291**): 132941.
- [7] Akbar S, Gu L, Sun Y, et al. Understanding host-microbiome-environment interactions: Insights from *Daphnia* as a model organism [J]. *Science of the Total Environment*, 2022(**808**): 152093.
- [8] Suppa A, Caleffi S, Gorbi G, et al. Environmental conditions as proximate cues of predation risk inducing defensive response in *Daphnia pulex* [J]. *Biologia*, 2021, **76**(2): 623-632.
- [9] Gu L, De Meester L, Yang Z. The role of prey and predator identity in eliciting inducible defenses of *Daphnia* [J]. *Ecology*, 2023, **104**(5): e4033.
- [10] Diel P, Rabus M, Laforsch C. Pricklier with the proper predator? Predator-induced small-scale changes of spinescence in *Daphnia* [J]. *Ecology and Evolution*, 2021, **11**(23): 17080-17090.
- [11] Sperfeld E, Nilssen J P, Rinehart S, et al. Ecology of predator-induced morphological defense traits in *Daphnia longispina* (Cladocera, Arthropoda) [J]. *Oecologia*, 2020, **192**(3): 687-698.
- [12] Paplauskas S, Morton O, Hunt M, et al. Predator-induced shape plasticity in *Daphnia pulex* [J]. *Ecology and Evolution*, 2024, **14**(2): e10913.
- [13] Jin Q D. Screening and functional analysis of genes related to helmet formation in *Daphnia galeata* induced by *Aristichthys nobilis* kairomones [D]. Huaibei: Huaibei Normal University, 2024. [金齐德. 鲮鱼信息素诱导下盔形蚤头盔形成相关基因的筛选和功能分析 [D]. 淮北: 淮北师范大学, 2024.]
- [14] Cao Y Q, Zhao Y J, Qi H Y, et al. Screening of morphology-related genes based on predator-induced transcriptome sequencing and the functional analysis of *Dagcut* gene in *Daphnia galeata* [J]. *Current Zoology*, 2023, **70**(4): 440-452.
- [15] Vertiprakhov V G, Trukhachev V I, Ovchinnikova N V. Trypsin cycling in poultry is associated with metabolic regulation [J]. *Frontiers in Physiology*, 2023(14): 1226546.
- [16] Wang H, Liang J, Zhao Y, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of trypsin-like serine protease from triangle-shell pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, **40**(2): 603-608.
- [17] Yuan Z, Dahms H U, Han L L, et al. Cloning and characterization of a trypsin-like serine protease gene, a novel regeneration-related gene from *Apostichopus japonicus* [J]. *Gene*, 2012, **502**(1): 46-52.
- [18] Rønnestad I, Yúfera M, Ueberschär B, et al. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2013, **5**(s1): S59-S98.
- [19] Ghasemi N, Imani A, Noori F, et al. Ontogeny of digestive tract of Stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) from hatching to juvenile stage: Digestive enzymes activity, stomach and proximal intestine [J]. *Aquaculture*, 2020(519): 734751.
- [20] Anderson K, Kuo C Y, Lu M W, et al. A transcriptomic investigation of digestive processes in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, before, during, and after metamorphic development [J]. *Gene*, 2018(661): 95-108.
- [21] Odedeyi D O, Fagbenro O A. Feeding habits and digestive enzymes in the gut of *Mormyrus rume* (Valenciennes 1846) (Osteichthyes Mormyridae) [J]. *Tropical Zoology*, 2010(**23**): 75-89.
- [22] Wei Z, Yin Y, Zhang B, et al. Cloning of a novel protease required for the molting of *Locusta migratoria manilensis* [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2007, **49**(7): 611-621.
- [23] Perera E, Moyano F J, Díaz M, et al. Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus* [J]. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, **151**(3): 250-256.
- [24] Liu Y, Sui Y P, Wang J X, *et al.* Characterization of the trypsin-like protease (Ha-TLP2) constitutively expressed in the integument of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2009, **72**(2): 74-87.
- [25] Xu Q L, Kang B, Jiang D M. Mechanism of apoptosis mediated by ferritin [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, **32**(11): 1213-1218. [徐麒麟, 康波, 姜冬梅. 铁蛋白介导细胞凋亡的作用机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, **32**(11): 1213-1218.]
- [26] Nilsson B, Jepsen P M, Rewitz K, *et al.* Expression of *hsp70* and *Ferritin* in embryos of the copepod *Acartia tonsa* (Dana) during transition between subitaneous and quiescent state [J]. *Journal of Plankton Research*, 2014, **36**(2): 513-522.
- [27] Roncalli V, Uttieri M, Carotenuto Y. The distribution of ferritins in marine copepods [J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2023, **11**(6): 1187.
- [28] Zhang D, Jiang K, Zhang F, *et al.* Isolation and characterization of a ferritin cDNA from the mud crab *Scylla paramamosain* [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2011, **31**(2): 345-351.
- [29] Wang X, Liu B, Xiang J. Cloning, characterization and expression of ferritin subunit from clam *Meretrix meretrix* in different larval stages [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, **154**(1): 12-16.
- [30] Zeng F, Yi C, Zhang W, *et al.* A new ferritin *SjFer0* affecting the growth and development of *Schistosoma japonicum* [J]. *Parasites & Vectors*, 2022, **15**(1): 177.
- [31] Liu J N, Chen Q, Lu Y F, *et al.* Silencing of *HvFer1* affects the development and gut homeostasis of the 28-spotted ladybeetle, *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2025, **68**(6): 709-719. [刘俊娜, 陈琪, 卢忆峰, 等. 沉默 *HvFer1* 影响茄二十八星瓢虫的发育和肠道稳态 [J]. 昆虫学报, 2025, **68**(6): 709-719.]
- [32] Wang C X, Bao H Q, Yan Z C, *et al.* Knockdown of vitellogenin receptor based on minute insect RNA interference methods affects the initial mature egg load in the pest natural enemy *Trichogramma dendrolimi* [J]. *Insect Science*, 2025, **32**(2): 487-500.
- [33] Liu F, Shi W, Ye H, *et al.* RNAi reveals role of insulin-like androgenic gland hormone 2 (IAG2) in sexual differentiation and growth in hermaphrodite shrimp [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021(8): 666763.
- [34] Li B B, Fan J Q, Lu K C, *et al.* Identification and functional characterization of a systemic RNA interference defective 1 gene in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2021(2): 100033.
- [35] Nwokeoji A O, Nwokeoji E A, Chou T, *et al.* A novel sustainable platform for scaled manufacturing of double-stranded RNA biopesticides [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, **9**(1): 107.
- [36] Li G Q, Zhao Y J, Zhu H, *et al.* Expression and functional analysis of the vitellinogen gene in *Daphnia sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, **49**(4): 042509. [李国庆, 赵雅洁, 朱豪, 等. 中华拟同形溞卵黄蛋白原基因的表达和功能分析 [J]. 水生生物学报, 2025, **49**(4): 042509.]
- [37] Zhao Y J, Li G Q, Wang Y P, *et al.* Screening of two genes related to reproduction of *Daphnia sinensis* and their RNA interference [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, **48**(1): 176-184. [赵雅洁, 李国庆, 王业平, 等. 两个与中华拟同形溞生殖相关基因的筛选及其RNA干扰研究 [J]. 水生生物学报, 2024, **48**(1): 176-184.]
- [38] Imai M, Naraki Y, Tochinali S, *et al.* Elaborate regulations of the predator-induced polyphenism in the water flea *Daphnia pulex*: kairomone-sensitive periods and life-history tradeoffs [J]. *Journal of Experimental Zoology Part a, Ecological Genetics and Physiology*, 2009, **311**(10): 788-795.
- [39] Rozenberg A, Parida M, Leese F, *et al.* Transcriptional profiling of predator-induced phenotypic plasticity in *Daphnia pulex* [J]. *Frontiers in Zoology*, 2015(12): 18.
- [40] Jin Q, Wang Y, Zhang K, *et al.* Morphological and life-history trait plasticity of two *Daphnia* species induced by fish kairomones [J]. *Ecology and Evolution*, 2024, **14**(6): e11422.
- [41] Wan X S, Shi M R, Xu J, *et al.* Interference efficiency and effects of bacterium-mediated RNAi in the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Insect Science*, 2021, **21**(5): 8.
- [42] Qi H, Cao H, Zhao Y, *et al.* Cloning and functional analysis of the molting gene *CYP302A1* of *Daphnia sinensis* [J]. *Frontiers in Zoology*, 2023, **20**(1): 2.
- [43] Shelby E A, McKinney E C, Cunningham C B, *et al.* The role of *Dnmt1* in oocyte development [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2023(147): 104507.
- [44] Miyakawa H, Imai M, Sugimoto N, *et al.* Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex* [J]. *BMC Developmental Biology*, 2010(10): 45.
- [45] Jiang K, Zhang F, Zhang D, *et al.* Identification of a trypsin gene from *Scylla paramamosain* and its expression profiling during larval development [J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2011, **6**(32): 6613-6621.
- [46] Śmietana P, Śmietana N, Eljasik P, *et al.* Sexual dimorphism alters seasonal chelae muscle mechanisms in spiny-cheek crayfish (*Faxonius limosus*) [J]. *Frontiers in Physiology*, 2025(16): 1567862.
- [47] Huang S, Xu Q. Ferritin gene from the swimming crab

- (*Portunus trituberculatus*) involved in salinity stress adaptation [J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016, **166**(1): 141-153.
- [48] Missirlis F, Kosmidis S, Brody T, *et al.* Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of *Drosophila* Ferritin [J]. *Gene-tics*, 2007, **177**(1): 89-100.
- [49] Chen Y Z. Functional analysis of *ferritin* genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021: 001945. [陈远志. 褐飞虱铁蛋白基因的功能分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2021: 001945.]

FUNCTIONAL VERIFICATION OF GENES RELATED TO HELMET DEVELOPMENT IN *DAPHNIA GALEATA*: BASED ON RNA INTERFERENCE AND MORPHOLOGICAL OBSERVATION ANALYSIS

ZHU Hao, DENG Dao-Gui, JIN Qi-De, YIN Yi-Hui, HAN Ling-Feng, WANG Zi-Xin, LIU Jia-Hong and FU Lin-Ran
(School of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China)

Abstract: In order to explore the molecular mechanism of helmet development in *Daphnia galeata*, this study investigated the expression of two genes related to helmet development (*DgTrypsin* and *DgFerritin*) and changes of helmet morphology in *D. galeata* under RNA interference. The results showed that at a 2% concentration of *E. coli*, compared with the *EGFP* group, the *DgTrypsin*-interference group exhibited significant reductions in helmet length, relative helmet length, and the ratio of helmet length to head width, accompanied by a 27.45% decrease in *DgTrypsin* expression. However, no significant morphological or gene expression changes were observed in the *DgFerritin*-interference group at this concentration. When the concentration of *E. coli* was increased to 5%, both the *DgTrypsin* and *DgFerritin* groups showed significant decreases in all three helmet morphology metrics, along with respective gene expression reductions of 55.96% and 40.39%, respectively. These results indicate that higher levels of RNA interference have a stronger inhibitory effect on the morphological changes and expression levels of the target genes. The findings demonstrate that *DgTrypsin* and *DgFerritin* genes are involved in the development of *D. galeata* helmet providing a valuable reference for further exploration of molecular mechanisms underlying the morphogenesis in *Daphnia*.

Key words: *DgTrypsin* genes; *DgFerritin* genes; Helmet; *Daphnia galeata*; RNA interference