

DOI: 10.12264/JFSC2021-0024

海湾扇贝 *Dmrt1* 基因分子特征及功能分析

曹为安¹, 宁军号², 卢霞², 陈敏², 刘博¹, 王春德^{1,2}

1. 青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266109;

2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

摘要: 利用 PCR 技术和生物信息学方法获得了海湾扇贝(*Argopecten irradians irradians*) *Dmrt1* 基因(*AiDmrt1*)的 cDNA 序列。采用实时定量 PCR 技术确定 *AiDmrt1* 在不同组织、性腺发育阶段及胚胎和幼虫发育阶段的表达模式, 并结合 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术敲降 *AiDmrt1* 表达后检测了精巢中性腺发育相关基因的表达特征。结果显示, *AiDmrt1* 开放阅读框长度为 918 bp, 编码 305 个氨基酸, 其编码蛋白具有保守的 DM 结构域。*AiDmrt1* 的 mRNA 在精巢中特异性表达, 在精巢发育至生长期阶段表达水平最高。*AiDmrt1* 在囊胚期前表达量无显著差异, 但在原肠期表达水平极显著升高($P<0.01$)。敲降 *AiDmrt1* 表达后, 精巢发育相关基因 *Sox7*、*Sox11* 和 *Fem-1* 显著或极显著上调表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而 *Dmrt4* 的表达显著下调($P<0.05$); 卵巢发育相关基因 *FoxL2*、*Wnt4*、 β -catenin、*GATA-1* 和 *GATA-3* 均显著或极显著上调表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。研究结果表明, *AiDmrt1* 是海湾扇贝精巢特异性表达基因, 参与调控海湾扇贝性腺发育与分化。

关键词: 海湾扇贝; *Dmrt1*; 分子特征; 表达分析; RNA 干扰

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2021)11–1385–11

有性生殖是多细胞动物中普遍存在的生物过程, 性别决定、性别分化及其调控机制一直是性生殖研究的热点和难点。性别决定是指性别在遗传或环境因素调控下形成的过程, 而性别分化则是指未分化的性腺转化为卵巢和精巢的过程^[1]。因此, 对于雌雄异体的动物来说, 性发育可以看作由一个介导性分化的基因表达启动、最终建立性别间表型差异的复杂遗传网络^[2]。在模式生物中的研究已揭示了一些性别决定主基因及调控性别分化的复杂通路^[3–5]。但截至目前, 双壳贝类是否存在性染色体及性别是由一个主基因控制还是多个基因控制仍无明确定论。

双壳贝类在进化过程中发展了不同的繁殖策略, 即它们大多数为雌雄异体, 但有些贝类终生雌雄同体, 如海湾扇贝(*Argopecten irradians irra-*

dians), 有些贝类可发生性逆转, 如太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[6]。此外, 许多雌雄异体的双壳贝类的性别分化不稳定, 如合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)和华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*), 通常出现雌雄同体或性逆转现象^[7–8]。这表明双壳贝类是研究性别决定/分化和生殖调控的优良动物模型。近年来, 人们在雌雄异体型贝类中发掘了一些与模式生物同源的性别相关基因, 如雄性性别决定相关基因 *Dmrt1* (double-sex and mab-3-related transcription factor 1)、*SoxE* (sry-box E)、*SoxH* 和 *Dsx* (doublesex)等^[9–11], 以及雌性性别决定相关基因 β -catenin、*FoxL2* (forkhead box transcription factor)和 *FoxL2os* 等^[12–15]。然而, 性别相关基因在雌雄同体型贝类中的研究鲜有报道。

Dmrt 与果蝇(*Drosophila melanogaste*) *Dsx*

收稿日期: 2021-01-14; 修订日期: 2021-03-11.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972791, 3197210450); 烟台市科技计划项目(2019LJRC141).

作者简介: 曹为安(1996–), 男, 硕士研究生, 研究方向为贝类遗传育种. E-mail: weianc163@163.com

通信作者: 王春德, 教授, 研究方向为贝类遗传育种. E-mail: chundewang2007@163.com

宁军号, 助理研究员, 研究方向为贝类遗传育种. E-mail: jhning@yic.ac.cn

基因和线虫 (*Caenorhabditis elegans*) *Mab-3* (maleabnormal-3) 基因同源^[16-17], 该基因家族成员均含有保守的锌指 DNA 结合结构域(doublesex and mab-3, DM domain)。其中, *Dmrt1* 在进化过程中表现出高度保守性^[18], 且已证明 *Dmrt1* 处于性别调控通路的上游, 并作为转录因子在雄性性腺分化、多种组织和器官形成及功能维持方面发挥重要调控作用^[19-22]。然而, *Dmrt* 基因在贝类中的研究相对滞后, 主要工作集中在分子鉴定、表达分析及组织定位^[23-27]。考虑到性控育种在经济贝类种质创新中不可或缺的作用, 贝类性别决定相关基因的研究亟待深入。

海湾扇贝隶属瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、珍珠贝目 (Pterioida)、扇贝科 (Pectinidae), 是我国 1982 年从美国大西洋沿岸引进的第一个 *Argopecten* 属扇贝^[28], 由于其生长快, 养殖周期短, 深受养殖业户的欢迎, 并由此引发了我国水产养殖业的又一个发展高潮, 成为我国北方沿海主要扇贝养殖种类^[29]。目前, 有关雌雄同体型扇贝性腺分化及其调控机制的研究甚少。本研究以雌雄同体型的海湾扇贝为研究对象, 分析了海湾扇贝 *Dmrt1* 基因的序列特征及该基因在不同组织、性腺发育阶段及胚胎和幼虫发育阶段的表达特征, 利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术敲降 *Dmrt1* 基因表达后, 检测了海湾扇贝精巢中其他性腺发育相关基因表达变化, 旨在为研究雌雄同体型扇贝性腺分化的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与样品采集

2019 年 3 月, 海湾扇贝种贝在莱州养殖场进行群体诱导催产与受精, 受精后在不同发育阶段 (受精卵、2~4 细胞、囊胚、原肠胚、D 型幼虫和眼点幼虫) 取样, 样品液氮速冻后 -80 °C 保存待用。附着后的稚贝经池塘中间培育后, 在烟台市东口海区进行筏式养殖。2019 年 7—12 月, 每两周取海湾扇贝性腺样品 1 次, 海湾扇贝运回实验室后暂养 24 h 取样。其中, 性腺的卵巢和精巢部分液氮速冻后 -80 °C 保存待用; 同时, 性腺的中间部分于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 经梯度乙醇

(70%, 80%, 90%, 95%, 100%) 脱水, 于二甲苯透明后进行石蜡包埋。性腺组织切片厚度为 5 μm, 二甲苯中脱蜡后经梯度乙醇 (100%, 95%, 80%, 70%) 复水, 性腺切片经苏木精-伊红染色、二甲苯透明、中性树胶封片后显微镜拍照, 用于判断海湾扇贝性腺发育时期。此外, 选取活力好的成体海湾扇贝解剖取其卵巢、精巢、外套膜、鳃、肝胰腺、闭壳肌等组织, 液氮速冻后于 -80 °C 保存。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 分别提取每个实验样品的总 RNA, 加入无 RNA 酶的 DNA 酶 I (TaKaRa, 中国) 清除基因组 DNA, 利用 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的浓度和完整性。随后, 使用 PrimeScript™ 反转录试剂盒 (TaKaRa, 中国) 将总 RNA 反转录为 cDNA, -20 °C 保存待用。

1.3 海湾扇贝 *Dmrt1* 基因 cDNA 序列扩增与拼接

分析海湾扇贝性腺转录组获得 1 条 unigene, 其与欧洲大扇贝 (*Pecten maximus*) *Dmrt1* 基因序列相似度高达 78.38%, 命名为 *AiDmrt1*。设计基因特异性引物 *Dmrt1*-F 和 *Dmrt1*-R (表 1), 用于扩增中间的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 片段。PCR 反应体系终体积 25 μL, 包括 2.5 μL 10× PCR Buffer、2.0 μL dNTP Mix、1.0 μL cDNA 模板、0.5 μL 正反向引物 (10 μmol/L)、18.3 μL DEPC-H₂O 和 0.2 μL Taq 聚合酶 (TaKaRa, 中国)。反应程序为: 94 °C 预变性 2 min, 35 个循环 (94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s), 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 目的条带切胶纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 质粒连接。随后, 将融合质粒转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 采用菌落 PCR 扩增筛选阳性克隆并送生工 (上海) 股份有限公司测序。将正确的测序结果与海湾扇贝基因组、性腺转录组数据进行比对, 最终拼接出 *AiDmrt1* 基因的 cDNA 序列。

1.4 生物信息学分析

利用 NCBI 数据库中 BLAST 模块 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行序列比对; ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在线预测基因的开放阅读框和氨基酸序列; SMART

程序(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测 *AiDmrt1* 基因的功能位点和结构域; 使用 DNAMAN 8.0 软件的 ClustalW 程序对 *Dmrt1* 蛋白进行多序列比对; 利用 MEGA 7.0 软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 建树利用泊松模型, bootstrap 值设定为 1000。

1.5 实时荧光定量 PCR

利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 *AiDmrt1* 基因在海湾扇贝不同组织、胚胎发育阶段以及性腺发育阶段的表达

模式, 实验每组设置 4 个重复。qRT-PCR 分析所用的基因特异性引物见表 1, 延伸因子 *ef-1a* 作为内参基因。反应在 ABI QuantStudio™ 5 荧光定量 PCR 仪中进行, SYBR green II 作为荧光染料。反应体系终体积 20 μL, 包括 10 μL 2×SYBR Premix Ex Taq, 0.4 μL 50×ROX Reference Dye, 4 μL 稀释的 cDNA 模板, 0.4 μL 正反向引物 (10 μmol/L)以及 4.8 μL ddH₂O。qRT-PCR 反应程序为: 95 °C, 30 s; 40 个循环(95 °C, 5 s; 60 °C, 35 s)。利用 2^{-ΔΔC_T}方法^[30]计算基因的相对表达量。

表 1 本研究使用的引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in this study

基因 ID gene ID	基因名称 gene name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	扩增片段长度/bp fragment length
Cluster-8657.42971	<i>Dmrt1</i>	PCR-F: ATGTCTACGAAGAAAAGAAACAAAGCC	918
		PCR-R: TCACTGGGTGGGGTAGCTC	
		qRT-PCR-F: GCCGGGGATATGTGTGTCTC	
		qRT-PCR-R: TTATAGGGCGTCCTCGGGTA	
Cluster-8657.4824	<i>Dmrt4</i>	qRT-PCR-F: CTGAAGTCAGCATTTTCCCGATC	106
		qRT-PCR-R: CAGGTGGATAGGGCATGGCTAGTAG	
Cluster-8657.22125	<i>Sox7</i>	qRT-PCR-F: AGAACTCACAAAGCCACAA	106
		qRT-PCR-R: GATGAAGACGAGGAAGACT	
Cluster-8657.27993	<i>Sox11</i>	qRT-PCR-F: TGCTATGTCAACCTCCAG	102
		qRT-PCR-R: ATGTCCAACCACTCATTCT	
Cluster-8657.42818	<i>Wnt4</i>	qRT-PCR-F: ACCAAGGATATGAAAAAGCCAACGA	132
		qRT-PCR-R: GCCGTAACGTGCCTTCTTGCACTG	
Cluster-8657.19471	<i>GATA-1</i>	qRT-PCR-F: TCAAGTAGGCGACATAGTT	139
		qRT-PCR-R: CTTTGTGATGGCAGTAGC	
Contig1220.9	<i>GATA-3</i>	qRT-PCR-F: CTCGGAGGTGGATTCAATA	123
		qRT-PCR-R: TGTCGTCGTAGATAAGTTCA	
Cluster-8657.29825	<i>Vg</i>	qRT-PCR-F: ATTCAAGGCCACTGCGAAAC	120
		qRT-PCR-R: TGTTGCCTTGTGGGATCAAGA	
Cluster-8657.17748	<i>β-catenin</i>	qRT-PCR-F: AGGACATTACCGAACCAGCG	101
		qRT-PCR-R: TAGACCGTAGTGGAGACGCA	
Cluster-8306.81811	<i>Fem-1</i>	qRT-PCR-F: GAAATTCGAGCATTGGTGGCAG	150
		qRT-PCR-R: GCGCTGGTAGTGAGAAGAACGAG	
Cluster-8657.14582	<i>FoxL2</i>	qRT-PCR-F: TGAACGCAACAAGAAAGGATGGC	164
		qRT-PCR-R: GTCGGCAAAAAGGGGTTTAGGAA	
Cluster-8657.28347	<i>ef-1a</i>	qRT-PCR-F: CCTTTGCCCCATCTCAACTGTC	144
		qRT-PCR-R: CAGCAACGTTTCTCTCTTCAATTC	

1.6 RNA 干扰分析

实验用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)利用 T7 启动子体外转录试剂盒(TaKaRa, 日本)按照其说明书进行合成和纯化。 *AiDmrt1*-siRNA 序列(5'-GGCAACCUUGUUAUCGAUA-3')合成的 siRNA 用来沉默 *AiDmrt1* 基因的表达。将

上述 siRNA 随机打乱顺序获得阴性对照 *AiDmrt1*-random-siRNA 序列 (5'-AGUGUCAACUGUAU-CCAUG-3')。合成的 siRNAs 纯化后溶于 siRNA 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5), 利用 1.0%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)检测 siRNA 的片段完整

性和浓度。

RNAi 实验具体操作如下: 利用注射器将 15 μL *AiDmrt1*-siRNA (30 μg)或 *AiDmrt1*-random-siRNA (30 μg)注入海湾扇贝(24.59 $\text{g}\pm 5.08$ g)围心腔中; 在第一次注射后的 24 h 和 48 h, 以同样方法再次给海湾扇贝注射 30 μg 的 *AiDmrt1*-siRNA 或 *AiDmrt1*-random-siRNA。同时, 给海湾扇贝注射相同体积的 PBS 作为阳性对照。在第 3 次注射后的 24 h、48 h 和 72 h, 每个处理组随机解剖 5 只海湾扇贝取卵巢和精巢, 液氮速冻后 -80°C 保存待用。利用 qRT-PCR 检测 *AiDmrt1* 基因在实验海湾扇贝卵巢和精巢中的表达, 用于分析 siRNA 的干扰效率。RNAi 实验的每个处理组设 4 个生物学重复。

1.7 敲降 *AiDmrt1* 基因表达后其他性别相关基因的表达模式

敲降 *AiDmrt1* 基因的表达后, 利用 qRT-PCR 检测了 10 个性腺发育相关基因在海湾扇贝性腺中的表达模式, 这些基因包括精巢发育相关基因 *Dmrt4*、*Sox7*、*Sox11* 和 *Fem-1*(Ferminazatione-1), 以及卵巢发育相关基因 *Wnt4* (Wingless-type MMTV integration site family)、*GATA-1* (GATA zinc finger

domain-containing protein 1)、*GATA-3*、*FoxL2*、 β -catenin 和 *Vg* (Vitellogenin)。用于 qRT-PCR 分析的基因特异性引物见表 1, 延伸因子 *ef-1 α* 作为内参基因。

1.8 统计分析

利用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行统计学分析, 数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示, 采用单因素方差(one-way ANOVA)和 Duncan's 法分析数据间的差异显著性, $P<0.05$ (*)和 $P<0.01$ (**)分别表示数据间存在显著和极显著差异。

2 结果与分析

2.1 海湾扇贝 *AiDmrt1* 的序列特征

生物信息学分析结果如图 1 所示, 海湾扇贝 *Dmrt1* 基因的 mRNA 由 3 个外显子组成, 长度分别为 259 bp、212 bp 和 463 bp。*AiDmrt1* 的 cDNA 序列包含一段 132 bp 的 5'非编码区(untranslated region, UTR), 一段 230 bp 的 3' UTR, 以及一段长度为 918 bp 的 ORF, 编码 305 个氨基酸。结构域预测结果显示, *AiDmrt1* 的 DM 结构域为第 17~70 个氨基酸。

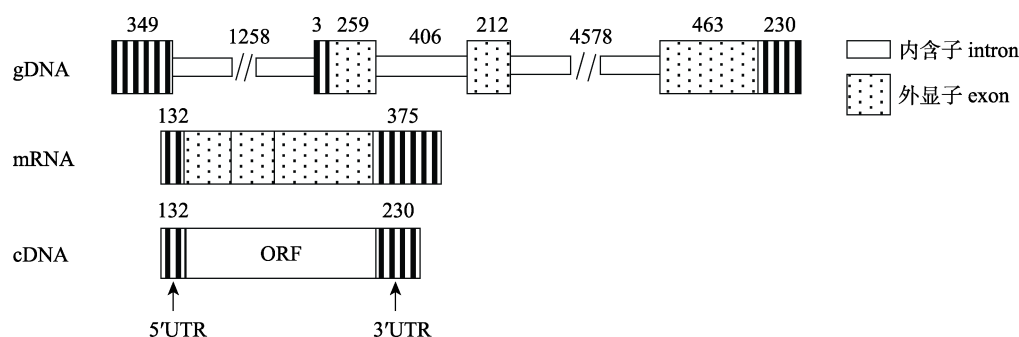


图 1 海湾扇贝 *Dmrt1* 基因结构框架图

gDNA、mRNA 和 cDNA 中各元件上的数字代表核苷酸个数(bp).

Fig. 1 Schematic structures of *Dmrt1* in *Argopecten irradians irradians*

The numbers on different elements in gDNA, mRNA and cDNA represent the nucleotide number (bp).

将海湾扇贝 DM 结构域与已报道的其他物种 DM 结构域进行多序列比对, 结果如图 2 所示, 海湾扇贝 DM 结构域与栉孔扇贝和虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*)的 DM 结构域同源性最高, 均达到 98%。此外, 海湾扇贝与斑马鱼 (*Danio rerio*)、中华鳖 (*Trionyx sinensis*)、原鸡 (*Gallus*

gallus)和小鼠 (*Mus musculus*)的 DM 结构域的同源性均为 58%, 但与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) DM 结构域的同源性较低, 仅为 42%。

利用不同动物门 18 个 *Dmrt1* 的蛋白序列构建 NJ 进化树, 如图 3 所示, 进化树的拓扑结构明显分为 2 个大分支。海湾扇贝 *Dmrt1* 首先与紫扇贝

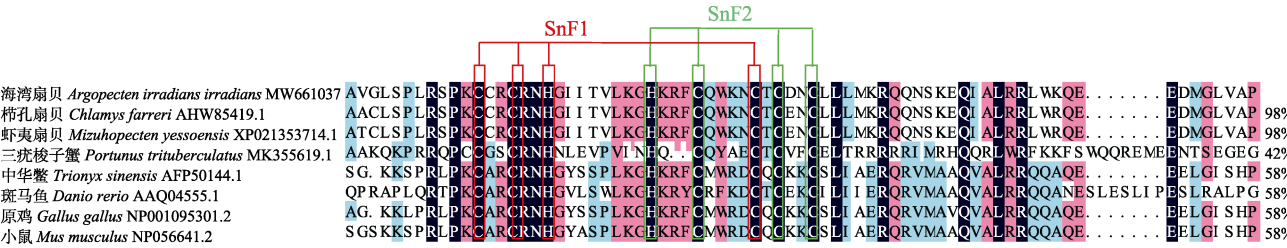


图 2 不同物种 *Dmrt1* 中 DM 结构域的多序列比对
预测的锌指结构以红色框(SnF1)和绿色框(SnF2)表示。

Fig. 2 Multiple sequence alignment of the DM domain in *Dmrt1* from different species
The predicted zinc finger domains are shown in red (SnF1) and green (SnF2) boxes.

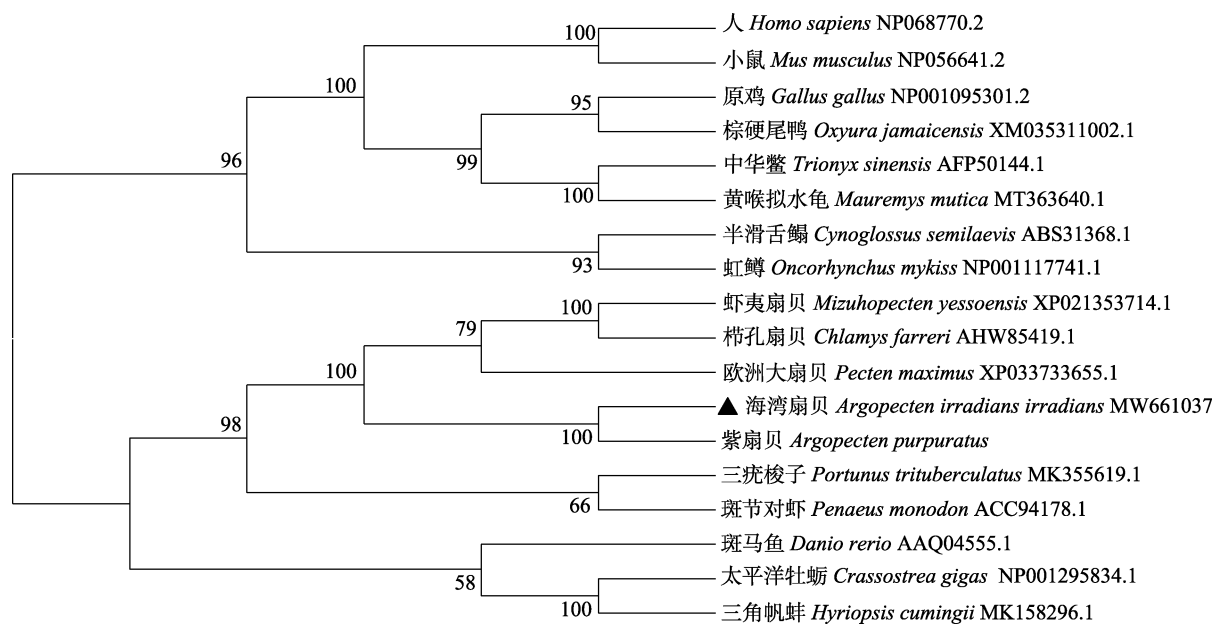


图 3 不同物种 *Dmrt1* 蛋白的系统进化分析

利用 MEGA 7.0 软件构建 NJ 进化树, bootstrap 值设为 1000, 代表进化关系远近的数值在树枝上表示,
海湾扇贝 *AiDmrt1* 以黑三角标注。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Dmrt1* proteins from different species
Neighbor-joining tree was constructed with MEGA 7.0 software. A bootstrap analysis of 1000 replications was carried out on the tree; the values are shown at each branch of the tree. *AiDmrt1* from *Argopecten irradians irradians* is marked with the black triangle.

聚在一起, *Argopecten* 属扇贝 *Dmrt1* 明显聚为一支, 然后再与其他海洋无脊椎动物的 *Dmrt1* 聚类。哺乳动物、鸟类、爬行动物和鱼类的 *Dmrt1* 聚为脊椎动物的大分支。

2.2 海湾扇贝 *AiDmrt1* 基因组织特异性分布

组织特异性表达结果如图 4 所示, *AiDmrt1* 基因在海湾扇贝精巢中特异性高表达($P<0.01$), 在其他检测的组织(卵巢、外套膜、鳃、肝胰腺和闭壳肌)中表达量极低, 可认为不表达。

2.3 海湾扇贝 *AiDmrt1* 在不同发育时期性腺中的表达模式

AiDmrt1 在海湾扇贝不同发育时期性腺中的表达模式如图 5 所示, *AiDmrt1* 在精巢中的表达量极显著高于相同发育时期的卵巢($P<0.01$)。此外, *AiDmrt1* 在精巢不同发育时期的表达量均存在显著差异($P<0.05$), 表现为在精巢的生长期表达量最高, 在精巢的成熟期、休止期和增殖期依次递减。

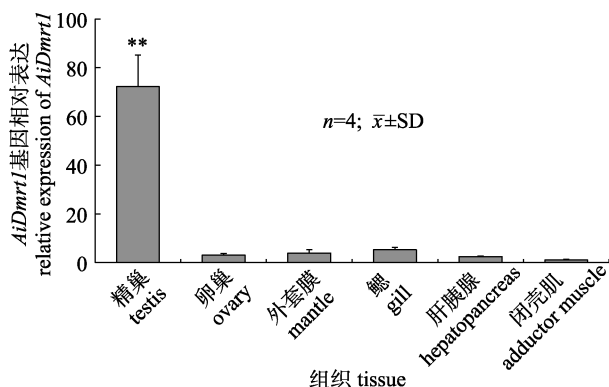


图 4 海湾扇贝 *AiDmrt1* 基因的组织特异性表达

代表数据间存在显著差异($P<0.05$, ** $P<0.01$).

Fig. 4 Tissue specific expression of *AiDmrt1* in *Argopecten irradians irradians*

The statistically differences are represented with asterisk (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

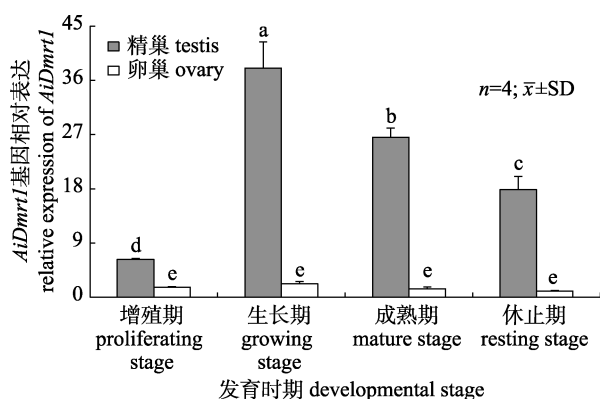


图 5 海湾扇贝 *AiDmrt1* 基因在不同发育时期性腺中的表达模式

不同字母表示不同数据间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 5 The expression patterns of *AiDmrt1* in *Argopecten irradians irradians* gonads at different developmental stages
Different letters indicate that there are significant differences between different data ($P<0.05$).

2.4 海湾扇贝 *AiDmrt1* 在胚胎和幼虫不同发育时期的表达模式

将 *AiDmrt1* 在受精卵中的表达水平设为对照进行数据分析, 结果如图 6 所示, *AiDmrt1* 在囊胚期之前恒定表达, 其表达量在原肠期显著升高 ($P<0.05$) 并达峰值, 随后 *AiDmrt1* 的表达量逐渐下降并在眼点幼虫期恢复至在受精卵中的表达水平。

2.5 海湾扇贝 *AiDmrt1*-siRNA 的干扰效率

合成的 siRNA 对海湾扇贝精巢中 *AiDmrt1* 基因的干扰效率见图 7。与对照组相比, 注射 *AiDmrt1*-siRNA 干扰 48 h 和 72 h 可极显著抑制

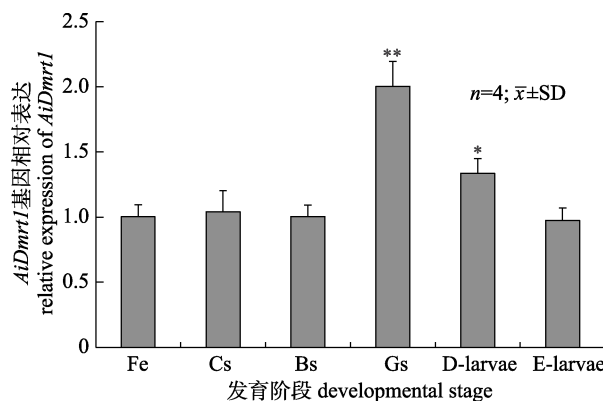


图 6 海湾扇贝 *AiDmrt1* 在胚胎和幼虫不同发育时期中的表达模式

Bs: 囊胚期, Cs: 卵裂期, D-larvae: D 型幼虫,

E-larvae: 眼点幼虫, Fe: 受精卵, Gs: 原肠期;

代表数据间存在显著差异($P<0.05$, ** $P<0.01$).

Fig. 6 The expression patterns of *AiDmrt1* in *Argopecten irradians irradians* during different embryonic and larval development stages

Bs: blastula stage, Cs: cleavage stage, D-larvae: D-larvae stage, E-larvae: eyespot-larvae stage, Fe: fertilized eggs, Gs: gastrula stage. The statistically differences are represented with asterisk (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

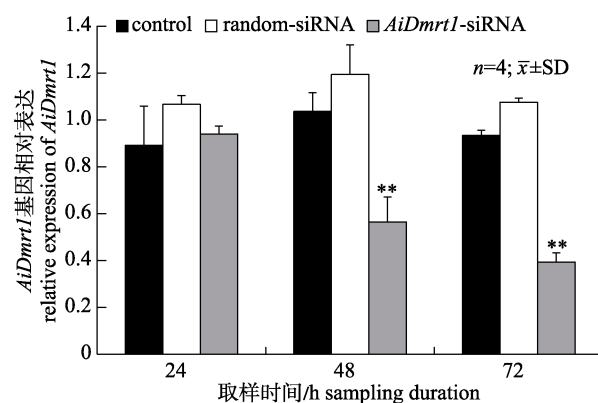


图 7 siRNA 对海湾扇贝精巢中 *AiDmrt1* 的干扰效率
Control 代表注射 PBS 的阳性对照组, random-siRNA 代表注射 random-siRNA 的阴性对照组, *AiDmrt1*-siRNA 为实验组。*代表数据间存在显著差异 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Fig. 7 The silencing efficiency of siRNA on *AiDmrt1* in testis of *Argopecten irradians irradians*

Control represents positive control group after PBS injection, Random-siRNA represents negative control group after random-siRNA injection and *AiDmrt1*-siRNA is injection group. The statistically differences were represented with asterisk (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

AiDmrt1 基因的表达 ($P<0.01$), 干扰效率分别为 43.6% 和 60.7%。因此, 选择注射 *AiDmrt1*-siRNA

干扰 72 h 作为敲降 *AiDmrt1* 基因的最适时间, 用于进行后续实验分析。

2.6 敲降 *AiDmrt1* 表达后性腺分化相关基因的表达

敲降 *AiDmrt1* 表达后, 海湾扇贝精巢中性腺发育相关基因的表达模式如图 8 所示, 精巢发育相关基因 *Sox7*、*Sox11* 和 *Fem-1* 的表达显著或极显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而 *Dmrt4* 的表达受到显著抑制($P<0.05$); 卵巢发育相关基因 *GATA-3*、*GATA-1*、*Wnt4*、*FoxL2* 和 β -catenin 表达均显著或极显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$), *Vg* 的表达虽无显著差异但呈现上调表达的趋势。

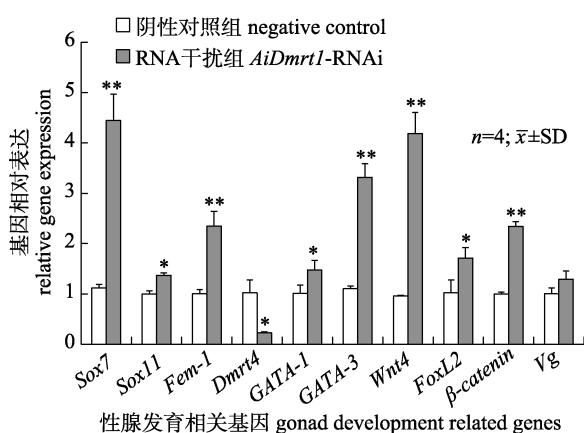


图 8 敲降 *AiDmrt1* 表达后精巢中性腺发育相关基因的表达分析

*代表数据间存在显著差异($*P<0.05$; $**P<0.01$).

Fig. 8 Expression analysis of gonad development-related genes in the *AiDmrt1*-knockdown testis
The statistically differences are represented with asterisk ($*P<0.05$, $**P<0.01$).

3 讨论

雌雄异体的贝类中经常发现有雌雄同体或性逆转的个体, 但雌雄同体的贝中尚未发现有雌雄异体的个体, 二者性别决定或性腺分化的调控机制尚待深入研究。与雌雄异体的贝类相比, 雌雄同体的贝类性别或性腺分化相关基因的研究起步晚、基础薄弱。本研究分析了雌雄同体型海湾扇贝 *AiDmrt1* 基因的序列特征, 检测到 *AiDmrt1* 在精巢中特异性表达, 具有明显的性别二态性表达特征, 并在精巢发育至生长期(精子发生期)时表达水平显著升高。*AiDmrt1* 在海湾扇贝胚胎和幼

虫发育各个阶段均有表达, 并在原肠胚时期表达量达到峰值。此外, 利用 RNAi 技术敲降 *AiDmrt1* 的表达水平可显著影响精巢发育相关基因的表达, 且卵巢发育相关基因的表达量显著升高, 初步确定 *AiDmrt1* 参与调控海湾扇贝性腺发育和分化。

海湾扇贝 *AiDmrt1* 的转录本由 3 个外显子拼接而成, 在海湾扇贝精巢转录组中仅发现 1 条 *Dmrt1* 转录本, 未发生可变剪接现象, 这与栉孔扇贝 *Dmrt1* 的序列特征极为一致^[24]。然而, 鱼类的 *Dmrt1* 基因往往存在可变剪接现象, 可产生多条 *Dmrt1* 转录本^[31-32]。推测的 *AiDmrt1* 蛋白有一段含 54 个氨基酸序列的 DM 结构域, 与栉孔扇贝和虾夷扇贝 *Dmrt1* 基因 DM 结构域的同源性高达 98%, 且在其 DM 结构域内均包含一段保守的“C₂H₂C₄”锌指结构。研究认为 DM 结构域中保守的锌指蛋白与受控基因的启动子序列结合以调节下游目的基因的表达, 继而调控精巢的发育^[33]。此外, *AiDmrt1* 与已报道的 *Argopecten* 属扇贝 *Dmrt1* 明显聚为一支, 说明 *AiDmrt1* 属于贝类 *Dmrt1* 基因家族成员。

在大多数雌雄异体的鱼类中, *Dmrt1* 基因主要在精巢中特异性表达^[32,34-35]。在雌雄同体的鱼类中, 卵巢先成熟的鱼如金头鲷(*Sparus auratus*)^[36]由卵巢转化为精巢过程中, *Dmrt1* 基因表达水平明显升高, 而精巢先成熟的鱼如点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[37]由精巢转化为卵巢过程中, *Dmrt1* 基因表达水平明显下降。本研究中, *AiDmrt1* 在精巢中特异性表达, 在卵巢、鳃、外套膜、肝胰腺和闭壳肌中微量表达, 表明 *AiDmrt1* 主要在海湾扇贝精巢中合成并发挥作用, 而其他组织中分布的 *AiDmrt1* 可能是由血窦渗透而来。栉孔扇贝(存在一定比例的雌雄同体) *CfDmrt1* 的组织分布特征与本研究结果相似, 半定量结果显示 *CfDmrt1* 在精巢中特异表达, qRT-PCR 结果表明 *CfDmrt1* 在卵巢中微量表达^[24]。雌雄异体的耳鲍(*Haliotis asinina*) *HaDmrt1* 也在精巢中特异性表达^[27]。但三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*) *HcDmrt1* 在成体组织中广泛分布, 且 *HcDmrt1* 在雄性的性腺、外套膜和斧足中的表达水平显著高于雌性^[23]。综上, *Dmrt1* 在雌雄异体和雌雄同体动物中的组

织分布特征存在一定的差异,但总体表现为精巢特异性表达的特点,表明 *Dmrt1* 基因在不同物种性别决定和精巢分化中的作用是非常保守的。

大量研究表明,很多动物 *Dmrt1* 基因表达具有性别二态性,即在动物精巢中特异性表达或在精巢中的表达水平显著高于卵巢^[38-41]。本研究中, *AiDmrt1* 在相同发育时期精巢中的表达量远高于卵巢,具有明显的性别二态性特征。此外, *Dmrt1* 基因性别二态表达性特征在栉孔扇贝和虾夷扇贝中也得以确证^[12,24],表明不同物种中 *Dmrt1* 表达的性别二态性特征具有很高的保守性。在海湾扇贝精巢发育过程中, *AiDmrt1* 的表达量呈先升高后下降的趋势,并在生长期达到峰值。与本研究结果类似,栉孔扇贝 *CfDmrt1* 在精巢发育至生长期时表达水平最高^[24]。双壳贝类精巢生长期(II期)滤泡壁上精原细胞快速分化并分裂增殖,此时精巢滤泡中精原细胞和精母细胞大量存在,处于活跃的精子发生期^[42]。 *AiDmrt1* 在海湾扇贝精巢生长期特异性高表达提示, *AiDmrt1* 参与调控精巢发育和精子发生过程。类似的研究结果在鱼类中也得到了证实^[38,43]。

合子基因组激活前,母源基因产物(mRNAs和蛋白质)几乎调控动物早期胚胎发育的所有方面^[44]。随着胚胎的发育,母源基因产物逐渐降解而合子基因转录激活,即母源合子转化(maternal-to-zygotic transition)^[45]。本研究中, *AiDmrt1* 的表达量在囊胚期之前恒定表达,而在原肠期显著升高,一方面说明海湾扇贝的合子基因组在原肠期已经激活,另一方面暗示海湾扇贝的原始生殖细胞可能最早出现在原肠期。因为早有研究表明,硬骨鱼的原始生殖细胞(primordial germ cells)最早发现于原肠胚时期^[46-47]。

Sox (sry-type HMG box)是一类包含 HMG-box 保守基序的转录因子,在脊椎动物精巢决定和雄性育性维持中发挥重要作用^[48]。 *Fem-1* 基因不但参与调控雄性性别决定,而且对雄性和雌雄同体动物雄性生殖细胞的产生具有调控作用^[49]。转录因子 GATA 家族成员具有保守的锌指结构,除参与造血细胞的发育和分化外,与动物卵巢发育相关雌激素的合成有关^[50]。 *Wnt4* 是调节 *WNT*

/β-catenin 信号通路的关键分子,在哺乳动物卵巢发育和分化过程中发挥重要作用^[51]。为进一步研究 *AiDmrt1* 在海湾扇贝性腺发育中的调控作用,利用 RNAi 技术敲降 *AiDmrt1* 的表达水平显著影响海湾扇贝精巢发育相关基因(*Sox7*、*Sox11*、*Fem-1* 和 *Dmrt4*)的表达,而卵巢发育相关基因(*GATA-3*、*GATA-1*、*Wnt4*、*FoxL2*、*β-catenin*)表达均显著上调。与本研究结果相似,在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) *Dmrt1* 基因缺陷的精巢中, *FoxL2* 等卵巢发育相关基因的表达上调^[52]。此外, *Dmrt1* 基因突变可导致青鳉(*Oryzias latipes*) 精巢向卵巢型分化^[53]。综上,本研究可以确定 *AiDmrt1* 基因在海湾扇贝性腺的发育与分化过程中发挥作用。

参考文献:

- [1] Penman D J, Piferrer F. Fish gonadogenesis. Part I: Genetic and environmental mechanisms of sex determination[J]. Reviews in Fisheries Science, 2008, 16(sup1): 16-34.
- [2] Heule C, Göppert C, Salzburger W, et al. Genetics and timing of sex determination in the East African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*[J]. BMC Genetics, 2014, 15: 140.
- [3] Goodwin E B, Ellis R E. Turning clustering loops: Sex determination in *Caenorhabditis elegans*[J]. Current Biology, 2002, 12(3): R111-R120.
- [4] Rideout E J, Dornan A J, Neville M C, et al. Control of sexual differentiation and behavior by the doublesex gene in *Drosophila melanogaster*[J]. Nature Neuroscience, 2010, 13(4): 458-466.
- [5] Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *Sox9* enhancer[J]. Nature, 2008, 453(7197): 930-934.
- [6] Li Y P, Zhang L L, Sun Y, et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of ovary and testis identifies potential key sex-related genes and pathways in scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. Marine Biotechnology, 2016, 18(4): 453-465.
- [7] Matsumoto T, Masaoka T, Fujiwara A, et al. Reproduction-related genes in the pearl oyster genome[J]. Zoological Science, 2013, 30(10): 826-850.
- [8] Shi Y, Liu W G, He M X. Proteome and transcriptome analysis of ovary, intersex gonads, and testis reveals potential key sex reversal/differentiation genes and mechanism in scallop *Chlamys nobilis*[J]. Marine Biotechnology, 2018, 20(2): 220-245.

- [9] Shi Y, Wang Q, He M X. Molecular identification of *dmrt2* and *dmrt5* and effect of sex steroids on their expressions in *Chlamys nobilis*[J]. Aquaculture, 2014, 426-427: 21-30.
- [10] Zhang N, Xu F, Guo X M. Genomic analysis of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) reveals possible conservation of vertebrate sex determination in a mollusc[J]. G3 Genes Genomes Genetics, 2014, 4(11): 2207-2217.
- [11] Naimi A, Martinez A S, Specq M L, et al. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2009, 152(2): 189-196.
- [12] Li R J, Zhang L L, Li W R, et al. *FOXL2* and *DMRTIL* are Yin and Yang genes for determining timing of sex differentiation in the bivalve mollusk *Patiniopecten yessoensis*[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 1166.
- [13] Liu X L, Zhang Z F, Shao M Y, et al. Sexually dimorphic expression of *foxl2* during gametogenesis in scallop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates[J]. Development Genes and Evolution, 2012, 222(5): 279-286.
- [14] Santerre C, Sourdaire P, Adeline B, et al. *Cg-SoxE* and *Cg-β-catenin*, two new potential actors of the sex-determining pathway in a hermaphrodite lophotrochozoan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 167: 68-76.
- [15] Santerre C, Sourdaire P, Martinez A S. Expression of a natural antisense transcript of *Cg-Foxl2* during the gonadic differentiation of the oyster *Crassostrea gigas*: First demonstration in the gonads of a Lophotrochozoa species[J]. Sexual Development, 2012, 6(4): 210-221.
- [16] Li F J, Fu C P, Luo Y J. Research progress of *Dmrt* genes in hydrobiontes[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(5): 1068-1077. [李法君, 付春鹏, 罗永巨. *Dmrt* 基因在水生生物中的研究进展[J]. 水生生物学报, 2016, 40(5): 1068-1077.]
- [17] Zhu L Y, Wilken J, Phillips N B, et al. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers[J]. Genes & Development, 2000, 14(14): 1750-1764.
- [18] Ren L L, Cheng H H, Guo Y Q, et al. Evolutionary conservation of *Dmrt* gene family in amphibians, reptiles and birds[J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(23): 1992-1994.
- [19] Matson C K, Zarkower D. Sex and the singular DM domain: Insights into sexual regulation, evolution and plasticity[J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13(3): 163-174.
- [20] Herpin A, Scharl M. *Dmrt1* genes at the crossroads: A widespread and central class of sexual development factors in fish[J]. The FEBS Journal, 2011, 278(7): 1010-1019.
- [21] Smith C A, Roeszler K N, Ohnesorg T, et al. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken[J]. Nature, 2009, 461(7261): 267-271.
- [22] Zarkower D. *DMRT* genes in vertebrate gametogenesis[M]//Current Topics in Developmental Biology. Amsterdam: Elsevier, 2013: 327-356.
- [23] Guo P F, Duan S H, Dong S S, et al. Molecular characterization and expression analysis of *Dmrt1* gene in *Hyriopsis cumingii*[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(5): 2033-2041. [郭鹏飞, 段胜华, 董赛赛, 等. 三角帆蚌 *Dmrt1* 基因的分子特征和表达研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(5): 2033-2041.]
- [24] Li X X, Qin Z K, Wei M K, et al. Molecular identification and expression pattern analysis of *Dmrt1* in the scallop *Chlamys farreri*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(11): 1277-1284. [李茜茜, 秦贞奎, 魏茂凯, 等. 栉孔扇贝 *Dmrt1* 的分子鉴定及表达模式分析[J]. 中国水产科学, 2020, 27(11): 1277-1284.]
- [25] Zhou L Q, Yang A G, Wang Q Y, et al. Sequence analysis of DM domain in two *Dmrt* genes of three sex types of *Patiniopecten yessoensis*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(3): 19-25. [周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 虾夷扇贝不同性别类型 2 个 *Dmrt* 基因 DM 结构域分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(3): 19-25.]
- [26] Zhang N, Huang W, Xu F, et al. Expression of two *Dmrt* family genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(3): 717-724. [张娜, 黄雯, 许飞, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)两个 *Dmrt* 家族基因的时空表达[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(3): 717-724.]
- [27] Klinbunga S, Amparyup P, Khamnamtong B, et al. Isolation and characterization of testis-specific *DMRT1* in the tropical abalone (*Haliotis asinina*)[J]. Biochemical Genetics, 2009, 47(1-2): 66-79.
- [28] Zhang F S, He Y C, Liu X S, et al. A report on the introduction, spat-rearing and experimental culture of bay scallop, *Argopecten irradians* Lamarck[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1986, 17(5): 367-374. [张福绥, 何义朝, 刘祥生, 等. 海湾扇贝引种、育苗及试养[J]. 海洋与湖沼, 1986, 17(5): 367-374.]
- [29] Zhang F S, He Y C, Yang H S. Introduction engineering of bay scallop and its comprehensive effects[J]. Engineering Science, 2000, 2(2): 30-35. [张福绥, 何义朝, 杨红生. 海湾扇贝引种工程及其综合效应[J]. 中国工程科学, 2000, 2(2): 30-35.]
- [30] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [31] Cross I, García E, Rodríguez M E, et al. The genomic struc-

- ture of the highly-conserved *dmrt1* gene in *Solea senegalensis* (Kaup, 1868) shows an unexpected intragenic duplication[J]. PLoS ONE, 2020, 15(11): e0241518.
- [32] Raghuveer K, Senthilkumaran B. Identification of multiple *dmrt1*s in catfish: Localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyltestosterone treatment[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2009, 42(5): 437-448.
- [33] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif[J]. Nature, 1990, 346(6281): 240-244.
- [34] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G J, et al. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Developmental Dynamics, 2008, 237(1): 297-306.
- [35] Wang D S, Zhou L Y, Kobayashi T, et al. Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia[J]. Endocrinology, 2010, 151(3): 1331-1340.
- [36] Liarte S, Chaves-Pozo E, García-Alcazar A, et al. Testicular involution prior to sex change in gilthead seabream is characterized by a decrease in *DMRT1* gene expression and by massive leukocyte infiltration[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2007, 5: 20.
- [37] Xia W, Zhou L, Yao B, et al. Differential and spermatogenic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2007, 263(1-2): 156-172.
- [38] Guo Y Q, Cheng H H, Huang X, et al. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 330(3): 950-957.
- [39] Li X Y, Li Z, Zhang X J, et al. Expression characterization of testicular *DMRT1* in both Sertoli cells and spermatogenic cells of polyploid gibel carp[J]. Gene, 2014, 548(1): 119-125.
- [40] Raymond C S, Kettlewell J R, Hirsch B, et al. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development[J]. Developmental Biology, 1999, 215(2): 208-220.
- [41] Shibata K, Takase M, Nakamura M. The *Dmrt1* expression in sex-reversed gonads of amphibians[J]. General and Comparative Endocrinology, 2002, 127(3): 232-241.
- [42] Ning J H, Chang Y Q, Song J, et al. Gonadal development and the reproductive cycle of *Modiolus modiolus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(3): 469-477. [宁军号, 常亚青, 宋坚, 等. 偏顶蛤的性腺发育和生殖周期[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 469-477.]
- [43] Deng S P, Wang J J, Wu T L, et al. cDNA cloning and expression analysis of *Dmrt1* in *Clarias fuscus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(4): 610-617. [邓思平, 王静杰, 吴天利, 等. 胡子鲇 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及其表达分析[J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 610-617.]
- [44] Tadros W, Lipshitz H D. The maternal-to-zygotic transition: A play in two acts[J]. Development, 2009, 136(18): 3033-3042.
- [45] Walser C B, Lipshitz H D. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2011, 21(4): 431-443.
- [46] Liu S J. Studies on the origin and migration of the primordial germ cells and gonad differentiation in *Clarias lazera*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1991, 15(1): 1-7, 97. [刘少军. 革胡子鲇原始生殖细胞的起源、迁移及性腺分化[J]. 水生生物学报, 1991, 15(1): 1-7, 97.]
- [47] Gao S T, Gao L Q, Yue Z X. Studies on the origin and migration of the primordial germ cells and gonad differentiation in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) embryo[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 1998, 44(4): 477-480. [高书堂, 高令秋, 岳朝霞. 泥鳅原始生殖细胞的发生、迁移和性腺分化[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1998, 44(4): 477-480.]
- [48] Jiang T, Hou C C, She Z Y, et al. The *SOX* gene family: Function and regulation in testis determination and male fertility maintenance[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(3): 2187-2194.
- [49] Spence A M, Coulson A, Hodgkin J. The product of *Fem-1*, a nematode sex-determining gene, contains a motif found in cell cycle control proteins and receptors for cell-cell interactions[J]. Cell, 1990, 60(6): 981-990.
- [50] Bennett J, Baumgarten S C, Stocco C. *GATA4* and *GATA6* silencing in ovarian granulosa cells affects levels of mRNAs involved in steroidogenesis, extracellular structure organization, IGF-I activity, and apoptosis[J]. Endocrinology, 2013, 154(12): 4845-4858.
- [51] Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling[J]. Nature, 1999, 397(6718): 405-409.
- [52] Li M H, Yang H H, Li M R, et al. Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs[J]. Endocrinology, 2013, 154(12): 4814-4825.
- [53] Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, et al. *Dmrt1* mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by *Dmy* in the medaka[J]. Chromosome Research, 2012, 20(1): 163-176.

Molecular characterization and functional analyses of *Dmrt1* in the bay scallop *Argopecten irradians irradians*

CAO Wei'an¹, NING Junhao², LU Xia², CHEN Min², LIU Bo¹, WANG Chunde^{1,2}

1. College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China

Abstract: In mammals and birds, sex is mainly determined by master sex-determination genes on sex chromosomes, which are essential genetic switches controlling sex determination and gonadal differentiation. The sex-determination genes, such as *Sry* (Sex-determining region Y), *Dmrt1* (Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1) and *DM-W* (W-linked DM-domain) genes, are highly conserved in higher vertebrates. In lower vertebrates such as teleost fishes, sex determination can be divided into three categories: genetic sex determination, environmental sex determination and combination of the both. Until now, *Dmy/Dmrt1bY* (the DM-domain gene on the Y chromosome), *Sox3^Y* (Sry-related high-mobility group box transcription factor 3 on Y chromosome) and *Gsdf^Y* (gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome) have been identified as Sex-determination genes in fishes. In invertebrates, DM domain-containing genes, such as the *Dsx*, (doublesex) gene first isolated in *Drosophila melanogaster*, which was differentially spliced between males and females, are found to be involved in regulating the differentiation of sex-specific cell types. *Dmrt1* and other DM-domain containing genes seem to be the major sex-determination genes across metazoan animals. Molluscan reproduction has been an interesting issue in biological research owing to the diverse reproduction strategies evolved in this phylum. In bivalve molluscs, most are dioecism, and some are lifelong hermaphroditic (e.g., bay scallop), and yet some are capable of sex reversal (e.g., Pacific oyster). In addition, the sex of many dioecious bivalves, such as *Pinctada fucata* and *Chlamys nobilis*, is not stable and often shows hermaphroditism and sexual reversal. As the importance of sex control in commercial bivalve breeding is concerned, further studies on molecular mechanisms of sex determination and gonad differentiation in molluscs are definitely warranted. To date, there is no clear evidence for the existence of sex chromosomes in bivalves, and whether their sex is controlled by a major gene or multiple genes is still inconclusive. Although some research has been conducted in different bivalves, most have focused on genes homologous to key sex-related genes in model species. For instance, some male-determining genes, including *Dmrt*, *SoxE* (Sry-box E), *SoxH* and *Dsx*, as well as female-determining genes, including β -catenin, *Wnt4* (Wingless-type MMTV integration site family), *FoxL2* (forkhead box transcription factor) and its natural antisense transcript *FoxL2os*, have been reported in some bivalves. Furthermore, genome-wide studies on sex-determining pathways in molluscs are rare due to lack of reference genomes. *Dmrt1* is an evolutionarily conserved gene playing vital roles in sex determination from lower vertebrates to mammals. The cDNA sequences of *Dmrt1* were obtained from *Argopecten irradians irradians* by PCR and bioinformatics methods. The expression patterns of *AiDmrt1* in different tissues and at different gonadal, embryonic and larval developmental stages were determined by quantitative real-time PCR. Furthermore, the expression characteristics of gonad development-related genes were detected in the *AiDmrt1*-knockdown testis combined with RNA interference (RNAi) technique. Results showed that the open reading frame of *AiDmrt1* was 918 bp encoding 305 amino acids, and the deduced amino acid sequence contained a conserved DM domain. The mRNAs of *AiDmrt1* were specifically expressed in testis, reaching a peak value in the testis at growing stage. Compared with fertilized eggs stage, no significant difference in expression levels of *AiDmrt1* was observed before the blastula stage, while the expression levels increased significantly at the gastrula stage. When *AiDmrt1* was knocked down, testis development-related genes (*Sox7* and *Sox11*) were significantly up-regulated while the expression of *Dmrt4* was found to be down-regulated. However, the expression of ovary development-related genes (*FoxL2*, *Wnt4*, β -catenin, *GATA-1* and *GATA-3*) was up-regulated significantly. These findings suggested that *AiDmrt1* was a testis-specific gene in *A. irradians irradians*, which was involved in regulation of gonadal development and differentiation in the bay scallop.

Key words: *Argopecten irradians irradians*; *Dmrt1*; molecular characteristics; expression analysis; RNA interference

Corresponding author: WANG Chunde, E-mail: chundewang2007@163.com;

NING Junhao, E-mail: jhning@yic.ac.cn