



fruitless 在桔小实蝇求偶和交配行为中的作用

陈瑶瑶^{1,2}, 古 枫^{1,2}, 钟国华^{1,2,*}, 易 欣^{1,2,*}

(1. 华南农业大学农学院, 农业农村部华南作物有害生物综合治理重点实验室, 广州 510642;
2. 华南农业大学农学院, 天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642)

摘要:【目的】*fruitless* (*fru*) 是昆虫求偶和交配行为中的关键基因, 但是其在桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 中的具体功能尚不清楚。本研究旨在明确 *fru* 在桔小实蝇求偶交配行为中的作用, 进一步明确 *fru* 的生物学意义。【方法】根据 NCBI 上桔小实蝇 *fru* 的预测序列设计两端引物, 以桔小实蝇羽化 10 d 已交配的成虫头部 cDNA 为模板克隆 *fru* 基因的全长 cDNA, 并对其编码蛋白的结构域进行预测。通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测该基因在桔小实蝇交配前后表达量的变化。待合成 *fru* 基因的 dsRNA 后, 注射到羽化 9 d 后的桔小实蝇雄成虫腹部进行 RNAi, 分别于注射后 48 h 和 72 h 取样, 检测 *fru* 基因的相对表达量; 并于 RNAi 后 72 h 进行求偶交配行为观察, 测定桔小实蝇的交配频率和交配持续时间。【结果】克隆获得桔小实蝇 *fru* 的全长 cDNA, 长 2 865 bp, 编码 954 个氨基酸, 预测蛋白分子量 104.1 kD, 等电点为 6.01。该基因所编码的蛋白具有特殊结构域, 分别为一个 BTB (Broad-complex, Tramtrack and Bric-a-bric) 结构域和两个锌指 (zinc finger) 结构域。RT-qPCR 结果表明, 相比未交配的桔小实蝇成虫, *fru* 基因在雄成虫头部中的表达量在与雌成虫交配后显著上升。相对于空白对照组 (注射 DEPC 水) 和阴性对照组 (注射 dsGFP), 注射 ds*fru* 的 RNAi 处理组的雄性求偶时间延长 (延长了 25 ~ 35 min), 且交配频率下降 (降低了 17% ~ 22%), 说明 *fru* 基因在雄性桔小实蝇的求偶交配行为中发挥着重要作用。【结论】本研究结果为明确 *fru* 在非模式昆虫桔小实蝇求偶交配行为中的功能提供参考, 并为深入研究桔小实蝇的求偶交配行为和绿色防控提供了理论基础。

关键词: 桔小实蝇; *fruitless*; 表达谱; 求偶行为; 交配频率; RNAi

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)08-0924-08

Role of *fruitless* in courtship and mating behaviors in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)

CHEN Yao-Yao^{1,2}, GU Feng^{1,2}, ZHONG Guo-Hua^{1,2,*}, YI Xin^{1,2,*} (1. Key Laboratory of Integrated Pest Management of Crop in South China, Ministry of Agriculture, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Aim】 *fruitless* (*fru*) is the key gene for courtship and mating behaviors in insects, but its specific role in *Bactrocera dorsalis* is still unclear. The aim of this study is to characterize the role of *fru* in courtship and mating behaviors in *B. dorsalis* and to further clarify its biological significance. 【Methods】 Primers were designed based on the *fru* sequence of *B. dorsalis* from NCBI, the full-length cDNA of *fru* gene was cloned from the head of the mated 10-day-old adults of *B. dorsalis*, and the structural domain of

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31701812)

作者简介: 陈瑶瑶, 女, 1991 年 1 月生, 河南安阳人, 硕士研究生, 主要从事昆虫生理毒理研究, E-mail: yaoyao3chen@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: guohuazhong@scau.edu.cn; yixin423@126.com

收稿日期 Received: 2019-12-17; 接受日期 Accepted: 2020-04-22

its encoded protein was predicted. The variations of gene expression levels in *B. dorsalis* adults before and after mating were analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR). The *fru* dsRNA was synthesized, and injected into the abdomen of the 9-day-old adults. The relative expression level of *fru* was examined at 48 and 72 h after injection. At 72 h after injection, the courtship and mating behaviors including the mating frequency and duration were examined. 【Results】 The full-length cDNA of *B. dorsalis fru* obtained by cloning is 2 865 bp in length, encoding 954 amino acids with the predicted molecular weight of 104.1 kD and pI of 6.01. The encoded protein has unique domains including one BTB domain and two zinc finger domains. The RT-qPCR results revealed that the expression level of *fru* in the head of male adults of *B. dorsalis* was significantly higher after mating than before mating. *B. dorsalis* male adults in the RNAi group injected with *dsfru* engaged significantly longer time (25 – 35 min longer) in the courtship behavior and had the mating frequency decreased by 17% – 22% as compared to the male adults in the blank control group (injected with DEPC water) and the negative control group (injected with *dsGFP*), suggesting that *fru* plays important roles in regulating courtship and mating behaviors of male *B. dorsalis*. 【Conclusion】 The results of this study provide a theoretical basis for clarifying the role of *fru* in the non-model insect *B. dorsalis* and further studying courtship and mating behaviors in *B. dorsalis*.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; *fruitless*; expression profile; courtship behavior; mating frequency; RNAi

求偶是指交配前雌雄一方为了获得配偶而尽力展现及动作而使另一方做出选择的整个过程 (Koganezawa *et al.*, 2016)。而与多数昆虫一样,实蝇也是一类具有求偶行为的昆虫,实蝇通过聚集形成求偶场,且雄成虫间相互竞争以吸引雌成虫;接着雌成虫选择具有最佳求偶行为的雄成虫并与之进行交配 (de Aquino and Joachim-Bravo, 2014; Ekanayake *et al.*, 2017)。在实蝇中,求偶行为通常被划分为几个关键阶段:(1)雄成虫保卫其求偶场避免其他雄成虫侵入,并通过嗅觉、视觉和听觉以吸引雌成虫;(2)雄成虫附近的单个雌成虫降落求偶场并爬向雄成虫;(3)雄成虫感受到雌成虫并进行一次或多次交配的尝试 (Robinson and Hooper, 1989)。因此,在昆虫的求偶过程中,雌性和雄性昆虫具有不同的行为表现,被称为性别二态现象 (Greenspan and Ferveur, 2000)。这些行为信息受到一系列性别相关基因调控,并表现为受性别二态型神经系统调控。

在众多可以调控交配行为的基因中,*fruitless* (*fru*)基因是其中最特殊的一个。*fru*突变会造成果蝇求偶歌与求偶行为的异常,甚至直接影响交配,导致其不育 (Lee *et al.*, 2001; Rideout *et al.*, 2007)。更有趣的是,*fru*突变会使得雄性果蝇丧失辨别两性的能力,直接导致的行为便是*fru*突变的雄成虫聚集在一起形成雄-雄交配链,产生激烈的雄-雄交配行为 (Ryner *et al.*, 1996)。研究证明,在果蝇中,*fru*

基因编码转录因子,其中一种可变剪接异构体在雄性性别调控通路中起决定雄性求偶行为的作用 (Yamamoto, 2008)。近年来分子生物学的发展使人们对求偶交配行为的调控有了更深层次的了解,特别是针对模式昆虫果蝇和家蚕的研究为我们了解昆虫求偶交配行为的内在机制提供了丰富的数据信息。但昆虫求偶交配行为机制丰富多样,不同昆虫通过不同基因调控求偶和交配行为。桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 作为一种对果蔬具有毁灭性影响的重要农业害虫,*fru* 对其求偶交配行为的调控机制尚不明确。

桔小实蝇作为双翅目中重要的经济害虫,对其的研究可为双翅目昆虫以及其他农业昆虫提供重要的参考价值和丰富的数据信息。本研究对 NCBI 数据进行分析查找,对筛选注释为 *fru* 的基因进行克隆验证和鉴定,并对序列蛋白结构域等特征进行分析,最后采用 RNAi 技术探究该基因是否对桔小实蝇的求偶交配行为发挥作用,从而进一步了解该基因的功能以及桔小实蝇的求偶交配行为。

1 材料与amp;方法

1.1 供试昆虫

本研究所用桔小实蝇在大小为 30 cm × 30 cm × 30 cm 的尼龙纱网养虫笼饲养于人工气候培养箱

内,并建立室内种群。成虫饲养温度 $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$,光照强度 60%,相对湿度 $70\% \pm 5\%$,光周期 14L:10D。成虫饲料配方为蔗糖:酵母 = 3:1 (m/m),蔗糖用粉碎机打成粉末称重,加入相应比例的酵母粉,充分混匀。配制好后放于室温备用,并保证饲料不超过 30 d。

用新鲜橙汁倒入布满孔的 70 mL 离心管中,并将其放入羽化 20 d 成虫养虫笼中,诱集成虫产卵。8 h 后将离心管取出,通过纱布用清水将卵冲洗干净后置入放有饲料的幼虫养虫盒中,并置于人工气候培养箱。幼虫饲料配方:香蕉 1 500 g、鲜玉米 1 500 g、酵母粉 150 g、蔗糖 150 g、纤维素 150 g、苯甲酸钠 6 g、盐酸 12 mL、蒸馏水 1 250 mL,充分混匀,放入 4°C 冰箱备用,保证饲料不超过 30 d。在羽化 3 d 内,将雌雄分开饲养,于羽化 9 d 后进行后续实验。

1.2 桔小实蝇头部 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

摘取桔小实蝇羽化 10 d 已交配的成虫头部,用液氮将桔小实蝇头部组织速冻,后用自动研磨仪将组织磨碎,并使用 Trizol Reagent (TaKaRa) 提取组织 RNA,于 30 μL 的无核酸酶水溶解。提取后用 1.2% 的琼脂糖凝胶检测 RNA 的质量,并于 Spectrophotometer (Thermo Nano Drop™ 2000c; Santa Clara, 美国)测定 RNA 的纯度及浓度。根据 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 Prime Script RT Reagent Kit with gDNA Eraser 合成 cDNA 第 1 链,并

按照说明书去除基因组 DNA。将合成好的 cDNA 于 -20°C 储存备用。

1.3 桔小实蝇 *fru* 基因的 cDNA 克隆

NCBI 上获得桔小实蝇 *fru* 基因 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: LOC105224493),并采用 Primer Premier 5.0 设计两端引物 Q-Fru-F 和 Q-Fru-R (表 1),以桔小实蝇头部 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系 (50 μL): Buffer 5 μL , dNTPs 5 μL , Mg^{2+} 3 μL , KOD 酶 1 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.5 μL , cDNA 模板 1 μL , ddH₂O 32 μL 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 3 min; 98°C 10 s, 55°C 30 s, 68°C 1.45 min, 35 个循环; 12°C 保存。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离并进行胶回收,将回收得到的 DNA 片段克隆到 pMD19-T Vector 载体上; DNA 片段 7 μL , pMD19-T Vector 载体 0.3 μL , Solution I 3 μL , 4°C 过夜。将混合体系转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中,加 1 mL LB 培养基放置摇床 37°C 180 r/min 培养 1 h,于超净工作台取 100 μL 菌液涂布在含有 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 固体培养基上,在 37°C 培养箱中倒置培养 12 ~ 16 h。蓝白斑筛选后挑取阳性单克隆在 1 mL LB 液体培养基 (含 Ampicillin) 中培养 12 ~ 16 h,将培养得到的菌液送往广州擎科生物技术有限公司进行 DNA 测序。用 Megalign 软件将测序成功的片段拼接获得桔小实蝇 *fru* 基因全长 cDNA,将得到的全长序列与 NCBI 官网上的预测序列进行比对验证。

表 1 本研究中所用引物序列
Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	用途 Purpose
Q-Fru-F	ATGGACCAGCAATTCGTCTA	全长 cDNA 克隆
Q-Fru-R	TCACATATGTACATAATGACTGAAG	Full-length cDNA cloning
α -Tubulin-F	CGCATTTCATGGTTGATAACG	
α -Tubulin-R	GGGCACCAAGTTAGTCTGGA	
EF1a-F	CGTTGGTGTCAACAAGATGG	
EF1a-R	TGCCTTCAGCATTACCTTCC	RT-qPCR
D-fru-F	GATTGCCATAGCGATTGTGA	
D-fru-R	AAATGCTTTTGTGCTGTTG	
R-fru-F	ATGATTGCCATAGCGATTGT	
R-fru-R	TTGCTGCTGTTTCTGTAGTGTG	
T-fru-F	TAATACGACTCACTATAGGATGATTGCCATAGCGATTGT	
T-fru-R	TAATACGACTCACTATAGGTTGCTGCTGTTTCTGTAGTGTG	
R-GFP-F	CGACGTAACGGCCACAA	RNAi
R-GFP-R	GGTGTTCTGCTGCTAGTG	
T-GFP-F	TAATACGACTCACTATAGGCGACGTAACGGCCACAA	
T-GFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGGTGTTCTGCTGCTAGTG	

1.4 桔小实蝇 *fru* 基因序列分析

将克隆获得的 *fru* 基因所编码的氨基酸序列在 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 蛋白预测网站上, 预测桔小实蝇 FRU 蛋白的分子量和等电点。在 NCBI 官网上获得黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 *fru* 编码的氨基酸序列, 同时在 SilkDB 数据库中获得家蚕 *Bombyx mori fru* 编码的氨基酸序列, 将其放在 SMART 蛋白预测网站上, 预测蛋白的结构。并用软件 DNAMAN 进行比对, 分析 *fru* 基因在进化上是否具有保守性。黑腹果蝇 *D. melanogaster*、冈比亚按蚊 *A. gambiae*、家蚕 *B. mori fru* 基因的 GenBank 登录号分别为 NM_00127783, AY785361 和 BGIBMGA006492-TA。

1.5 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测

根据桔小实蝇 *fru* 序列, 用软件 Primer Premier 5.0 设计引物。其中内参为 *Tublin* 和 *EF1a*, RT-qPCR 所用引物序列见表 1。

RT-qPCR 反应体系 (10 μ L): SYBB Green Supermix 5 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, ddH₂O 3.5 μ L, cDNA 0.5 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 溶解程序: 95 $^{\circ}$ C 10 s; 65 $^{\circ}$ C 5 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s。每个处理设置 3 个生物学重复, 每个样品设置 3 个技术重复, 按照上述体系进行实验。

1.6 dsRNA 的合成及注射

RNAi 基因片段的 T 克隆: 用 Primer Premier 5.0 设计合适桔小实蝇 *fru* 基因 dsRNA 特异性片段 PCR 扩增的特异性引物, 其具体引物见表 1。用带 T7 启动子的引物进行交叉 PCR 扩增, 将带有 T7 启动子的 PCR 原液按照 1.3 节的方法进行 T 克隆, 将测序正确的阳性菌液取 50 μ L 在 10 mL LB 液体培养基 (加 Ampicilin) 于 37 $^{\circ}$ C 180 r/min 摇床上培养 12 ~ 16 h, 将培养好的菌液按照质粒小提试剂盒提取质粒, 放于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

dsRNA 的合成: 对抽提的重组质粒用 *EcoRI* (TaKaRa) 进行酶切, 获得线性化质粒。以线性化质粒为模板, 采用 T7 RiboMAXTM Express RNAi System Protocol 试剂盒体外合成增强绿色荧光蛋白 GFP 基因和桔小实蝇 *fru* 的 dsRNA。合成结束将其稀释 10 倍用 1.2% 的琼脂糖电泳分析合成的 dsRNA 的质量, 后用 Spectrophotometer 测定 dsRNA 的浓度及纯度, 并置于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用。

显微注射 dsRNA: 取出保存的 dsRNA, 重新确定浓度, 并显微注射仪将其注射到羽化 9 d 的桔小

实蝇雄成虫腹部 (本实验室前期研究表明在羽化 9 d 时, 桔小实蝇求偶交配频率达到最大值), 注射量为 1 μ g/头 (dsGFP 和 ds*fru*), 每个处理共注射 100 头雄成虫。在注射后 48 和 72 h 取样, 于体视镜下摘取桔小实蝇雄成虫头部, 采用 RT-qPCR 检测干扰效率。将样品用液氮速冻后于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用。

交配行为测定方法: 在注射后 72 h, 将干扰的雄成虫与未干扰的雌成虫置入直径 8 cm、高 20 cm 并放有水盒和饲料的圆柱盒子中进行配对, 然后仔细观察 2 h 内雌雄求偶交配行为并统计交配频率和交配持续时间。

1.7 数据分析

RT-qPCR 实验每个处理设置 3 个生物学重复, 且每个样品设置 3 个技术重复; 依据 RT-qPCR 检测结果应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。行为学实验每个处理设置 10 个生物学重复 (圆柱盒子), 每个生物学重复含 10 个雌雄试虫配对。实验结果用 Excel 表统计, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及 Bonferroni 事后检验进行差异显著性分析, 并用 GraphPad Prism 5.0 作图。

2 结果

2.1 桔小实蝇 *fru* 的全长克隆

依据数据库 NCBI 中的 *fru* 序列信息, 克隆获得桔小实蝇的 *fru* 全长序列, 经比对测序结果与 NCBI 官网上的预测序列相一致。序列全长为 2 865 bp, 编码 954 个氨基酸。将该基因所编码的氨基酸序列在 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 蛋白预测网站上, 预测了桔小实蝇 FRU 蛋白的分子量、等电点和特殊结构域: 即桔小实蝇 FRU 蛋白序列中含有一个 BTB (Broad-complex, Tramtrack and Bric-a-bric) 结构域和两个锌指 (zinc finger) 结构域 (图 1)。其中 FRU 蛋白的等电点为 6.01, 蛋白分子量为 104.1 kD。

根据蛋白预测网站发现, 黑腹果蝇 *D. melanogaster*、冈比亚按蚊 *A. gambiae*、家蚕 *B. mori* 的 FRU 蛋白序列在 N 端亦存在 BTB 结构域和 C 端是两个锌指结构域。经过序列对比发现, 它们的 N 端非常保守, 同源率为 87.76% (图 1: A)。然而在两个锌指结构域中, 桔小实蝇和冈比亚按蚊的同源性较高, 黑腹果蝇与家蚕的同源性较高 (图 1: B 和 C)。因此, *fru* 基因非常保守, BTB 结构域和锌指结构域是该基因的特点。

2.2 fru 基因在桔小实蝇成虫不同组织中的表达情况

嗅觉、味觉在求偶性信息素识别的过程中至关重要,而主要行使嗅觉功能的是触角、下颚须等组织。在本研究中,我们解剖羽化后 9 d 的雄成虫脑、

下颚须和触角等感官组织,采用 RT-qPCR 检测这些组织中 fru 基因的表达量。结果表明:桔小实蝇中的 fru 基因在成虫触角、下颚须和脑中均有表达。这些感官组织分布在头部,因此在本研究中我们选取头部作为主要检测对象(图 2)。

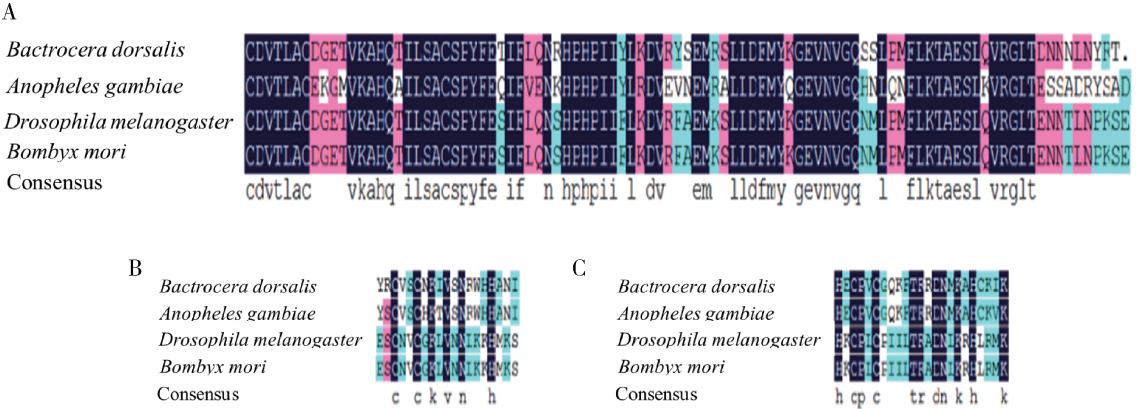


图 1 昆虫物种间 FRU 功能域序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of FRU functional domains across insect species

A: BTB 结构域 BTB domain; B, C: 锌指结构域 Zinc finger domain.

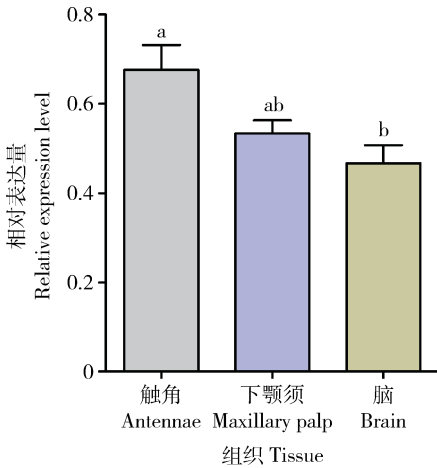


图 2 fru 基因在桔小实蝇 9 日龄雄成虫不同组织中的表达谱

Fig. 2 Expression profile of fru gene in different tissues of the 9-day-old male adults of Bactrocera dorsalis

图中数据为平均值 ± 标准误;柱上不同小写字母表示不同组织间基因表达量差异显著 ($P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni 事后检验)。Data in the figure are mean ± SE. Different lowercase letters above bars indicate significant difference in the gene expression level among different tissues ($P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

2.3 fru 在桔小实蝇雄成虫不同交配状态下的表达差异检测

RT-qPCR 检测在桔小实蝇雄成虫交配前和交配后 4 h 之内 fru 基因的表达量差异,结果表明,相较于未交配雄成虫,fru 在桔小实蝇雄成虫头部中的

表达量在与雌成虫交配后显著上升 ($P < 0.001$) (图 3)。

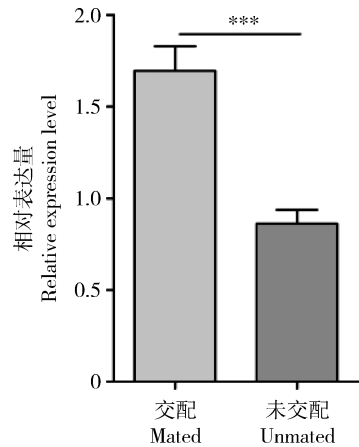


图 3 fru 基因在不同交配状态下桔小实蝇雄成虫头部中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression level of fru gene in the head of male adults of Bactrocera dorsalis in different mating status

选用羽化后 9 d 的雄成虫,分别在交配前 4 h 和交配后 4 h 检测基因表达量。图中数据为平均值 ± 标准误;三星号表明未交配和已交配的雄成虫基因表达水平存在显著差异 ($P < 0.001$, one-way ANOVA, Bonferroni 事后检验)。The 9-day-old male adults were selected, and the gene expression levels were determined at 4 h before mating and after mating, respectively. Data in the figure are mean ± SE. The triple asterisk above bars indicates significant difference in the gene expression level between unmated and mated male adults ($P < 0.001$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

2.4 RNAi 干扰效率检测

RT-qPCR 检测结果表明,与空白对照组(注射 DEPC 水)和阴性对照组(注射 *dsGFP*)相比,注射了 *dsfru* 的处理组中 *fru* 基因的表达水平显著下降 ($P < 0.05$);与空白对照组和阴性对照组相比,处理

组中 *fru* 基因表达水平在注射后 48 h 分别下降了 51.66% 和 47.82% (图 4: A),在注射后 72 h 分别下降了 72.16% 和 73.65% (图 4: B),因此后续行为学实验选择在干扰后 72 h 统计交配结果。

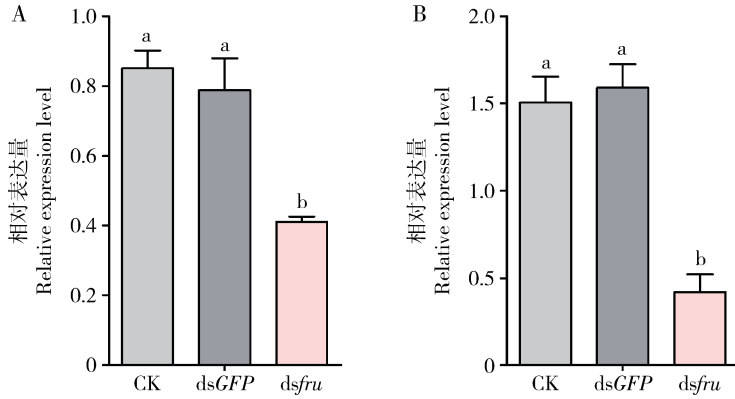


图 4 RNAi 后 48 h (A) 和 72 h (B) 桔小实蝇成虫 *fru* 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *fru* gene in *Bactrocera dorsalis* adults at 48 h (A) and 72 h (B) after RNAi

选用羽化后 9 d 的雄成虫进行测试;空白对照组 (CK) 注射 DEPC 水,阴性对照组注射 *dsGFP*,RNAi 处理组注射 *dsfru*。图中数据为平均值 \pm 标准误差;柱上不同小写字母表示不同处理组间基因表达量差异显著 ($P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni 事后检验)。The 9-day-old male adults were selected for test. DEPC-treated water was injected in the blank control (CK), *dsGFP* injected in the negative control group and *dsfru* injected in the RNAi group. Data in the figure are mean \pm SE. Different lowercase letters above bars indicate significant difference in the gene expression level among different treatment groups ($P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

2.5 RNAi 探究 *fru* 在求偶行为中的功能

据我们观察可知,桔小实蝇的求偶行为可以分为以下几个步骤:当雄性发现一个较为感兴趣的雌性时,跟随其后。接近雌性桔小实蝇时,雄性保持翅靠近腹部,并震动翅膀,持续几秒到几分钟。而雌性会被雄性的振翅(求偶歌)所吸引,较少与振翅时间短(少于 30 s)的雄性交配。雌性被雄性的求偶歌所吸引时,较为平和,雄性会趁机舔舐雌性的生殖

器,取悦雌性。待时机成熟时,雄性会爬上雌性背部尝试交配(未遂交配)。受到求偶歌和舔舐的影响,雌性会打开阴道板开始交配。

将已注射 *dsfru*、DEPC 水和 *dsGFP* 的雄成虫分别与未进行注射的雌成虫进行配对。结果表明(图 5),注射了 *dsfru* 的处理组相对于空白对照组(注射 DEPC 水)和阴性对照组(注射 *dsGFP*)交配所花费的时间大幅度提高。在对照组中,在 60 min 后超过

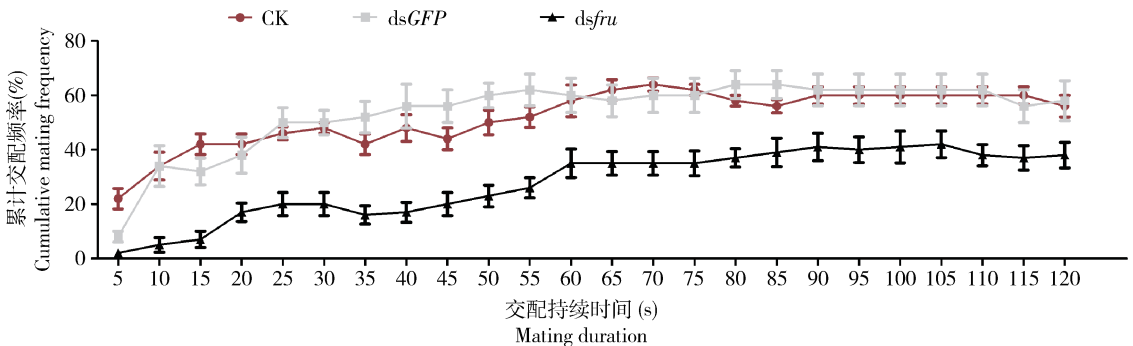


图 5 RNAi 干扰 *fru* 对桔小实蝇成虫交配频率和交配持续时间的影响

Fig. 5 Effect of RNAi of *fru* on the mating frequency and duration of *Bactrocera dorsalis* adults

选用羽化后 9 d 的雄成虫进行测试;空白对照组 (CK) 注射 DEPC 水,阴性对照组注射 *dsGFP*, RNAi 处理组注射 *dsfru*。The 9-day-old male adults were selected for test. DEPC-treated water was injected in the blank control (CK), *dsGFP* injected in the negative control group and *dsfru* injected in the RNAi group.

60%的雄成虫进入交配阶段,且交配频率达到最大值。但是注射了 *dsfru* 的处理组,在 90 min 后雌雄交配频率达到了最大值,仅有不到 40%的雄成虫进入交配阶段,且直到观察结束(120 min)一直在该交配频率上下浮动。该结果表明,当 *fru* 基因表达量下调时会直接导致桔小实蝇的交配行为受到抑制,具体表现为求偶时间延长(比空白对照组延长了 25 ~ 35 min),交配成功率下降(比空白对照组下降了 17% ~ 22%),说明 *fru* 基因在桔小实蝇的求偶交配行为中发挥着重要作用。

3 讨论

在果蝇中,*fru* 基因编码转录因子,其中一种可变剪接异构体在雄性性别调控通路中参与雄性求偶行为,而其他可变剪接异构体则不具有性别特异性(Salvemini *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2019)。在雄性果蝇中,*fru* 基因前体发生剪接,将位于 2 号外显子上的雌性特异性调节区切除,加上雄性特异性 5' 剪接位点和位于 3 号外显子的 3' 剪接位点,编码 BTB 结构域。因此,雄性特异性 FRU 蛋白在 BTB 结构域上游具有雄性特异的、长 101 个氨基酸的 N 末端。且有研究表明这个 FRU 蛋白在雄性的求偶行为中也是必要的(Telonis-Scott *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2016),这与本研究结果一致。所有报道的 FRU 蛋白亚型都含有一个 BTB 结构域,这个结构域可以行使二聚体化的功能,同时在 C 末端具有 ZnF 结构与作为 DNA 结构识别区,表明 FRU 蛋白可能作为转录因子调控下游基因的表达(Vernes, 2014)。且进化分析表明桔小实蝇 *fru* 基因序列与果蝇等昆虫在 N 端非常保守,预示着该基因在各个昆虫中行使类似的功能。

fru 在果蝇的性取向、求偶和交配行为中都发挥着十分重要的作用。在果蝇中,*fru* 基因的突变可以导致雄性果蝇的许多交配和求偶行为的改变(Gailey *et al.*, 2005; Watanabe, 2019)。除此之外,雄性对配偶辨别跟嗅觉、味觉、视觉等感器接受外界信号息息相关:当果蝇的触角、下颚须嗅觉组织被剥夺时,与对照组相比,雄性求偶频率显著下降(Liu *et al.*, 2008)。且据报道,*fru* 神经元在味觉、视觉、嗅觉等区域都有分布(Lee *et al.*, 2000)。本研究结果与前期研究一致,在桔小实蝇中,*fru* 基因在触角、下颚须、脑组织中均有所表达(图 2),因此嗅觉系统可能与 *fru* 基因实现相互作用,并在桔小实蝇交配行

为中发挥着一定的作用。且所涉及参与交配行为的组织主要分布在头部,因此在本研究中我们选取头部作为主要检测对象。*fru* 基因在桔小实蝇雄成虫不同交配状态下头部的相对表达量并不相同,相较于未交配雄成虫,*fru* 基因在桔小实蝇雄成虫头部中的表达量在与雌成虫交配后显著上升(图 3),因此说明 *fru* 基因可能参与桔小实蝇的雄性求偶交配行为。

在果蝇中,当 Fru^M 完全缺失或者表达下调时,雄蝇表现出对雌蝇求偶下降,对同性雄蝇强烈追逐以及交配失败等行为异常。且研究表明人为地在雌性中表达 Fru^M 能够使雌蝇展现出追逐、求偶歌等求偶现象(Villella *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2015; Shirangi *et al.*, 2016),说明 Fru^M 是求偶行为某些步骤形成的充分调控因素。因此, Fru^M 被称为果蝇求偶的开关分子(Sato *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019)。在果蝇中,约有 1 500 个神经元可表达 Fru^M , *fruP1^{Gal4}* 在视觉、嗅觉、味觉以及腹神经索区域都有分布(Lee *et al.*, 2000; Stockinger *et al.*, 2005)。因此,激活 *fruP1^{Gal4}* 能够诱导雄成虫在没有求偶对象的情况下展现所有的求偶步骤,而失活 *fruP1^{Gal4}* 神经元则使雄成虫求偶下降甚至完全消失(Manoli *et al.*, 2005)。与全变态昆虫不一样的是,在双斑蟋 *Gryllus bimaculatus* 中,该基因的表达并未呈现性别二态型,说明 *fru* 在半变态昆虫中可能不直接参与求偶和性决定等交配行为(Watanabe, 2019)。因此,*fru* 在果蝇求偶和交配行为中的重要作用不言而喻,但在其他昆虫中的功能作用以及参与形式还有待进一步挖掘和揭示。本研究结果阐明了 *fru* 参与了桔小实蝇雌雄交配的行为中,RNAi 引起的 *fru* 基因表达量的降低(图 4)会导致桔小实蝇求偶时间延长以及交配成功率的下降(图 5)。与本研究结果一致,在家蚕中,使用 RNAi 降低 *fru* 基因的表达量后,只有 20% 的家蚕在 10 min 内完成交配,与对照组中 10 min 内 80% 的家蚕均已完成交配差异显著(Zheng, 2016),表明 *fru* 基因在家蚕求偶行为中发挥着重要作用。且作者还进一步采用免疫沉淀筛选出 4 类潜在与 FRU 蛋白存在相互作用的蛋白(Zheng, 2016),为进一步研究 FRU 蛋白的功能提供了基础。但是 *fru* 基因在家蚕中的不同剪切形式,对其功能的调控是否相同,且该基因是否是调控交配的必要条件亦不清楚。本研究结果也表明 *fru* 表达与桔小实蝇交配行为紧密相关,为揭示该基因在非模式昆虫中的功能和绿色防控桔小实蝇提供了

有力证据,但 *fru* 基因(或 FRU 蛋白)具体以何种形式参与到这些行为中,还需进一步的实验进行研究与验证。

参考文献 (References)

- de Aquino JC, Joachim-Bravo IS, 2014. Relevance of male size to female mate choice in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): investigations with wild and laboratory-reared flies. *J. Insect Behav.*, 27(2): 162 – 176.
- Ekanayake WM, Jayasundara MS, Peek T, Clarke AR, Schutze MK, 2017. The mating system of the true fruit fly *Bactrocera tryoni* and its sister species, *Bactrocera neohumeralis*. *Insect Sci.*, 24(3): 478 – 490.
- Gailey DA, Billeter JC, Liu JH, Bauzon F, Allendorfer JB, Goodwin SF, 2005. Functional conservation of the *fruitless* male sex-determination gene across 250 Myr of insect evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 23(3): 633 – 643.
- Greenspan RJ, Ferveur JF, 2000. Courtship in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.*, 34: 205 – 232.
- Ito H, Sato K, Kondo S, Ueda R, Yamamoto D, 2016. Fruitless represses *robo1* transcription to shape male-specific neural morphology and behavior in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 26(12): 1532 – 1542.
- Koganezawa M, Kimura K, Yamamoto D, 2016. The neural circuitry that functions as a switch for courtship versus aggression in *Drosophila* males. *Curr. Biol.*, 26(11): 1395 – 1403.
- Lee G, Foss M, Goodwin SF, Carlo T, Taylor BJ, Hall JC, 2000. Spatial, temporal, and sexually dimorphic expression patterns of the *fruitless* gene in the *Drosophila* central nervous system. *J. Neurobiol.*, 43(4): 404 – 426.
- Lee G, Vilella A, Taylor BJ, Hall JC, 2001. New reproductive anomalies in *fruitless*-mutant *Drosophila* males: extreme lengthening of mating durations and infertility correlated with defective serotonergic innervation of reproductive organs. *J. Neurobiol.*, 47(2): 121 – 149.
- Liu T, Dartevelle L, Yuan C, Wei H, Wang Y, Ferveur JF, Guo A, 2008. Increased dopamine level enhances male-male courtship in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 28(21): 5539 – 5546.
- Manoli DS, Foss M, Vilella A, Taylor BJ, Hall JC, Baker BS, 2005. Male-specific *fruitless* specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature*, 436(7049): 395.
- Rideout EJ, Billeter JC, Goodwin SF, 2007. The sex-determination genes *fruitless* and *doublesex* specify a neural substrate required for courtship song. *Curr. Biol.*, 17(17): 1473 – 1478.
- Robinson A, Hooper GC, 1989. Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holland.
- Ryner LC, Goodwin SF, Castrillon DH, Anand A, Vilella A, Baker BS, Hall JC, Taylor BJ, Wasserman SA, 1996. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Cell*, 87(6): 1079 – 1089.
- Salvemini M, Polito C, Saccone G, 2010. *fruitless* alternative splicing and sex behaviour in insects: an ancient and unforgettable love story? *J. Genet.*, 89(3): 287 – 299.
- Sato K, Goto J, Yamamoto D, 2019. Sex mysteries on the fly courtship master regulator *fruitless*. *Front. Behav. Neurosci.*, 13: 245.
- Shirangi TR, Wong AM, Truman JW, Stern DL, 2016. *Doublesex* regulates the connectivity of a neural circuit controlling *Drosophila* male courtship song. *Dev. Cell*, 37(6): 533 – 544.
- Stockinger P, Kvitsiani D, Rotkopf S, Tirián L, Dickson BJ, 2005. Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior. *Cell*, 121(5): 795 – 807.
- Telonis-Scott M, Kopp A, Wayne ML, Nuzhdin SV, McIntyre LM, 2009. Sex-specific splicing in *Drosophila*: widespread occurrence, tissue specificity and evolutionary conservation. *Genetics*, 181(2): 421 – 434.
- Vernes SC, 2014. Genome wide identification of *fruitless* targets suggests a role in upregulating genes important for neural circuit formation. *Sci. Rep.*, 4: 4412.
- Vilella A, Gailey DA, Berwald B, Ohshima S, Barnes PT, Hall JC, 1997. Extended reproductive roles of the *fruitless* gene in *Drosophila melanogaster* revealed by behavioral analysis of new *fru* mutants. *Genetics*, 147(3): 1107 – 1130.
- Watanabe T, 2019. Evolution of the neural sex-determination system in insects: does *fruitless* homologue regulate neural sexual dimorphism in basal insects? *Insect Mol. Biol.*, 28(6): 807 – 827.
- Wu S, Guo C, Zhao H, Sun M, Chen J, Han C, Peng Q, Qiao H, Peng P, Liu Y, 2019. Drosulfakinin signaling in *fruitless* circuitry antagonizes PI neurons to regulate sexual arousal in *Drosophila*. *Nat. Commun.*, 10(1): 4770.
- Yamamoto D, 2008. Brain sex differences and function of the *fruitless* gene in *Drosophila*. *J. Neurogenet.*, 22(3): 309 – 332.
- Zheng RW, 2016. Functional Characterization of *fruitless* in Courtship Behavior in Silkworm. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [郑人文, 2016. *Fruitless* 在家蚕求偶行为中的功能研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文]
- Zhou C, Franconville R, Vaughan AG, Robinett CC, Jayaraman V, Baker BS, 2015. Central neural circuitry mediating courtship song perception in male *Drosophila*. *eLife*, 4: e08477.

(责任编辑: 赵利辉)