

DOI: 10.13376/j.cbls/2024085

文章编号: 1004-0374(2024)06-0831-11

# 卤虫的生殖方式及其调控机制研究进展

杨劲树\*, 毕 宁, 杨卫军

(浙江大学生命科学学院, 细胞与发育生物学研究所, 杭州 310058)

**摘 要:** 生物的生殖方式及其调控机制是生命科学最基础和最重要的研究内容之一。卤虫是一类具有优良经济价值和科研价值的小型甲壳动物, 依据生殖方式可分为八个两性物种和众多地理孤雌种群, 是理想的生殖机制研究模型动物。对于卤虫生殖机制的早期研究主要集中于两性物种/孤雌种群鉴定、染色体核型分析、种间杂交实验、生物地理学、群体遗传学等方面, 也存在着不少争议性的结果。近年来, 随着相关研究数据的积累和卤虫完整基因组序列的解析, 对于卤虫性别决定机制以及孤雌发生机制的研究已逐渐聚焦于基因组水平的基因表达调控等方面。在这一背景下, 本文总结了卤虫生殖机制的研究历史和前沿, 并结合本团队的研究和思考, 分别对两性卤虫和孤雌卤虫的性别调控机制相关信息进行了整理, 并对今后相关领域的研究方向和有待解决的问题进行了展望。

**关键词:** 卤虫; 两性生殖; 孤雌生殖; 生殖调控

**中图分类号:** Q173; S917 **文献标志码:** A

## Progress of studies on reproductive modes and mechanisms of regulation in *Artemia*

YANG Jin-Shu\*, BI Ning, YANG Wei-Jun

(Institute of Cell and Developmental Biology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** The reproductive mode and its regulating mechanism is one of the most fundamental and important issues concerned in life sciences. The genus *Artemia* is a group of small crustaceans that have significant economic and scientific research values. According to reproductive modes, *Artemia* has eight bisexual species and quite a few geographic parthenogenetic populations, providing an ideal research model for the study of the mechanism of reproduction. Previous studies on the reproductive regulation in *Artemia* have been focusing on discrimination of bisexual species and parthenogenetic populations, chromosomal karyotyping, interspecific hybridization, biogeography, population genetics, etc., which sometimes led to disputed results. In recent years, with more and more accumulated evidence and the accomplishment of the whole *Artemia* genomes, research interests on sex determination and origin of parthenogenesis have gradually converged towards a unified focus on gene expression regulation at the genomic level. In this context, this paper summarizes the research history and frontier of the mechanism of reproduction in *Artemia*, and combines the research and considerations of our team to sort out the information of sex regulation mechanisms of both bisexual and parthenogenetic *Artemia*. We also look forward to future research directions and the problems to be solved.

**Key words:** *Artemia*; bisexuality; parthenogenesis; reproductive regulation

收稿日期: 2024-02-20; 修回日期: 2024-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172945); 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2021C02069-4-2); 浙江省自然科学基金项目(LY23C040003)

\*通信作者: E-mail: yjsdos@zju.edu.cn

卤虫又名丰年虫、丰年虾、海猴子，是一种古老的小型甲壳类动物，分类学上属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳亚门 (Crustacea)、鳃足纲 (Branchiopoda)、无甲目 (Anostraca)、卤虫科 (Artemiidae)、卤虫属 (*Artemia*)。卤虫在外界条件不利 (例如越冬) 时会产生包被有几丁质外壳的原肠胚期休眠卵 (diapause cyst)，再激活休眠卵孵出的无节幼体可以作为水产养殖动物幼苗的理想开口饲料，因此世界上大部分水产养殖动物的育苗严重依赖卤虫休眠卵，而有限的卤虫卵年产量也使得育苗成本居高不下<sup>[1]</sup>。除了休眠生殖模式，卤虫的生殖方式还可以分为两性生殖 (bisexuality) 和孤雌生殖 (parthenogenesis) 两种，然而不同的卤虫物种 / 种群通常只采用其中的一种，不同生殖方式的形成和转换机制至今尚未阐明。

本文分别梳理了两性卤虫及孤雌卤虫生殖调控机制相关研究，并结合本研究团队近年来的工作，整理了卤虫生殖方式和调控机制的研究历史和最新进展，为今后更全面和深入的研究提供基础性总结和前瞻性展望。

## 1 卤虫的生殖方式

在漫长的演化历史进程中，卤虫发展出两种生殖方式——两性生殖和孤雌生殖。目前，一共发现两性卤虫 8 个种<sup>[2-3]</sup>：*Artemia amati* (原产地哈萨克斯坦)、*A. franciscana* (美洲)、*A. persimilis* (南美洲)、*A. salina* (欧洲 / 北非)、*A. sinica* (中国中北部)、*A. sorgeloosi* (中国青海)、*A. tibetiana* (中国西藏) 以及 *A. urmiana* (伊朗)。其中广为人知的未定种 *A. sp. Kazakhstan* 最近被正式定种为 *A. amati*<sup>[3]</sup>，本文中均用后者代替。由于 2017 年引入的 *A. frameshiffta* 和 *A. murae* 缺乏严格意义上的定种证据<sup>[3-4]</sup>，因此本文并未收录。

不同于分布相对集中的两性卤虫，孤雌卤虫通常散布在高原盐湖、海滨盐场等生境 (图 1A)<sup>[2,5-8]</sup>，由于无法依据传统意义上的生殖隔离标准进行物种鉴定，孤雌卤虫通常被冠以发现地以区分不同的种群，比如 *A. parthenogenetica* Gahai，即“尕斯库勒湖孤雌卤虫”。近年来也有学者主张弃用 *A. parthenogenetica*，只标注孤雌卤虫来源<sup>[9-11]</sup>。孤雌卤虫依据分子进化和染色体倍性大体上分为两大区系，一般认为各自独立起源 (图 1B)<sup>[5-7]</sup>。

### 1.1 卤虫的两性生殖方式

和大部分两性动物一样，两性生殖卤虫具有显

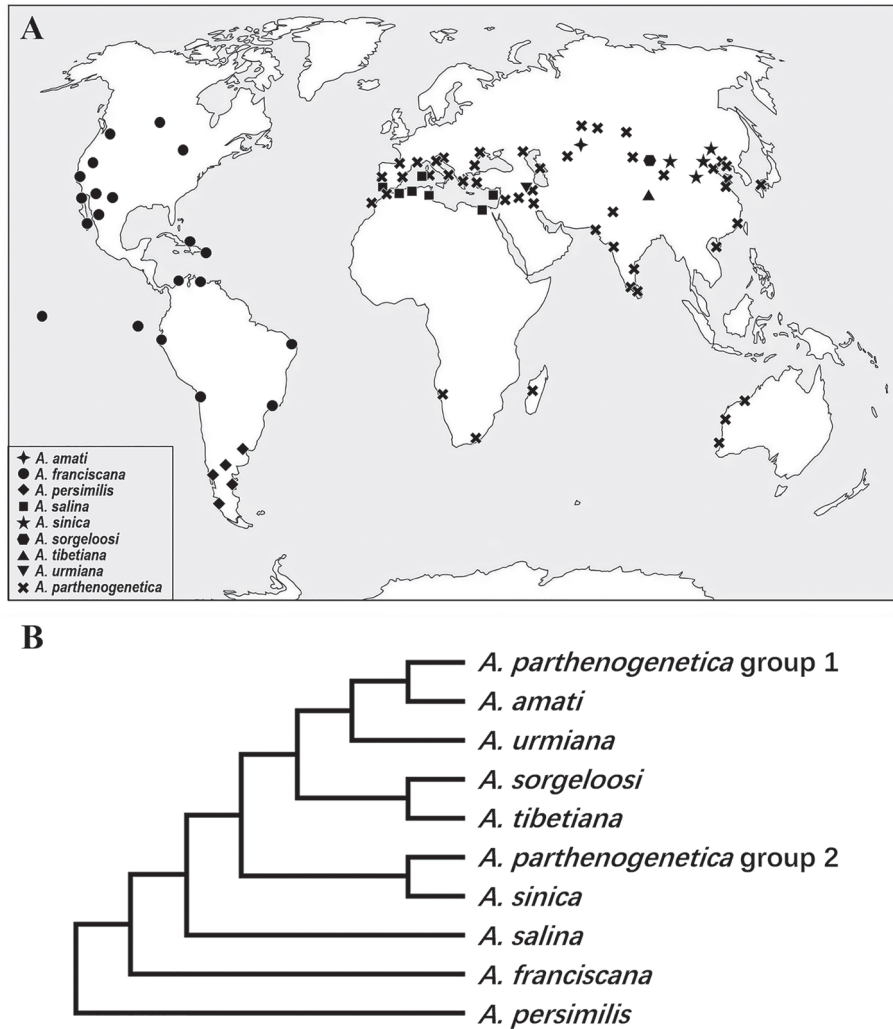
著的性别二态性 (sexual dimorphism)：雌性成虫 (10~12 mm) 比雄性 (8~10 mm) 稍长；雌虫在腹部的生殖体节拥有一个用来储存成熟卵母细胞和受精卵的卵囊 (ovisac)，而雄虫在生殖体节具有一对可外翻的交配器 (penis)；相比于雌虫，雄虫第二对触角特化成为发达的执握器 (clasper)；此外，雄虫的运动能力要远高于雌虫<sup>[2]</sup>。一旦性成熟，雄性卤虫利用快速的游动能力和发达的执握器抓住雌性卤虫，并完成交配和精卵受精，经胚胎发育产出大致等比例的雌雄后代。

雄性卤虫生殖系统的发育称为精子发生 (spermatogenesis)，经历从精原细胞到精子成熟的数个阶段<sup>[2]</sup>：精原细胞 (spermatogonia) 经有丝分裂增殖并产生初级精母细胞 (primary spermatocyte)；然后是精母细胞进行减数分裂，染色体数量减半，生成精细胞 (spermatid)；最终精细胞转化为成熟的精子 (spermatozoa)。在雌性卤虫生殖系统中，卵子发生 (oogenesis) 历经早期 (卵黄积累和卵母细胞成熟)、中期 (卵母细胞移至两侧输卵管) 和晚期 (卵母细胞排入卵囊) 三个阶段。在卵子发生晚期阶段完成精卵受精，胚胎发育起始；但如果环境中缺乏雄性卤虫，卵母细胞最终发生凋亡并排出体外<sup>[12]</sup>。本团队的研究表明，两性卤虫中处于卵子发生晚期阶段的卵母细胞会停滞在第一次减数分裂中期，直至遇到来自精子的信号重启并最终完成减数分裂<sup>[13]</sup>。

尽管对于两性卤虫的性别发育阶段、细胞学描述以及性染色体的类型基本已经明确，但对于其性别决定的具体机制以及参与其中的性别关键基因缺乏深入了解 (见第二部分)。相比较而言，对同属于节肢动物门的昆虫，甚至是同属于甲壳动物亚门的软甲纲 (包括等足目和十足目) 以及水蚤，其性别决定机制已经有了广泛且深入的研究<sup>[14-15]</sup>。由于性别决定特别是上游机制的多样性和复杂性<sup>[16]</sup>，实际上不同物种之间研究的借鉴性远低于期待，有关两性卤虫的性别决定机制研究大体仍需从卤虫本身入手。

### 1.2 卤虫的孤雌生殖方式

人们很早就发现孤雌卤虫的存在<sup>[17]</sup>，实际上孤雌卤虫分布于除南极洲和南北美洲之外的所有大陆 (图 1A)，这种高度地理分布性也是孤雌种群的一个显著特征<sup>[18]</sup>。由于无法根据传统意义上的物种定义 ( $F_2$  代可育) 来判断孤雌卤虫种群间的种化关系，研究者们通常用 *A. parthenogenetica* 加上地理位置来代表某一孤雌卤虫种群。孤雌生殖可以避免



A: 总结参考文献<sup>[2,5-8]</sup>绘制的卤虫原地理分布图, 不包含因发展卤虫卵产业而异域接种的*A. franciscana*; B: 系统进化树基于线粒体全基因组<sup>[3,7]</sup>重建, 仅显示拓扑结构, 未显示枝长。

图1 两性卤虫和孤雌卤虫的地理分布及系统进化关系

因两性生殖带来的“双倍代价”(dual cost), 孤雌种群能够迅速繁殖和占据条件适宜的生境, 因此在物种演化和生物多样性上具有重要的研究价值。

孤雌卤虫无需雌雄交配, 即可由雌性卤虫直接产生后代。本团队在二倍体孤雌卤虫中的细胞学观察表明, 不同于两性卤虫卵子发生过程中减数分裂的停滞/再激活机制, 孤雌卤虫从卵子发生到胚胎发育是一个连续进行的过程, 无需受精就可以由卵子发生晚期阶段直接进入胚胎发育<sup>[13]</sup>, 其中卵母细胞跨越减数分裂停滞点的机制尚不清楚。

孤雌卤虫中会产生低比例的“罕见雄体”(rare male)<sup>[10]</sup>, 这一现象在不少孤雌动物种群中存在, 但研究者们对于其出现的原因和意义一直存在争议。大部分罕见雄体是无功能的(non-functional),

源于偶发突变, 会随遗传漂变而被清除<sup>[19]</sup>; 也有人推测罕见雄体是全功能的(functional male), 可以与近缘两性物种中的雌性正常交配并产生后代, 在这一过程中便可以将孤雌发生相关的基因传播出去, 即实现传播性孤雌(contagious parthenogenesis)<sup>[20-21]</sup>; 还有学者认为, 罕见雄体的存在是为了保持孤雌种群的重组潜能, 防止孤雌种群因为同质化造成环境适应度下降, 而罕见雄体本身就是同源重组的产物<sup>[22-24]</sup>。此外, 孤雌卤虫中也常常观察到染色体多倍性, 一般认为只有二倍体孤雌卤虫才能产生罕见雄体, 本文第三部分将详细讨论卤虫的罕见雄体和染色体多倍性现象。

在孤雌机制研究中, 与卤虫近缘的水蚤(*Daphnia*)涉及得比较深入, 因此往往用来作为卤虫研究的参



照。然而,水蚤的孤雌与卤虫有所不同。首先,不同于卤虫的专性孤雌生殖(obligate parthenogenesis),水蚤采用循环孤雌方式(cyclical parthenogenesis),正常状态下水蚤进行孤雌生殖产生克隆后代,一旦遇到不利条件(例如越冬),水蚤切换为两性生殖并产出休眠卵,等外界条件恢复再重新进入孤雌生殖<sup>[25]</sup>。其次,卤虫采用遗传性别决定(genetic sex determination, GSD)机制,由性染色体(ZW体系)来决定后代的性别,而水蚤没有性染色体而采用环境性别决定(environmental sex determination, ESD)机制,两者在性别决定上游途径存在显著差异。这些差别表明,卤虫的孤雌机制无论是从内因还是外因来看都是更加稳定的系统,可能是更理想的孤雌发生和维持机制的研究模型。

## 2 两性卤虫的性别调控机制

与其他两性生殖动物类似,两性卤虫历经性别决定及分化、雌雄性成熟、减数分裂产生雌雄配子、精卵受精及胚胎发育。尽管在细胞生物学及分子机制方面目前已经拥有一些实验证据,但是两性卤虫性别调控分子机制尚未完全阐明。

### 2.1 两性卤虫的性染色体

两性生殖动物大体分为两大性别决定系统——环境性别决定和遗传性别决定。其中,遗传性别决定的动物通常拥有性染色体(sex chromosome),既有雄性异配(male-heterogametic)的XY型(雌性为XX),也有雌性异配(female-heterogametic)的ZW型(雄性为ZZ)。XY型动物以包括人类在内的哺乳类动物和果蝇为代表,而ZW型动物包括鸟类、蛇、家蚕等。一般认为,性染色体X/Y或Z/W来自于逐渐失去重组能力的同源配对染色体,其中Y或W具有退化性趋势,而X或Z需要通过剂量补偿(dosage compensation)来平衡雌雄间由于拷贝数不同造成的基因表达差异<sup>[26]</sup>。

在甲壳动物中同时存在着上述两种性染色体系统。XY型的甲壳动物包括陆生等足目*Trachelipus rathkei*<sup>[27]</sup>和*Porcellio dilatatus dilatatus*<sup>[28]</sup>,端足目*Orchestia cavimana*和*O. gammarellus*<sup>[29]</sup>,东奥岩龙虾<sup>[30]</sup>、苍白石螯虾<sup>[31]</sup>、锈斑螯<sup>[32]</sup>等。ZW型包括中华绒螯蟹<sup>[33]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[34-35]</sup>、日本对虾<sup>[36]</sup>、斑节对虾<sup>[37]</sup>、罗氏沼虾<sup>[38]</sup>、红螯螯虾<sup>[39-40]</sup>、普通潮虫<sup>[28]</sup>等。

在两性卤虫中,雌性异配的证据最早来自于*A. salina*的核型分析<sup>[41]</sup>,之后在*A. franciscana*和

*persimilis*中的观察也支持了这一结论<sup>[42]</sup>。2013年,De Vos等<sup>[43]</sup>基于AFLP绘制了*A. franciscana*的遗传连锁图谱,获得了定位在W染色体上的8个性别连锁标记,最终确认了卤虫采用ZW型性别决定系统。2019年,Huylmans等<sup>[44]</sup>通过分析Z和W染色体来源基因的表达水平,观察到了卤虫雌雄个体中的剂量补偿效应。2021年,隋丽英团队构建了*A. franciscana*的高密度遗传图谱,通过分析雌性SNP标记的分离模式及雌雄重组率,同样确定了卤虫的ZW系统<sup>[45]</sup>。近年完成的*A. sinica*<sup>[23]</sup>和*A. franciscana*<sup>[46]</sup>染色体级组装基因组也全面解析了性染色体Z和W的核苷酸序列,进一步确认了卤虫ZW系统的物理实体。

### 2.2 两性卤虫的性别相关基因

两性动物的性别决定机制被认为是反向演化的产物,这意味着下游部分具有最大的选择压力而成为更加保守的部分<sup>[16]</sup>,比如在几乎所有物种中都发现的*Dmrt*家族基因及其雌雄可变剪接现象;相比较而言,机制上游的部分会千差万别,特别是其中的性别主控基因(sex primary determining gene),实际上寻找主控基因是一项充满挑战的工作,也一直是性别机制研究领域的焦点。从2014年开始,随着困扰家蚕性别机制研究80多年的主控基因*Fem*(一种piRNA基因)的发现<sup>[47]</sup>,一系列昆虫的性别主控基因陆续被揭示,包括蚊子<sup>[48-49]</sup>、果蝇<sup>[50]</sup>和黄蜂<sup>[51]</sup>。然而,与其他节肢动物物种相比,甚至与同属鳃足纲甲壳动物的水蚤相比,卤虫性别相关基因的研究一直较少,而对于其性别主控基因的探索几乎是空白。

2014年,比利时根特大学的研究团队在确定了*A. franciscana*基因组图谱<sup>[43]</sup>的基础上,进一步通过混合分组分析法(bulked segregant analysis, BSA)筛选获得了8个候选性别决定基因<sup>[52]</sup>。同年,智利的研究团队通过分析*A. franciscana*雌雄转录组,分别找到了来自雌雄个体的221个和534个特异性SNP(单核苷酸多态)位点<sup>[53]</sup>。2021年,隋丽英团队使用SLAF-seq方法筛选到466个性别相关SNP,并通过QTL关联分析获得了22个与生殖、生长和免疫相关的候选基因<sup>[45]</sup>。2021年,韩国的研究团队对*A. franciscana*进行了基于全长转录组测序的基因表达和剪接模式分析,一共获得了39个候选性别决定基因,其中包括经典的性别相关转录因子基因*Dmrt1*和蜕皮激素合成相关基因*Shadow (Sad)*<sup>[54]</sup>。然而,上述研究均基于生物信息

学预测, 仍需进行功能验证以确认这些基因的实际功能。

雄性决定基因 *Masculinizer (Masc)* 最早在家蚕 (*Bombyx mori*) 中被发现, 位于 Z 染色体, 雌性个体通过 W 染色体上转录的 piRNA (*Fem*) 启动 *Masc* mRNA 的雌性特异性降解, 导致下游 *Doublesex (Dsx)* 基因开启默认雌性剪接, 从而引起个体朝雌性方向发育; 反之, 由于雄性个体中不存在 W 染色体, 正常表达的 *MASC* 蛋白指导 *Dsx* 基因剪接成雄性异构体, 个体朝雄性方向发育<sup>[47]</sup>。本团队在卤虫中也发现了 *Masc* 的同源基因, 其在雌雄个体中甚至是在孕海孤雌卤虫中均有表达且并无显著性差异, 但当利用 RNAi 在两性雌虫中敲低该基因时会引起后代雌雄比例大于 2:1, 这意味着 *Masc* 基因以某种方式参与卤虫的性别决定<sup>[55]</sup>。然而近年研究发现, *Masc* 基因位于卤虫的常染色体上, 而不是像家蚕那样位于 Z 染色体上, 因此 *Masc* 基因在卤虫中很可能并不是主要性别调控基因<sup>[44]</sup>。

早在 2004 年, 曾辉等<sup>[56]</sup> 在两性卤虫 *A. sinica* 和孕海孤雌卤虫中, 利用简并 PCR 扩增获得了 *Drmt* 家族基因的 cDNA 片段, 并证明该片段与脊椎动物的 *Dmrt3* 基因具有更高的相似性。2010 年, 伊朗的研究团队在两性卤虫 *A. urmiana* 和乌尔米孤雌卤虫中获得了早期卵巢中高表达的 *Dmrt* 基因片段<sup>[57]</sup>。近年, 比利时根特大学团队和本团队独立发现了在 *A. franciscana* 中进行雌雄可变剪接的 *Dmrt* 家族基因 *Doublesex (Dsx)*, 确认了其编码性别关键转录因子 *DSX*<sup>[58-59]</sup>。研究表明, *Dsx* 基因会产生 *Dsx<sup>F</sup>* 和 *Dsx<sup>M</sup>* 两个雌雄特异性剪接体, 利用 RNAi 在雄性卤虫中敲低 *Dsx<sup>M</sup>* 剪接体会导致雄性产生雌性特征, 引起精巢的退化、类卵巢结构的出现以及卵黄蛋白原基因 (*Vtg*) 的表达; 而在雌性中特异性敲低 *Dsx<sup>F</sup>* 并无明显表型出现<sup>[59]</sup>。

### 3 孤雌卤虫的起源与发生机制

人们很早就观察到孤雌卤虫的存在<sup>[17]</sup>, 有时候孤雌卤虫甚至与两性卤虫共存于同一生境<sup>[60-62]</sup>。目前针对孤雌卤虫起源和生殖调控机制的研究主要集中于线粒体/核编码基因标记、系统进化分析方法、同源重组、多倍性、罕见雄体、近缘杂交等方面<sup>[63]</sup>, 本文针对其中的热点研究进行总结。

#### 3.1 孤雌卤虫的起源和分布

关于孤雌生殖的起源, 一直以来有两种主流假说, 其中“古老起源说”(antique origin) 认为最早

的生殖方式就是孤雌, 可以避免雄性个体带来的“双倍代价”, 整体上更节约, 机制上也更符合原始生命状态。实际上在减数分裂出现之前, 只需维持有丝分裂就可以传代, 类似细菌的裂殖和酵母的出芽生殖。支持古老起源假说的物种有介形虫<sup>[64]</sup>、螨虫<sup>[65]</sup>、蛭形轮虫<sup>[66]</sup>等, 这些孤雌生殖模式最早在一亿年前已经出现并一直保持至今。另一种“最近起源说”(recent origin) 认为孤雌生殖是由两性生殖演化而来, 主要证据是在各种不同的动物类群中, 孤雌生殖动物总是占据系统发育树的末端节点, 表明是在更近的时期起源于两性生殖<sup>[67-68]</sup>。

关于孤雌种群如何从两性物种起源, 一般认为存在四种可能的途径<sup>[68]</sup>: 第一, 自发起源(spontaneous origin), 即由于减数分裂中一个或多个基因的突变造成缺陷, 例如水蚤<sup>[20]</sup>和蚜虫<sup>[69]</sup>; 第二, 杂交起源(hybrid origin), 由于近缘物种间的杂交破坏了减数分裂, 例如, 几乎所有的脊椎动物的孤雌生殖都来自于杂交<sup>[70]</sup>, 而在甲壳动物<sup>[71]</sup>和很多昆虫<sup>[72]</sup>等无脊椎动物中也常有发现; 第三, 传播起源(contagious origin), 有些孤雌种群中会产生低比例的罕见雄体, 通过与近缘两性物种的雌性交配产生新的孤雌种群, 例如水蚤<sup>[20]</sup>和蚜虫<sup>[21]</sup>; 第四, 感染起源(infectious origin), 一些细菌如沃尔巴克氏菌(*Wolbachia*)、*Cardinium* 菌和立克次氏体(*Rickettsia*) 的感染会清除雄性子代, 从而导致孤雌现象<sup>[73]</sup>。大部分孤雌种群通过单一方式起源, 但少数孤雌种群也采用多种起源方式, 例如某些介形虫, 其二倍体孤雌种群来源于自发起源, 而多倍体孤雌种群来自杂交起源<sup>[64]</sup>。

一般来说, 二倍体孤雌种群往往与近缘两性物种同域共存(sympatric), 而多倍体孤雌种群的分布会更为广泛, 这种现象称为地理多倍性(geographic polyploidy), 例如象鼻虫<sup>[74]</sup>和介形虫<sup>[75]</sup>。孤雌卤虫的分布遍及世界各地的内陆和海滨盐水环境, 从俄罗斯西伯利亚盐湖到希腊 Megalon Embolon 盐场, 从纳米比亚的斯瓦科普蒙德盐沼(Swakopmund Saltworks) 到马达加斯加的 Antsapano 盐湖, 从澳大利亚的黑德兰港(Port Hedland) 到西班牙的卡沃·德加塔盐田(Cabo de Gata saltpan), 一直到中国的东部和南部海滨盐场, 遍及除南极洲和南北美洲之外的所有大陆(图 1A)。

与前期的研究结果<sup>[5-6]</sup>一致, 本研究团队对于来自中国 and 世界各地卤虫的生物多样性和生物地理学研究结果(图 1B) 支持最近起源说<sup>[9]</sup>, 而且孤雌卤虫至少存在两次独立起源: 主要一支 (*A. partheno-*



*genetica* group 1) 起源于亚洲中部, 最近缘的两性物种为 *A. urmiana*<sup>[9]</sup>, 最新的证据表明二倍体孤雌卤虫也可能与 *A. amati* 更为接近<sup>[11]</sup>; 次要一支 (*A. parthenogenetica* group 2) 零散分布在世界各地 (图 1A), 最近缘的两性物种为 *A. sinica*<sup>[9]</sup>。目前尚没有确凿证据证明孤雌卤虫如何从这两种两性卤虫中分化而来。

### 3.2 孤雌卤虫的染色体多倍性

孤雌生物中会常常观察到染色体的多倍性, 孤雌卤虫也不例外, 虽然大多数种群为二倍体 (2n), 但也存在三倍体 (3n)、四倍体 (4n) 乃至五倍体 (5n) 的种群<sup>[76]</sup>。目前比较确定的是, 多倍体孤雌卤虫通过无融合 (apomixis)、以类似有丝分裂的方式持续繁殖<sup>[76-78]</sup>。二倍体孤雌卤虫进行自融合 (automixis), 但由于自融合种类比较多, 长久以来并无统一定论<sup>[22,79]</sup>, 近年的细胞生物学、群体遗传学等研究结果已经基本确认了二倍体孤雌卤虫中的自融合是一种中心融合 (central fusion)<sup>[13,22,80]</sup>: 卵细胞在第一次减数分裂后期中极核 (central polar nucleus) 发生融合, 配对的姐妹染色单体重新回到赤道板, 通过类似有丝分裂中后期的进程进行后续分裂, 从而保持倍性不变<sup>[13]</sup>。这种方式在配对过程中仍保留了少量的同源重组, 实际上这种中心融合产生的小概率杂合性丢失 (loss of heterozygosity) 也可以解释罕见雄体的来源 (见 3.3 节)。

2022 年, Rode 等<sup>[63]</sup> 针对孤雌卤虫的起源提出了一个新假说: 二倍体孤雌卤虫和多倍体孤雌卤虫均来自于不同两性卤虫 (主要是旧大陆的 *A. urmiana*、*A. sinica*、*A. tibetiana* 和 *A. amati*) 之间的近缘杂交、传播性孤雌和二次回交, 其前提是孤雌卤虫的雌性偶然可以与雄性交配并正常受精, 或利用罕见雄体与近缘外种雌性杂交。具体来说, *A. amati* 与一种未知两性卤虫杂交产生二倍体孤雌卤虫 (Ap2n-urm), 后者与 *A. amati* 回交产生另一类二倍体孤雌卤虫 (Ap2n-kaz), Ap2n-kaz 与 *A. urmiana* 和 *A. sinica* 杂交分别产生三倍体 (Ap3n) 和四倍体孤雌卤虫 (Ap4n), 而 Ap4n 与 *A. tibetiana* 杂交产生五倍体孤雌卤虫 (Ap5n)。作者甚至推测, 多倍体孤雌卤虫的无融合其实是一种类似中心融合 of 自融合, 但他们的证据主要来自于群体遗传学分析和逻辑推理, 仍需实验证据支持 (例如杂交复现孤雌起源)。如果这一假说被证明是正确的, 将颠覆长久以来人们对孤雌卤虫起源机制的认知, 也会将对此问题的解答置于一个更加错综复杂的境地。

### 3.3 孤雌卤虫中的“罕见雄体”

罕见雄体 (rare male) 在专性孤雌动物中广泛存在, 例如线虫<sup>[81]</sup>、蚜虫<sup>[82]</sup>、寄生蜂<sup>[83]</sup>、蓟马<sup>[84]</sup>、水蚤<sup>[21]</sup>、介形虫<sup>[85]</sup>、螺类<sup>[86]</sup> 等, 但其功能和产生机制一直存在争议<sup>[87-88]</sup>。大部分孤雌物种中产生的罕见雄体是无功能的 (non-functional), 可能来自于偶发的松弛选择 (relaxed selection), 最终会通过漂变 (drift) 而被清除<sup>[19]</sup>; 在少数情况下, 罕见雄体是全能可育的 (functionally fertile), 可以与近缘两性种的雌性交配并产生新的孤雌种群 (传播性孤雌), 例如禾谷缢管蚜<sup>[89]</sup> 和普通水蚤<sup>[90]</sup>, 以及本文中的二倍体孤雌卤虫。

人们很早就发现了二倍体孤雌卤虫中的罕见雄体<sup>[91]</sup>, 其发生比例为 0.1%~3.1%, 比如尕海孤雌卤虫中罕见雄体的产生率约为 3.1%<sup>[92]</sup>。有关卤虫中罕见雄体的功能, 早在 1978 年人们就第一次明确观察到孤雌卤虫罕见雄体能够将血红蛋白基因传递至两性卤虫<sup>[93]</sup>。2018 年, Abatzopoulos<sup>[88]</sup> 提出了“隐蔽基因组假说” (hypothesis of hidden genome), 认为孤雌卤虫中的罕见雄体作为携带孤雌决定基因单倍体基因组 (haploid genome) 的载体, 产生于二倍体孤雌的自融合机制, 这种全能性的可育雄体一旦与近缘两性卤虫中的雌性交配, 就可以把孤雌性状传播出去。实际上, 绝大部分拥有罕见雄体的二倍体孤雌卤虫都起源于亚洲的中部, 而这些生境往往同时存在两性卤虫和孤雌卤虫<sup>[60-62]</sup>, 具备传播性孤雌产生和扩散的客观条件。

2005 年, 刘凤岐等<sup>[94]</sup> 研究了尕海孤雌卤虫罕见雄体的形态学特征, 发现其执握器和交配器与 *A. sinica* 雄虫较为相似; 随后, 他们将这一罕见雄体与 *A. sinica* 的雌虫进行杂交, 产生了可育的 F<sub>1</sub> 代和可成活的 F<sub>2</sub> 代<sup>[92]</sup>。2014 年, Maccari 等<sup>[95]</sup> 将二倍体孤雌卤虫的罕见雄体分别与 *A. urmiana*、*A. sinica*、*A. tibetiana* 以及 *A. amati* 四种两性卤虫的雌虫进行杂交, 均可产生可育的 F<sub>1</sub> 代; 而对 F<sub>1</sub> 代进行进一步杂交, 在 F<sub>2</sub> 代中产生了不同比例的孤雌种群, 确认了传播性孤雌的存在。此外, 有研究表明这些罕见雄体卤虫均无法与 *A. salina*、*A. franciscana*、*A. persimilis* 或者同种群孤雌雌体进行杂交<sup>[96-97]</sup>。这些研究都为罕见雄体可以作为近缘物种中传播性孤雌的载体提供了有力的实验证据。

关于孤雌卤虫中罕见雄体的产生机制以及传播机制, 近年来逐渐有了明确解释。2015 年, Nougé 等<sup>[22]</sup> 利用群体遗传学方法, 分析了来自于地中海

西岸的二倍体孤雌卤虫, 确定了这种孤雌表型来源于自融合机制, 而且保留着较低的同源重组率, 推断这种低重组率可能正是罕见雄体产生的原因。2022年, Elkrewi 等<sup>[23]</sup>通过比较不同两性卤虫和孤雌卤虫的基因组片段, 并定位这些基因片段的染色体来源, 发现罕见雄体通过将 W 染色体上部分区域替换成 Z 染色体上的同源片段, 从而恢复性染色体同配化 (ZZ), 而这种 W/Z 的同源重组已被 RAD 测序分析确认<sup>[24]</sup>。据推测, 卤虫中导致孤雌产生的基因片段可能位于 Z 染色体, 由罕见雄体携带并传递给近缘两性卤虫, 实现孤雌的传播<sup>[23]</sup>。

### 3.4 卤虫孤雌发生相关基因研究

随着组学研究的兴起, 研究者们开始利用蛋白质组、基因组和转录组, 试图从整体上揭示两性性和孤雌生殖方式在基因组成和表达上的差异。2009年, Farazmand 等<sup>[97]</sup>对两性卤虫 *A. urmiana* 和乌米尔孤雌卤虫进行了蛋白质组学分析, 获得了 21 个差异表达蛋白, 还有一些未知功能蛋白在孤雌卤虫卵巢中特异性表达。2021年, Huylmans 等<sup>[98]</sup>通过比较两性卤虫 (*A. sinica*、*A. urmiana* 和 *A. amati*) 以及二倍体孤雌种群的转录组, 发现了数百个存在差异表达的基因, 包括一些与减数分裂相关的基因, 但尚未确定哪些基因在两性性和孤雌生殖方式转换中起关键作用。2022年, Elkrewi 等<sup>[23]</sup>深度分析了三种两性卤虫 (*A. franciscana*、*A. sinica* 和 *A. amati*) 以及几种孤雌卤虫的长片段基因组 DNA, 证明二倍体孤雌表型可能由 Z 染色体上的基因座决定。

本团队证明了两性卤虫的卵母细胞发育停滞在

第一次减数分裂中期 (卵子发生晚期), 而孤雌卤虫的卵母细胞发育则是连续的<sup>[13]</sup>。因此, 本团队选取卵子发生晚期的两性卤虫和孤雌卤虫, 进行了种间比较转录组分析, 从中选择了与减数分裂、同源重组相关的差异表达基因, 包括同源重组酶基因 *Dmc1*、DNA 修复蛋白基因 *Rad51*、姐妹染色单体黏连蛋白基因 *Rec8* 和减数分裂恢复相关蛋白激酶基因 *Mos*; 敲低 *Dmc1*、*Rec8* 或者 *Mos* 可使两性卤虫未受精卵产生孤雌激活 (parthenogenetic activation) 现象, 未受精卵经历了不同程度的继续发育, 但都未能顺利发育成个体<sup>[13]</sup>。可能的解释是, 现存的两性卤虫已经失去了单个基因突变导致向孤雌生殖转化的能力, 可能需要多个基因突变的组合才能实现, 也有可能尚未发现最关键的基因。

## 4 结语和展望

卤虫同时拥有两性和孤雌两种生殖方式, 且孤雌种群起源于近缘两性物种, 不同的生殖方式和清晰的演化途径使得卤虫有望成为生殖调控分子机制研究的理想模型。近年来, 随着卤虫基因组序列的测定完成和公开, 世界上各卤虫研究团队 (包括本团队) 在其性别调控和孤雌机制研究方面取得了一系列实质性进展。

本文将目前对于卤虫生殖调控机制的研究进展总结为图 2: 两性卤虫通过 ZW 型性别决定系统, 由性别主控基因调控下游一系列关键基因的雌雄可变剪接 (包括 *Dsx* 等), 最终实现性别分化, 形成等比例的雌雄个体; 孤雌卤虫则分为采用自融合机

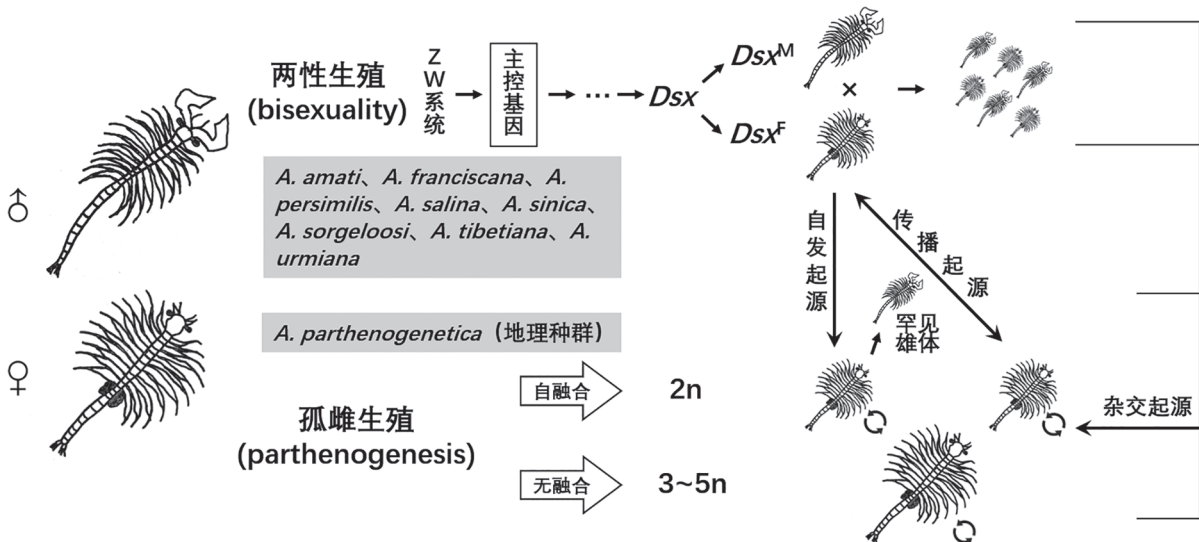


图2 卤虫两性生殖和孤雌生殖机制总结

制的二倍体种群和采用无融合机制的多倍体种群,其孤雌发生的机制可能包含由两性卤虫减数分裂机制突变造成的自发起源、利用罕见雄体作为孤雌基因载体介导的传播起源以及产生于两性物种/孤雌种群间的杂交起源。

随着近年来卤虫 scaffold 级别 (scaffold-level) 和染色体级别 (chromosome-level) 组装基因组陆续解析完成<sup>[23,46,99-100]</sup>, 卤虫性别机制研究拥有了更多的研究手段和分子基础。随着今后研究的不断深入, 以下几个问题亟需解决: (1) 对于性染色体 Z 和 W 上所有基因的完整解析, 包括蛋白质编码基因和调控 RNA 基因, 尤其是后者, 往往以非传统方式起核心作用, 例如家蚕的性别主控 piRNA 基因 *Fem*<sup>[47]</sup>; (2) 近年来对昆虫性别决定机制的揭示, 表明性别主控基因的作用窗口往往只限于胚胎发育的最早期阶段<sup>[47-51]</sup>, 有些物种甚至早在卵裂期性别就已经决定了, 因此取样的时期需要仔细计划; (3) 目前尚缺乏孤雌卤虫完整基因组的染色体级组装, 研究表明罕见雄体的 Z 染色体携带孤雌关键基因<sup>[23]</sup>, 对于两性卤虫和孤雌卤虫 Z 染色体间的比较分析将能提供更多的线索; (4) 目前对于卤虫关键基因的功能鉴定主要依赖 RNAi 敲低表型, 干涉效率的不稳定和彻底会影响对基因功能的判断, 如果能实现基因的完全敲除 (例如利用 CRISPR-Cas9 工具), 再辅以过表达体系的反向验证, 会更有利于揭示这些基因的完整功能。

### 参 考 文 献

- [1] Madkour K, Dawood MAO, Sewilam H. The use of *Artemia* for aquaculture industry: an updated overview. *Ann Anim Sci*, 2023, 23: 3-10
- [2] Abatzopoulos TA, Beardmore JA, Clegg JS, et al. *Artemia*: basic and applied biology[M]. Dordrecht: Springer Dordrecht, 2002
- [3] Asem A, Yang C, Eimanifar A, et al. Phylogenetic analysis of problematic Asian species of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea, Anostraca), with the descriptions of two new species. *J Crust Biol*, 2023, 43: 1-25
- [4] Naganawa H, Mura G. Two new cryptic species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) from Mongolia and the possibility of invasion and disturbance by the aquaculture industry in East Asia. *Crustaceana*, 2017, 90: 1679-98
- [5] Asem A, Eimanifar A, Rastegar-Pouyani N, et al. An overview on the nomenclatural and phylogenetic problems of native Asian brine shrimps of the genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea, Anostraca). *ZooKeys*, 2020, 902: 1-15
- [6] Asem A, Gajardo G, Hontoria F, et al. The species problem in *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca), a genus with sexual species and obligate parthenogenetic lineages. *Zool J Linn Soc*, 2023, 192: 1-8
- [7] Bossier P, Wang X, Catania F, et al. An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp *Artemia* spp. (International Study on *Artemia* LXX). *Aquaculture*, 2004, 231: 93-112
- [8] Baxevanis AD, Kappas I, Abatzopoulos TJ. Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 40: 724-38
- [9] Yang J. Biodiversity and biogeography of *Artemia* spp. from China and other places around the world [C]/FAO. Reports of the FAO Experts Workshop on Sustainable Use and Management of *Artemia* Resources in Asia. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017: 19-20
- [10] Maccari M, Gómez A, Hontoria F, et al. Functional rare males in diploid parthenogenetic *Artemia*. *J Evol Biol*, 2013, 26: 1934-8
- [11] Muñoz J, Gómez A, Green AJ, et al. Evolutionary origin and phylogeography of the diploid obligate parthenogen *Artemia parthenogenetica* (Branchiopoda: Anostraca). *PLoS ONE*, 2010, 5: e11932
- [12] Greenwood J, Gautier J. From oogenesis through gastrulation: developmental regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16: 215-24
- [13] Xu LY, Wu WT, Bi N, et al. A cytological revisit on parthenogenetic *Artemia* and the deficiency of a meiosis-specific recombinase DMC1 in the possible transition from bisexuality to parthenogenesis. *Chromosoma*, 2023, 132: 89-103
- [14] Hopkins BR, Kopp A. Evolution of sexual development and sexual dimorphism in insects. *Curr Opin Genet Dev*, 2021, 69: 129-39
- [15] Chandler JC, Elizur A, Ventura T. The decapod researcher's guide to the galaxy of sex determination. *Hydrobiologia*, 2018, 825: 61-80
- [16] Wilkins AS. Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays*, 1995, 17: 71-7
- [17] Bowen ST, Sterling G. Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 15 *Artemia* populations. *Comp Biochem Physiol B*, 1978, 61: 593-5
- [18] Peck JR, Yearsley JM, Waxman D. Explaining the geographic distributions of sexual and asexual populations. *Nature*, 1998, 391: 889-92
- [19] van der Kooij CJ, Schwander T. On the fate of sexual traits under asexuality. *Biol Rev*, 2014, 89: 805-19
- [20] Innes DJ, Hebert PDN. The origin and genetic basis of obligate parthenogenesis in *Daphnia pulex*. *Evolution*, 1988, 42: 1024-35
- [21] Dedryver CA, Hullé M, Le Gallic JF, et al. Coexistence in space and time of sexual and asexual populations of the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Oecologia*, 2001, 128: 379-88
- [22] Nougé ONO, Rode R, Jabbour-zahab A, et al. Automixis in *Artemia*: solving a century-old controversy. *J Evol Biol*,



- 2015, 28: 2337-48
- [23] Elkrewi M, Khauratovich U, Toups MA, et al. ZW sex-chromosome evolution and contagious parthenogenesis in *Artemia* brine shrimp. *Genetics*, 2022, 222: iyac123
- [24] Boyer L, Jabbour-Zahab R, Joncour P, et al. Asexual male production by ZW recombination in *Artemia parthenogenetica*. *Evolution*, 2023, 77: 1-12
- [25] Hiruta C, Nishida C, Tochinali S. Abortive meiosis in the oogenesis of parthenogenetic *Daphnia pulex*. *Chromosome Res*, 2010, 18: 833-40
- [26] Distechi CM. Dosage compensation of the sex chromosomes. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 535-58
- [27] Russell A, Borrelli S, Fontana R, et al. Evolutionary transition to XY sex chromosomes associated with Y-linked duplication of a male hormone gene in a terrestrial isopod. *Heredity*, 2021, 127: 266-77
- [28] Becking T, Giraud I, Raimond M, et al. Diversity and evolution of sex determination systems in terrestrial isopods. *Sci Rep*, 2017, 7: 1084
- [29] Juchault P, Rigaud T. Evidence for female heterogamety in two terrestrial crustaceans and the problem of sex chromosome evolution in isopods. *Heredity*, 1995, 75: 466-71
- [30] Chandler JC, Fitzgibbon QP, Smith G, et al. Y-linked *iDmrt1* paralogue (*iDMY*) in the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*: the first invertebrate sex-link *Dmrt*. *Dev Biol*, 2017, 430: 337-45
- [31] Mlinarec J, Porupski I, Maguire I, et al. Comparative karyotype investigations in the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* species complex and stone crayfish *A. torrentium* (Decapoda: Astacidae). *J Crust Biol*, 2016, 36: 87-93
- [32] Fang S, Zhang Y, Shi X, et al. Identification of male-specific SNP markers and development of PCR-based genetic sex identification technique in crucifix crab (*Charybdis feriatus*) with implication of an XX/XY sex determination system. *Genomics*, 2020, 112: 404-11
- [33] Cui Z, Hui M, Liu Y, et al. High-density linkage mapping aided by transcriptomics documents ZW sex determination system in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Heredity*, 2015, 115: 206-15
- [34] Jones DB, Nguyen HT, Khatkar MS, et al. The identification of a major sex QTL in the white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2020, 529: 735673
- [35] Wang Y, Yu Y, Li S, et al. Analysis of a sex-biased sequence in sex determination region and exploitation of a fast sex detection method in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2021, 543: 736922
- [36] Li YT, Dierens L, Byrne K, et al. QTL detection of production traits for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* (Bate) using AFLP markers. *Aquaculture*, 2006, 258: 198-210
- [37] Staelens J, Rombaut D, Vercauteren I, et al. High-density linkage maps and sex-linked markers for the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Genetics*, 2008, 179: 917-25
- [38] Ventura T, Aflalo ED, Weil S, et al. Isolation and characterization of a female-specific DNA marker in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Heredity*, 2011, 107: 456-61
- [39] Parnes S, Khalaila I, Hulata G, et al. Sex determination in crayfish: are intersex *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae) genetically females? *Genet Res*, 2003, 82: 107-16
- [40] Jin L, Jia S, Zhang W, et al. Identification of sex-specific DNA markers: providing molecular evidence for the ZW sex determination system in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture*, 2022, 546: 737254
- [41] Stefani R. La digametia femminile in *Artemia salina* Leach e la costituzione del corredo cromosomico nei biotitici diploidi anfigonico e diploide partenogenetico. *Caryologia*, 1963, 16: 625-36
- [42] Parraguez M, Gajardo G, Beardmore JA. The New World *Artemia* species *A. franciscana* and *A. persimilis* are highly differentiated for chromosome size and heterochromatin content. *Hereditas*, 2009, 146: 93-103
- [43] 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. *PLoS ONE*, 2013, 8: e57585
- [44] Huylmans AK, Toups MA, Macon A, et al. Sex-biased gene expression and dosage compensation on the *Artemia franciscana* Z-chromosome. *Genome Biol Evol*, 2019, 11: 1033-44
- [45] Han X, Ren Y, Ouyang X, et al. Construction of a high-density genetic linkage map and QTL mapping for sex and growth traits in *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 2021, 540: 736692
- [46] Bett VK, Macon A, Vicoso B, et al. Chromosome-level assembly of *Artemia franciscana* sheds light on sex chromosome differentiation. *Genome Biol Evol*, 2024, 16: evae006
- [47] Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, et al. A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 2014, 509: 633-6
- [48] Hall AB, Basu S, Jiang X, et al. A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 2015, 348: 1268-70
- [49] Krzywinska E, Dennison NJ, Lycett GJ, et al. A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 2016, 353: 67-9
- [50] Meccariello A, Salvemini M, Primo P, et al. Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests. *Science*, 2019, 365: 1457-60
- [51] Zou Y, Geuverink E, Beukeboom LW, et al. A chimeric gene paternally instructs female sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia*. *Science*, 2020, 370: 1115-8
- [52] De Vos S. Genomic tools and sex determination in the extremophile brine shrimp *Artemia franciscana*[D]. Ghent: Ghent University, 2014
- [53] Valenzuela-Miranda D, Gallardo-Escárate C, Valenzuela-Munoz V, et al. Sex-dependent transcriptome analysis and single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Mar Genomics*, 2014, 18: 151-4

- [54] Jo E, Lee SJ, Choi E, et al. Sex-biased gene expression and isoform profile of brine shrimp *Artemia franciscana* by transcriptome analysis. *Animals (Basel)*, 2021, 11: 2630
- [55] Li DR, Ye HL, Yang JS, et al. Identification and characterization of a *Masculinizer (Masc)* gene involved in sex differentiation in *Artemia*. *Gene*, 2017, 614: 56-64
- [56] 曾辉, 宋文芹, 陈瑞阳. 卤虫中编码DM结构域的DNA序列的克隆和初步研究(简报). *实验生物学报*, 2004, 37: 423-7
- [57] Farazmand A, Inanloo K, Agh N. Expression of DMRT family genes during gonadal differentiation in two species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) from Urmia Lake (Iran). *Crustaceana*, 2010, 83: 1153-65
- [58] Viet DN, Christiaens O, De Vos S, et al. The sex-specific splicing of *Doublesex* in brine shrimp *Artemia franciscana*. *Genes*, 2022, 13: 1997
- [59] Wu WT, Xu LY, Yan ZJ, et al. Identification and characterization of the *Doublesex* gene and its mRNA isoforms in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biochem J*, 2023, 480: 385-401
- [60] Mura G, Kappas I, Baxeavanis AD, et al. Morphological and molecular data reveal the presence of the invasive *Artemia franciscana* in Margherita di Savola salterns (Italy). *Int Rev Hydrobiol*, 2006, 91: 539-54
- [61] Agh N, Abatzopoulos TJ, Kappas I, et al. Coexistence of sexual and parthenogenetic *Artemia* populations in Lake Urmiana and neighbouring lagoons. *Int Rev Hydrobiol*, 2007, 92: 48-60
- [62] Baxeavanis AD, Maniatsi S, Kouroupis D, et al. Genetic identification of South African *Artemia* species: invasion, replacement of co-occurrence. *J Mar Biol Assoc UK*, 2014, 94: 775-85
- [63] Rode NO, Jabbour-Zahab R, Boyer L, et al. The origin of asexual brine shrimp. *Am Nat*, 2022, 200: E52-76
- [64] Chaplin JA, Havel JE, Hebert PDN. Sex and ostracods. *Trends Ecol Evol*, 1994, 9: 435-9
- [65] Heethoff M, Domes K, Laumann M, et al. High genetic divergences indicate ancient separation of parthenogenetic lineages of the oribatid mite *Platynothrus peltifer* (Acari, Oribatida). *J Evol Biol*, 2007, 20: 392-402
- [66] Welch DM, Meselson M. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, 2000, 288: 1211-5
- [67] Engelstadter J. Constraints on the evolution of asexual reproduction. *Bioessays*, 2008, 30: 1138-50
- [68] Simon JC, Delmotte F, Rispe C, et al. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biol J Linn Soc*, 2003, 79: 151-63
- [69] Simon JC, Rispe C, Sunnucks P. Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends Ecol Evol*, 2002, 17: 34-9
- [70] Avise JC, Quattro JM, Vrijenhoek RC. Molecular clones within organismal clones: mitochondrial DNA phylogenies and the evolutionary histories of unisexual vertebrates[M]// Hecht MK, Wallace B, Macintyre RJ. *Evolutionary biology*, volume 26. New York: Plenum Press, 1992: 225-46
- [71] Martin P, Dorn NJ, Kawai T, et al. The enigmatic Marmorokreb (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870). *Contrib Zool*, 2010, 79: 107-18
- [72] Normark BB. Phylogeny and evolution of parthenogenetic weevils of the *Aramigus tessellatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini): evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 1996, 50: 734-45
- [73] Ma WJ, Schwander T. Patterns and mechanisms in instances of endosymbiont-induced parthenogenesis. *J Evol Biol*, 2017, 30: 868-88
- [74] Stenberg P, Lundmark M, Knutelski S, et al. Evolution of clonality and polyploidy in a weevil system. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 1626-32
- [75] Adolfsson S, Michalakis Y, Paczesniak D, et al. Evaluation of elevated ploidy and asexual reproduction as alternative explanations for geographic parthenogenesis in *Eucypris virens* ostracods. *Evolution*, 2009, 64: 986-97
- [76] Barigozzi C. *Artemia*: A survey of its significance in genetics problems[M]//Dobshansky Y, Hetch MK, Steerre WC. *Evolutionary biology*, volume 7. New York: Plenum Press, 1974: 221-52
- [77] Barigozzi C. *Cytogenetics and speciation of the brine shrimp Artemia*[M]. Roma: Accademia Nazionale dei Lincei, 1990: 57-84
- [78] Maniatsi S, Baxeavanis AD, Kappas I, et al. Is polyploidy a persevering accident or an adaptive evolutionary pattern? The case of the brine shrimp *Artemia*. *Mol Phylogenet Evol*, 2011, 58: 353-64
- [79] Narbel-Hofstetter M. *Les alterations de la meiose chez les animaux parthenogenetiques*[M]. Vienna: Springer, 1964
- [80] Boyer LR, Zahab M, Mosna C, et al. Not so clonal asexuals: unraveling the secret sex life of *Artemia parthenogenetica*. *Evol Lett*, 2021, 5: 164-74
- [81] Snyder DW, Opperman CH, Bird DM. A method for generating *Meloidogyne incognita* males. *J Nematol*, 2006, 38: 192-4
- [82] Rispe C, Bonhomme J, Simon JC. Extreme life-cycle and sex ratio variation among sexually produced clones to the aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). *Oikos*, 1999, 25: 254-64
- [83] Sandrock C, Vorburger C. Single-locus recessive inheritance of asexual reproduction in a parasitoid wasp. *Curr Biol*, 2011, 21: 433-7
- [84] van der Kooij CJ, Schwander T. Evolution of asexuality via different mechanisms in grass thrips (Thysanoptera: Aptinothrips). *Evolution*, 2014, 68: 1883-93
- [85] Smith RJ, Kamiya T, Horne DJ. Living males of the "ancient asexual" Darwinulidae (Ostracoda: Crustacea). *Proc Roy Soc B Biol Sci*, 2006, 273: 1569-78
- [86] Neiman M, Larkin K, Thompson AR, et al. Male offspring production by asexual *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand snail. *Heredity*, 2012, 109: 57-62
- [87] Engelstädter J. Asexual but not clonal: evolutionary processes in automatic populations. *Genetics*, 2017, 206:

- 993-1009
- [88] Abatzopoulos TJ. The repeated emergence of asexuality, the hidden genomes and the role of parthenogenetic rare males in the brine shrimp *Artemia*. *J Biol Res*, 2018, 25: 1-5
- [89] Delmotte F, Leterme N, Bonhomme J, et al. Multiple routes to asexuality in an aphid species. *Proc R Soc London Ser B*, 2001, 268: 2291-9
- [90] Paland S, Colbourne JK, Lynch M. Evolutionary history of contagious asexuality in *Daphnia pulex*. *Evolution*, 2005, 59: 800-13
- [91] von Siebold CTE. Beiträge zur parthenogenesis der arthropoden[M]. Leipzig: W. Engelmann, 1871
- [92] 刘凤岐, 相建海, 刘国民, 等. 尕海孤雌生殖卤虫罕见雄体的培养及其与中华卤虫的杂交. *南开大学学报(自然科学版)*, 2007, 40: 24-7
- [93] Bowen ST, Durkin JP, Sterling G, et al. *Artemia* hemoglobins: genetic variation in parthenogenetic and zygogenetic populations. *Biol Bull*, 1978, 155: 273-87
- [94] 刘凤岐, 相建海, 郭世宜, 等. 尕海孤雌生殖卤虫罕见雄体前突和刺状突的形态特征. *南开大学学报(自然科学版)*, 2005, 38: 124-6
- [95] Maccari M, Amat F, Hontoria F, et al. Laboratory generation of new parthenogenetic lineages supports contagious parthenogenesis in *Artemia*. *PeerJ*, 2014, 2: e439
- [96] 郑波. 16产地中国卤虫形态学与生殖隔离研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004
- [97] Farazmand A, Inanloo K, Motamed N. Comparison of the protein profile of the productive system between bisexual and parthenogenetic species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana*, 2009, 82: 1237-48
- [98] Huylmans AK, Macon A, Hontoria F, et al. Transition to asexuality and evolution of gene expression in *Artemia* brine shrimp. *Proc R Soc B*, 2021, 288: 20211720
- [99] De Vos S, Rombauts S, Coussement L, et al. The genome of the extremophile *Artemia* provides insight into strategies to cope with extreme environments. *BMC Genomics*, 2021, 22: 635
- [100] Jo E, Lee SJ, Choi E, et al. Whole genome survey and microsatellite motif identification of *Artemia franciscana*. *Biosci Rep*, 2021, 41: BSR20203868