

文章编号: 1000-0615(2016)06-0911-06

DOI: 10.11964/jfc.20151210187

## 脉红螺交配后的性选择机制

于红, 孙晓琪, 于瑞海, 李琪\*

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东青岛 266003)

**摘要:** 交配后性选择是雌性混交动物中的一种普遍现象, 其选择机制较为复杂, 是性选择研究领域中的重点和难点问题。脉红螺是我国重要的大型经济贝类之一, 繁殖形式为多雌多雄混交模式。为了研究该模式繁殖机制, 本研究利用6个微卫星标记及行为学观察对脉红螺3个家系进行父权分析。结果表明, 3个家系均存在多父性现象, 证实脉红螺繁殖属于真正遗传意义上的雌性混交模式。3个家系中父权比例与父本的6个形态学参数及交配持续时间不存在关联性, 但均表现出最先与母本交配的父本其后代比例最高, 而最后交配的父本其后代比例最低, 表明脉红螺交配后性选择存在最先雄性精子优先受精现象, 这一现象符合“topping off”假说, 即最先交配的雄性排放了大量精子占据了受精囊的主要空间, 导致其子代的比例最高; 而最后交配的雄性由于受精囊空间的限制, 其精子占据空间最少。本研究为海洋无脊椎动物的交配后性选择机制研究提供重要参考资料。

**关键词:** 脉红螺; 交配后性选择; 雄性精子优先受精; 父权比例

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

性选择(sexual selection)是指在有性生殖环境下对增加动物生殖成功性状的选择, 是自然选择的一种特殊形式<sup>[1]</sup>。性选择是动物提高自身繁殖成功率的重要行为之一, 既存在交配前形态个体水平的性选择, 也存在交配后精卵之间的性选择。交配后性选择(postcopulatory sexual selection)是雌性混交动物(一雌多雄或多雌多雄)中的一种普遍现象, 包括雄性间的精子竞争以及雌性对精子的隐性选择<sup>[2-3]</sup>, 其选择机制较为复杂, 是性选择研究领域中的重点和难点问题。目前, 关于交配后性选择机制的假说主要有优中选优、精子竞争、避险策略和遗传不相容<sup>[4-5]</sup>, 但是这些假说主要基于陆生动物的性选择机制研究, 水生动物交配后性选择机制研究相对较少, 主要集中在部分鱼类和甲壳类<sup>[6-8]</sup>, 有关贝类交配后性选择机制研究尚未见报道。

脉红螺(*Rapana venosa*)俗称“海螺”, 隶属软体动物门、腹足纲、新腹足目、骨螺科、红螺属, 广泛分布在我国渤海和黄海潮间带至水深约20 m的岩石岸及泥沙质的浅海, 具有较高的经济价值<sup>[9]</sup>。脉红螺为雌雄异体, 体内受精, 繁殖形式为多雌多雄的混交模式<sup>[10]</sup>。学者们研究发现脉红螺不存在性别二态性现象, 交配前并未发现以外部形态特征作为选择依据<sup>[10]</sup>。然而, 目前有关脉红螺性选择机制研究还仅局限于交配前的性选择观察研究, 有关脉红螺交配后是否存在精子竞争或雌性是否对精子存在隐性选择等现象未见报道。对于观察到的脉红螺多重交配行为是否代表多重受精成功, 是否属于真正遗传意义上的雌性混交动物, 还有待于进一步验证。

真正遗传意义上的雌性混交动物, 其后代中应存在多父性现象。多父性水平也是验证交配

收稿日期: 2015-12-06 修回日期: 2016-02-06

资助项目: 国家科技支撑计划(2011BAD13B01); 国家自然科学基金(31201998); 国家海洋公益性行业科研专项(201305005)

通信作者: 李琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

后性选择机制的重要依据,但是多父性现象通过个体直接观察很难判断。利用分子标记进行亲权检验,可以检测雌性混交动物中雄性的实际生殖成效,检验动物的交配模式,并协助验证交配后性选择机制假说。微卫星DNA标记具有多态性高、共显性、基因组DNA用量少、易检测和重复性好等优点,是理想的亲权鉴定标记。近年来,微卫星标记在父权鉴定中得到广泛应用<sup>[11-14]</sup>,推动了交配后性选择机制研究进程。

本研究利用6个微卫星DNA标记对脉红螺幼虫进行父权鉴定与分析,结合交配行为观察分析父权比例与父本交配次序、交配持续时间、个体大小的相关性,探讨脉红螺交配后性选择机制,为脉红螺种质资源保护及人工繁育提供科学依据和理论指导,为海洋无脊椎动物性选择机制及物种进化等研究提供基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 亲螺采集及暂养

实验用脉红螺亲螺于2012年购自日照海区自然采捕的成体,共44只,每只亲螺用防水材料在壳上做好编号,以便观察记录。使用数显电子游标卡尺测量亲螺的壳高、螺旋部高、体螺层高、壳口宽、厣宽和厣高6个形态参数,精确至0.01 mm。亲螺置于烟台海益苗业有限公司进行暂养促熟,养殖水体25 m<sup>3</sup>,水温21~23 °C。暂养期间,投喂四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、紫贻贝(*Mytilus edulis*)等鲜活饵料,每日清底1次,日换水2次,每次换水1/2,连续充气,盐度为29~31。

### 1.2 交配与产卵

亲螺暂养2~4 d后,开始交配。观察交配现象,判断雌雄,记录交配个体、交配时间及产卵时间。

### 1.3 孵化与幼虫取样

卵袋产出后,将卵袋从网箱上剥离下来,放入培育池中进行孵化。孵化过程中,卵袋由黄色逐渐变为黑色。孵化过程中,日换水1次,每

次换水1/2,连续充气,水温23~25 °C,盐度为29~31。

随机选取3个母本所产的卵簇(多个卵袋)进行研究,每个卵簇各随机选取3个卵袋,将卵袋剪开,收集幼虫放于1.5 mL离心管中,加95%酒精固定保存,以备DNA提取。

### 1.4 亲螺解剖及DNA提取

待亲螺交配产卵结束后,把所有的44只亲螺解剖判别性别,观察生殖腺,生殖腺为淡黄色为精巢,桔黄色为卵巢,具有交接突起的为雄性,没有交接突起的为雌性。

每个亲螺各取腹足肌肉100 mg,切成细末,采用酚/氯仿法提取基因组DNA。每个样本加入裂解缓冲液400 μL(6 mol/L 尿素,10 mmol/L Tris-HCl,125 mmol/L NaCl,1% SDS,10 mmol/L EDTA,pH 7.5),蛋白酶K 10 μL(20 mg/mL),37 °C消化过夜。用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)提取3次。等体积的氯仿和异戊醇混合液(氯仿:异戊醇=24:1)提取2次。然后加入2倍体积预冷的无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤2遍后干燥,TE溶解。使用NanoDrop2000微量分光光度计测定DNA浓度和纯度,母液-20 °C保存备用,工作液浓度稀释至100 ng/μL。

### 1.5 幼虫DNA提取

从采集的9个卵袋中,分别随机选取70个幼虫提取DNA,依照Li等<sup>[15]</sup>方法中的Chelex法提取。每个幼虫置于200 μL灭菌PCR管中,加入20 μL 10% Chelex-100,2 μL 1×TE缓冲液和0.5 μL 20 mg/μL的蛋白酶K。55 °C裂解2 h,100 °C变性10 min,4 °C保存。

### 1.6 微卫星标记分析

从Sun等<sup>[16]</sup>和Xue等<sup>[17]</sup>开发的脉红螺微卫星标记中,选取多态性高的6个位点用于父权分析,分别为RV009、RV012、RV019、RV029、RV030、Rven13。PCR反应体系为10 μL,含0.25 U Taq DNA聚合酶,2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1×PCR Buffer,0.2 mmol/L dNTP混合液,1 μmol/L引物和1 μL模板DNA。亲螺PCR反应条件:94 °C预变性3 min,35个循环(94 °C变性45 s,最适退火温度45 s,72 °C延伸45 s),最后72 °C延伸5 min。幼虫PCR反应条件:94 °C预变性3 min,7个循环

(94 °C变性1 min, 退火温度30 s, 72 °C延伸30 s), 28个循环(94 °C 30s, 退火温度30 s, 72 °C 30 s), 最后72 °C延伸5 min。PCR产物采用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 硝酸银法染色。10 bp DNA ladder作为Marker检测等位基因的大小, 为确保读数的准确性, 用同一个参照样品在每一次电泳中作为对照。

### 1.7 数据分析

使用软件CERVUS 3.0对幼虫进行父权鉴定并进行父权比例分析<sup>[18]</sup>, 采用*t*检验检测父权比例与父本的6个形态参数的关联性。

## 2 结果

### 2.1 亲螺形态学参数

44个亲螺共有雌性20个、雄性24个。雌螺平均壳高、体螺层高、螺旋部高、壳口宽、厣宽和厣高分别为94.79、79.39、15.4、42.16、45.54和28.9 cm, 雄螺分别为92.49、78.54、13.95、42.9、45.6和29.7 cm。雌螺和雄螺6个形态学参数之间不存在显著性差异( $P>0.05$ )。

### 2.2 微卫星标记在父权分析中的模拟结果

选取的6个微卫星标记等位基因数为5~14个, 观测杂合度为0.600~0.834, 期望杂合度为0.607~0.919, 6个位点无显著性连锁现象( $P>0.05$ ), 且都符合Hardy-Weinberg平衡。用6个位点进行父权鉴定模拟分析, 累计排除率为99%(表1)。

### 2.3 父权分析

使用软件CERVUS分别对3个家系(A、B、C)

的幼虫及24个父本(M1~M24)进行父权鉴定分析, 结果显示A家系中幼虫共来源于2个父本(M1、M2), 其中M1的子代比例为59.3%, M2的子代比例为40.7%; B家系中幼虫共来源于3个父本(M3、M4、M5), 对应的子代比例分别为40.30%、36.97%和22.73%; C家系中幼虫共来源于3个父本(M6、M7、M8), 对应的子代比例分别为42.27%、35.67%和22.06%。

### 2.4 父权比例与父本外部形态的关联分析

比较3个家系中子代比例最高的父本(M1、M3、M6)与其他5个父本(M2、M4、M5、M7、M8)的6个形态学参数, 结果显示2组父本间6个形态学参数均未出现显著性差异( $P>0.05$ ), 表明父权比例与父本的外部形态没有关联性。

### 2.5 父权比例与父本交配顺序的关联分析

通过交配观察, 发现与A家系中父本的交配顺序为M1、M2; B家系中父本的交配顺序为M3、M4和M5; C家系中父本的交配顺序为M6、M7和M8。3个家系中幼虫的父权比例分析结果均显示最先与母本交配的父本其后代比例最高, 而最后交配的父本其后代比例最低。

### 2.6 父本比例与父本交配持续时间的关联分析

通过对3个家系8个父本的交配持续时间进行观察, 发现交配持续时间小于24 h的父本有2个(M2、M7), 持续时间在48~72 h的父本有1个(M4), 其余父本的交配持续时间为24~48 h(表2)。通过各个家系的父权比例分析, 未发现父权比例与父本交配持续时间存在明显的关联性。

表1 脉红螺6个微卫星位点的综合信息

Tab. 1 The information of the six microsatellite markers for *R. venosa*

位点 locus	片段长度/bp length	等位基因数/个 number of alleles	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	排除概率 probability of exclusion
Rv009	254~266	5	0.667	0.698	0.649
Rv012	257~284	10	0.600	0.855	0.759
Rv019	175~217	14	0.700	0.919	0.817
Rv029	211~229	8	0.800	0.838	0.630
Rv030	248~268	5	0.667	0.607	0.660
Rven13	295~319	11	0.834	0.867	0.707
总位点 total locus			0.711	0.797	0.990

表2 脉红螺交配持续时间

Tab. 2 The mating duration time of *R. venosa*

交配持续时间/h mating duration time	配对 mating
<24	A*M2, C*M7
24~48	A*M1, B*M3, B*M5, C*M6, C*M8
48~72	B*M4

### 3 讨论

本研究利用6个微卫星DNA标记对脉红螺幼虫进行父权分析, 父权鉴定模拟分析结果显示6个微卫星标记的累计排除率为99%, 可以用于父权鉴定。3个家系中每个家系的父本数为2~3个, 与交配时观察到的结果一致。这证实脉红螺幼虫存在多父性现象, 参与交配的雄性均产生了生殖成效, 属于真正遗传意义上的雌性混交动物。雌性混交现象在腹足类中较为普遍, 例如滨螺(*Littorina saxatilis*)、加州海兔(*Aplysia californica*)、履螺(*Crepidula coquimbensis*)等腹足类中均报道过雌性混交现象的存在<sup>[13, 19-20]</sup>。

交配后性选择是雌性混交动物性选择中的一种普遍现象, 包括雄性间的精子竞争以及雌性对精子的隐性选择。本研究通过对脉红螺幼虫父权比例进行分析, 发现同一家系中父权比例分布不均, 且表现为最先与母本交配的父本其后代比例最高, 最后交配的父本其后代比例最低。该结果说明脉红螺存在交配后性选择现象, 其精子竞争模式表现为最先雄性精子优先受精(first-male sperm precedence)。这种现象在栉足蛛(*Anelosimus studiosus*)<sup>[21]</sup>、粗皮渍螈(*Taricha granulosa*)<sup>[22]</sup>和大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[23]</sup>中也有所报道。

精子竞争模式分为3种类型: 最先雄性精子优先受精, 最后雄性精子优先受精(last-male sperm precedence), 雄性精子随机受精(no male sperm precedence)<sup>[24]</sup>。在昆虫中, 最后雄性精子优先受精较为普遍, Gwynne<sup>[25]</sup>通过对37种昆虫的精子竞争模式进行分析, 发现72.9%的种类为最后雄性精子优先受精, 18.9%为最先雄性精子优先受精, 8.2%为雄性精子随机受精。目前大多数的假说都是针对雄性精子优先受精提出的, 如精子分层假说、精子失能假说、精子取代假说等<sup>[24]</sup>。有关最先雄性精子优先受精机制的研究

相对较少, 主要有“topping off”假说<sup>[22]</sup>。该假说认为雌性在与第一个雄性交配之后获得了大量的精子, 但是受精囊中还有剩余空间, 所以雌性可以继续与其他的雄性再进行交配, 直至受精囊全部被填满之后不再继续进行交配, 而进入受精囊的精子能够自由地混合。目前该假说主要在脊椎动物中有所报道<sup>[22]</sup>。

本研究结果显示脉红螺存在最先雄性精子优先受精现象, 通过父本的形态学比较分析未发现显著的形态学与父权比例关联性, 父权比例与父本的交配持续时间也无明显的相关性, 因此推测脉红螺的最先雄性精子优先受精机制符合“topping off”假说, 即最先交配的雄性排放了大量精子占据了受精囊的主要空间, 导致其子代的比例最高; 而最后交配的雄性由于雌性受精囊空间的限制, 其排放的精子被存储得最少。

本研究首次报道了脉红螺交配后性选择现象, 利用6个微卫星DNA标记进行父权比例分析及交配行为观察, 确定了脉红螺交配后精子竞争模式为最先雄性精子优先受精, 这为揭示脉红螺交配后性选择机制研究提供了重要线索, 也为海洋无脊椎动物的性选择机制研究提供了基础资料。

#### 参考文献:

- [1] Darwin C. The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex[M]. London: John Murray, 1871.
- [2] Birkhead T R, Pizzari T. Postcopulatory sexual selection[J]. Nature Reviews Genetics, 2002, 3(4): 262-273.
- [3] Evans J P, Zane L, Francescato S, et al. Directional postcopulatory sexual selection revealed by artificial insemination[J]. Nature, 2003, 421(6921): 360-363.
- [4] Jennions M D, Petrie M. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits[J]. Biological Reviews, 2000, 75(1): 21-64.
- [5] Beebe T J C, Rowe G. An Introduction to Molecular Ecology[M]. New York: Oxford University Press, 2008.
- [6] Fitzpatrick J L, Earn D J D, Bucking C, et al. Postcopulatory consequences of female mate choice in a fish with alternative reproductive tactics[J]. Behavioral Ecology, 2016, 27(1): 312-320.

- [7] Devigili A, Evans J P, Di Nisio A, *et al.* Multivariate selection drives concordant patterns of pre- and postcopulatory sexual selection in a livebearing fish[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8291.
- [8] Peretti A V, Aisenberg A. *Cryptic Female Choice in Arthropods*[M]. Berlin Heidelberg: Springer International Publishing, 2015: 203–237.
- [9] 齐钟彦. 中国经济软体动物[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.  
Qi Z Y. *Economic Mollusca of China*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese).
- [10] 孙晓琪, 于红, 于瑞海, 等. 脉红螺形态学参数分析及其交配行为的观察[J]. *中国海洋大学学报*, 2015, 45(8): 26–31.  
Sun X Q, Yu H, Yu R H, *et al.* A preliminary study on the mating mode and sexual choice before copulation of *Rapana venosa*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(8): 26–31 (in Chinese).
- [11] Brante A, Fernández M, Viard F. Microsatellite evidence for sperm storage and multiple paternity in the marine gastropod *Crepidula coquimbensis*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 396(2): 83–88.
- [12] Mäkinen T, Panova M, André C. High levels of multiple paternity in *Littorina saxatilis*: hedging the bets[J]. *Journal of Heredity*, 2007, 98(7): 705–711.
- [13] Paterson I G, Partridge V, Buckland-Nicks J. Multiple paternity in *Littorina obtusata* (Gastropoda, Littorinidae) revealed by microsatellite analyses[J]. *Biological Bulletin*, 2001, 200(3): 261–267.
- [14] Walker D, Power A J, Sweeney-Reeves M, *et al.* Multiple paternity and female sperm usage along egg-case strings of the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca; Melongenidae)[J]. *Marine Biology*, 2007, 151(1): 53–61.
- [15] Li Q, Park C, Kijima A. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae[J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(5): 883–889.
- [16] Sun X Q, Yu H, Yu R H, *et al.* Characterization of 57 microsatellite loci for *Rapana venosa* using genomic next generation sequencing[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2014, 6(4): 941–945.
- [17] Xue D X, Zhang T, Liu J X. Isolation and characterization of 24 polymorphic microsatellite loci for the veined rapa whelk, *Rapana venosa*[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2014, 6(1): 131–133.
- [18] Slate J, Marshall T, Pemberton J. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9(6): 801–808.
- [19] Panova M, Boström J, Hofving T, *et al.* Extreme female promiscuity in a non-social invertebrate species[J]. *PLoS One*, 2012, 5(3): e9640.
- [20] Angeloni L, Bradbury J W, Burton R S. Multiple mating, paternity, and body size in a simultaneous hermaphrodite, *Aplysia californica*[J]. *Behavioral Ecology*, 2003, 14(4): 554–560.
- [21] Jones T C, Parker P G. First male sperm precedence in multiply-mated females of the cooperative spider *Anelosimus studiosus* (Araneae, Theridiidae)[J]. *Journal of Arachnology*, 2008, 36(3): 527–532.
- [22] Jones A G, Adams E M, Arnold S J. Topping off: a mechanism of first-male sperm precedence in a vertebrate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(4): 2078–2081.
- [23] Yeates S, Searle J, Ward R G, *et al.* A two-second delay confers first-male fertilization precedence within *in vitro* sperm competition experiments in Atlantic salmon[J]. *Journal of Fish Biology*, 2007, 70(1): 318–322.
- [24] 王会琴, 李金钢. 昆虫精子竞争的研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2011, 17(9): 41–44.  
Wang H Q, Li J G. Advances of research the sperm competition of insect[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2011, 17(9): 41–44 (in Chinese).
- [25] Gwynne D T. Male mating effort, confidence of paternity, and insect sperm competition[M]//Smith R L. *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. London: Academic Press, 1984.

## Mechanism of postcopulatory sexual selection in *Rapana venosa*

YU Hong, SUN Xiaoqi, YU Ruihai, LI Qi\*

(Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Postcopulatory sexual selection is a common phenomenon in polyandry species. The mechanism of postcopulatory sexual selection is complicated, and it is the key and difficult topics in sexual selection. *Rapana venosa* is one of the most important commercial molluscs in China, whose females mate with multiple males. In this study, paternity analysis was performed in three families of *R. venosa* using microsatellite markers and behavior observation. Multiple paternity was observed in all the three families, suggesting that *R. venosa* was genetic polyandry. There was no correlation between six morphological parameters of males and paternity ratios, and no correlation between the mating duration and paternity ratios. The results showed that the first mating male had most progeny and the last mating male had least progeny. *R. venosa* exhibited first-male sperm precedence. This pattern of sperm precedence was consistent with the hypothesis of "topping off", in which a female accepts a large amount of sperm from her first mate, and, if additional space remains in her spermathecae, she then seeks additional mates until she has no need for further sperm. This study provides important information for the studies on mechanism of postcopulatory sexual selection in marine invertebrates.

**Key words:** *Rapana venosa*; postcopulatory sexual selection; male sperm precedence; paternity ratio

**Corresponding author:** LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn

**Funding projects:** Scientific and Technical Supporting Program (2011BAD13B01); National Natural Science Foundation (31201998); National Marine Public Welfare Research Program (201305005)