



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106614188 B

(45)授权公告日 2019.09.13

(21)申请号 201611201014.5

审查员 孙乐

(22)申请日 2016.12.22

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106614188 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(73)专利权人 中国科学院南海海洋研究所

地址 510301 广东省广州市新港西路164号

(72)发明人 黄文 陈廷 任春华 江晓

王艳红 胡超群

(74)专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司

公司 44001

代理人 刘明星

(51)Int.Cl.

A01K 61/59(2017.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法。本发明针对现有的凡纳滨对虾家系制备技术的缺陷,设计通过非定向交尾、剪取对虾胡须组织提取DNA、取产卵后雌虾纳精囊中的剩余精英作为父本来源的依据等方法,利用目前较为成熟的微卫星亲子鉴定技术确定父母本个体,制备出全同胞家系。本发明的方法采用非定向随机交配效率高与微卫星亲子鉴定准确率高相结合的方法,弥补了现有凡纳滨对虾家系制备技术的不足,将有利于凡纳滨对虾遗传育种工作的进行。



1. 一种非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、亲本选择:选择雄虾20g以上,雌虾30g以上的健康个体作为亲本;

b、亲本处理:去除雌虾一侧眼柄,雄虾不去除眼柄,将所有雌虾与雄虾个体的一侧胡须靠近根部剪下,剪下的胡须分别单独保存;

c、亲虾饲养:将步骤b的雌虾和雄虾分别在雌虾池和雄虾池中饲养;

d、亲虾交配:在上午将步骤c中的性腺饱满的雌虾放入雄虾池,使之自由追逐、交配;

e、雌虾挑选:当晚18时至21时,全部捞出雄虾池中的雌虾进行逐个检查,将雌虾纳精囊中具有饱满精荚的雌虾放在单独的水体中产卵,微充气;将纳精囊中没有精荚或精荚位置偏离纳精囊的雌虾全部放回雌虾池中;

f、产卵处理:发现雌虾产卵后立即捞出,将产卵后的雌虾另一侧胡须剪下分别单独保存,将产卵后雌虾纳精囊中剩余的精荚液氮保存,处理完后将雌虾放回雌虾池中;

g、亲本追溯:提取所有亲本胡须的DNA,提取产卵雌虾胡须DNA作为母本DNA;提取产卵后雌虾纳精囊中的剩余精荚DNA作为父本DNA;利用微卫星引物确定父母本;

h、家系培育:对确定父本和母本来源的卵进行培育,得到全同胞家系。

2. 根据权利要求1所述的非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法,其特征在于,所述的亲虾饲养是选取活体新鲜饵料,每隔6-8小时投喂1次,投喂量以每次投喂两小时后池底仍有少量剩余为宜;

3. 根据权利要求1所述的非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法,其特征在于,所述的家系培育是对确定父本和母本来源的卵,自母虾产卵后,水体中均匀布置气室进行微充气,产卵后第三天开始加入角毛藻液,保持水体藻类密度在4.5万个/ml以上,每天加入1-3ppm的酵母粉,虹吸法排水;待发育到仔虾后,投喂虾片和配合饲料,即得到全同胞家系。

一种非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于遗传育种领域,具体涉及一种非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法。

背景技术

[0002] 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*, 又称南美白对虾)是我国水产养殖的支柱产业,在中国渔业经济中占有较大的比重。然而,我国凡纳滨对虾优质亲虾长期依赖进口,严重制约了我国对虾产业的稳定、快速发展。因此,加强凡纳滨对虾遗传育种研究将有助于我国对虾产业快速健康发展,意义重大。

[0003] 全同胞家系的制备是遗传育种研究领域中最重要的一环。全同胞家系子代个体全部来自于同一个父母本,具有遗传背景干净的优势,有利于不同性状分子标记的筛选,在良种选育、分子标记辅助育种、分子标记开发的工作中必不可少。

[0004] 然而,现有的凡纳滨对虾全同胞家系制备方法仍存在一定的技术缺陷。现有的非定向交配方法:一般都采用标记物对亲虾进行标记,如在亲虾某个部位套上可识别的标识物,亲虾交配时便记下标识物,以便确定亲本,但这一方法有时无法确定父本,母虾会跟多条公虾进行交尾,不能确定哪条公虾的精英成功打入了母虾的纳精囊中。现有的定向交配的方法:一般是在同一水体中放入1条或多条公虾与1条母虾配比,由于不能保证特定的组合是否成功交配,这一方法通常需要准备较多的组合才能得到较少的全同胞家系数,再加上水体的追逐空间有限,经常会出现精英打歪或精英脱落等不利因素。

发明内容

[0005] 本发明的目的是弥补现有技术的不足,提供一种能够批量制备全同胞家系的方法,即非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法。

[0006] 本发明的非定向交尾凡纳滨对虾全同胞家系批量制备方法,包括以下步骤:

[0007] a、亲本选择:选择雄虾20g以上,雌虾30g以上的健康个体作为亲本;

[0008] b、亲本处理:去除雌虾一侧眼柄,雄虾不去除眼柄,将所有雌虾与雄虾个体的一侧胡须靠近根部剪下,剪下的胡须分别单独保存;

[0009] c、亲虾饲养:将步骤b的雌虾和雄虾分别在雌虾池和雄虾池中饲养;

[0010] d、亲虾交配:在上午(7-11时),将步骤c中的性腺饱满的雌虾放入雄虾池,使之自由追逐、交配;

[0011] e、雌虾挑选:当晚18时至21时,全部捞出雄虾池中的雌虾进行逐个检查,将雌虾纳精囊中具有饱满精英的雌虾放在单独的水体中产卵,微充气;将纳精囊中没有精英或精英位置偏离纳精囊的雌虾全部放回雌虾池中(经过交尾但纳精囊中无精英的雌虾仍会产出未受精卵,按照步骤c中的方法饲养一周以上后,性腺重新发育饱满);

[0012] f、产卵处理:发现雌虾产卵后立即捞出,将产卵后的雌虾另一侧胡须剪下分别单独保存,将产卵后雌虾纳精囊中剩余的精英液氮保存,处理完后将雌虾放回雌虾池中(按照

步骤(3) 饲养一周以上后,性腺会重新发育饱满);

[0013] g、亲本追溯:提取所有亲本胡须的DNA,提取产卵雌虾胡须DNA作为母本DNA;提取产卵后雌虾纳精囊中的剩余精荚DNA作为父本DNA;利用多态性丰富、扩增产物稳定的微卫星引物进行亲权鉴定,确定父母本,具体可参照中国授权发明专利“进行凡纳滨对虾家系鉴定的多重微卫星鉴定体系及应用ZL201310340730.1”中所述的方法进行;

[0014] h、家系培育:对确定父本和母本来源的卵进行培育,得到全同胞家系。

[0015] 优选,所述的亲虾饲养是选取活体新鲜饵料,每隔6-8小时投喂1次,投喂量以每次投喂两小时后池底仍有少量剩余为宜;

[0016] 优选,所述的家系培育是对确定父本和母本来源的卵,自母虾产卵后,水体中均匀布置气室进行微充气,产卵后第三天开始加入角毛藻液,保持水体藻类密度在4.5万个/ml以上,每天加入1-3ppm的酵母粉,虹吸法排水;待发育到仔虾后,投喂虾片和配合饲料,即得到全同胞家系。

[0017] 本发明的有益效果是:

[0018] 本发明针对现有的凡纳滨对虾家系制备技术的缺陷,设计通过非定向交尾、剪取对虾胡须组织提取DNA、取产卵后雌虾纳精囊中的剩余精荚作为父本来源的依据等方法,利用目前较为成熟的微卫星亲子鉴定技术确定父母本个体,制备出全同胞家系。本发明的方法采用非定向随机交配效率高与微卫星亲子鉴定准确率高相结合的方法,弥补了现有凡纳滨对虾家系制备技术的不足,将有利于凡纳滨对虾遗传育种工作的进行。

附图说明:

[0019] 图1是产卵后精荚的图。

具体实施方式:

[0020] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0021] 实施例1:

[0022] 1、亲本选择:一般选取体重20g以上(雄虾20g以上,雌虾30g以上)的健康个体作为后备亲本,亲本逐个识别,第一对游泳足具有开叉结构或具有精荚的个体为雄虾,无分叉结构、无精荚或有明显卵巢的个体为雌虾,雌雄分开饲养。

[0023] 2、亲本处理:用烧红的镊子或剪刀将雌虾一侧眼柄绞掉或剪掉,雄虾不剪眼柄;将所有雌虾与雄虾个体的一侧胡须靠近根部剪下,每个个体的胡须用95%酒精-20℃中单独保存,试管编号管理,雌虾在雌虾池中饲养,雄虾在雄虾池中饲养。

[0024] 3、亲虾饲养:选取活体新鲜饵料,每隔6-8小时投喂1次,投喂量以每次投喂两小时后池底仍有少量剩余为宜;雌虾按照投喂3次青虫后投喂1次红虫的方法进行投喂,雄虾按照投喂2次青虫、1次生蚝肉、1次鱿鱼、1次红虫的次数比例进行投喂。

[0025] 4、亲虾交配:在上午(7-11时)将性腺饱满的雌虾小心放入雄虾池中,使之自由追逐、交配。

[0026] 5、雌虾挑选:当晚18时至21时,全部捞出雄虾池中的雌虾进行逐个检查;将雌虾纳精囊中具有饱满精荚的雌虾放在单独的水体中产卵,微充气;将纳精囊中没有精荚或精荚位置偏离纳精囊的雌虾全部放回雌虾池中(经过交尾但纳精囊中无精荚的雌虾仍会产出未

受精卵,按照步骤3中的方法饲养一周以上后,性腺重新发育饱满)。

[0027] 6、产卵处理:每隔半小时检查雌虾是否产卵;发现雌虾产卵后立即捞出(产卵后精荚会自动脱落,防止雌虾将残余精荚摄食干净),将产卵后的雌虾另一侧胡须剪下95%酒精-20℃中保存,将产卵后雌虾纳精囊中剩余的精荚液氮保存,试管编号管理,处理完后将雌虾放回雌虾池中(按照步骤3饲养一周以上后,性腺会重新发育饱满)。产卵后精荚如图1所示。

[0028] 7、亲本追溯:提取所有亲本胡须的DNA,-80℃保存;提取产卵雌虾胡须DNA作为母本DNA;提取产卵后雌虾纳精囊中的剩余精荚DNA作为父本DNA;利用多态性丰富、扩增产物稳定的微卫星引物进行亲权鉴定,确定父母本,具体可参照中国授权发明专利“进行凡纳滨对虾家系鉴定的多重微卫星鉴定体系及应用ZL201310340730.1”中所述的方法进行。

[0029] 8、家系培育:对确定父本和母本来源的卵,自母虾产卵后,水体中均匀布置气室进行微充气;产卵后第三天开始加入角毛藻液,保持水体藻类密度在4.5万个/ml以上,每天加入1-3ppm的酵母粉,虹吸法排水;待发育到仔虾后,投喂虾片和配合饲料,即得到全同胞家系。具体培育方法可参照中国发明专利“一种凡纳滨对虾小水体育苗方法ZL201410076358.2”中所述的方法进行。



图1