

通过精液移植构建中国明对虾家系及微卫星分型鉴定父本

罗坤¹, 高焕², 于飞³, 张天时¹, 张庆文¹, 孔杰¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 淮海工学院, 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 3. 连云港市海洋与水产科学研究所, 江苏 连云港 222042)

摘要: 本研究首次采用精液移植法进行中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的家系构建, 利用10尾已交尾雌虾纳精囊内精液对17尾未交尾雌虾进行了移植, 共建立11个中国明对虾家系, 其中含有父系半同胞家系2个; 精液移植的平均受精率为46.8%, 最高受精率为78%, 授精成功率为64.7%。为了揭示每个家系母本内精液的来源情况, 选用6个中国明对虾微卫星标记对11个家系的母本、母本内精液及每个家系的6个个体进行分析, 推算出每个家系各自的父本基因型, 并与各自母本内精液基因型进行比较, 成功地对11个家系进行了父本鉴定。实验结果表明, 11个家系的父本基因型与各自母本内精液基因型相同, 每个家系内个体属全同胞关系, 即对于1尾自然交尾雌虾, 其纳精囊内精液只来自于1尾雄虾。通过本实验, 验证了精液移植在构建中国明对虾全同胞家系和半同胞家系中的可行性, 阐明了精液移植家系内个体的亲缘关系, 为中国明对虾选育工作提供了技术保证。[中国水产科学, 2010, 17(3): 456–462]

关键词: 中国明对虾; 精液移植; 微卫星; 基因分型

中图分类号: S91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2010)03-0456-07

在中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 大规模家系选育过程中, 基础群体 (Base population) 的建立是开展整个育种工作的关键一步, 一个遗传变异丰富的基础群体是保证育种项目得以顺利进行的基础。在引入基础群体时, 由于群体的雄虾数目有限, 难以建立所需的家系数目, 本实验尝试了新的人工授精方法——精液移植法, 即在已交尾雌虾纳精囊中取精液移植到未交尾雌虾的纳精囊中, 在中国明对虾不同群体间进行人工授精。由于每个家系内的个体都来源于同一个母本, 但每尾用作移植的已交尾雌虾纳精囊内精液是否只来源于1尾雄虾未知, 不能确定子代个体间的关系。在以后的选择育种中为了防止或减少后代的近亲交配、建立科学可靠的遗传谱系, 以及验证精液移植的可行性, 需鉴定家系内个体的父本来源情况。

微卫星 (Microsatellite) DNA, 即1~6个碱基的

串联重复序列, 分布于真核生物整个基因组^[1], 具有多态信息含量高、便于检测等优势, 而广泛用作多种动物的遗传标记, 在动物的个体识别 (包括亲子鉴定)、基因连锁分析、群体遗传研究等方面发挥着巨大的作用^[2-7]。多数微卫星DNA具有多态性, 其多态性主要源于核心序列重复次数的个体间差异, 这种差异在基因传递的过程中一般遵循孟德尔共显性遗传规律。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳可得到每个微卫星位点的等位基因条带, 由于子代的等位基因条带必定有1条来自父本或母本, 所以通过分析母本的条带和子代的条带, 就可以推测出父本的基因型, 然后与母本内精液的条带进行核对, 就可以推断出子代个体是否来源于同一个父本。

本实验利用6对微卫星引物分别对11个家系的母本、母本内精液及各个家系内的个体进行了分析, 得到了每个家系各自父本的基因型, 揭示了家系内

收稿日期: 2009-08-28; 修订日期: 2009-11-20.

基金项目: 国家863计划项目 (2006AA10A406); 国家自然科学基金项目 (30500378); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200803012).

作者简介: 罗坤 (1980-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: jakmail@163.com

通讯作者: 孔杰, 研究员. Tel: 0532-85821650; E-mail: kongjie@sina.com

个体的父本来源,为今后的中国明对虾选育工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

精液移植材料包括未交尾雌虾和提供精液的已交尾雌虾,其中未交尾雌虾来自2个群体:乳山湾野生中国明对虾群体和朝鲜群体养殖家系中国明对虾群体;提供精液的已交尾雌虾来自3个群体:乳山湾野生中国明对虾群体、韩国野生中国明对虾群体和黄海1号中国明对虾群体。

微卫星分析材料包括产生子代的母本(含母本内精液)及其子代,共计11个母本亲虾和66尾子代(每个家系取6尾子代)。

1.2 实验方法

1.2.1 精液移植及操作 由于采用雄虾进行精液移植所建立的家系数目不能满足育种方案的要求,本实验采用精液移植法来弥补。根据育种方案,所建立的交配组合为:乳山野生群体(♂)×朝鲜群体养殖家系(♀),韩国野生群体(♂)×乳山野生群体(♀),黄海1号群体(♂)×乳山野生群体(♀)。其中,♂标记群体实际为提供精子的已交尾雌虾。

具体操作如下:取已交尾的雌虾,用酒精棉球擦拭体表,特别是纳精囊部位,然后用手挤压纳精囊,使精子团露出,用消毒过的注射针头蘸取适量精液,根据精液量的多少分成多份,分别移植到未交尾雌虾纳精囊中。

上述3个交配组合中,提供精液的已交尾雌虾数量分别为4尾、4尾、2尾;进行移植的未交尾雌虾分别为6尾、5尾、6尾;1尾已交尾雌虾纳精囊中的精液分成1份、2份、4份进行移植。亲虾产卵后,根据是否出现受精卵,采用授精成功率作为指标来衡量精液移植法的授精成功情况。授精成功率为出现受精卵的亲虾数与总共移植的亲虾数的比值。共计移植雌虾17尾,其中11尾雌虾出现受精卵,授精成功率为64.7%,精液移植对虾的平均受精率为46.8%,最高受精率为78%;3个交配组合最终建立的家系

个数分别为4个、3个和4个(其中有2个为父系半同胞家系),取每个家系的母本、母本内精液及各6个子代进行微卫星分析。

1.2.2 DNA的提取 取约100 mg对虾肌肉(母本或子代个体)或母本内适量精液,加入475 μL TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, pH 8.0),剪碎。分别加入10%的SDS溶液25 μL, 20 mg/mL的蛋白酶K 4 μL,混匀,55℃水浴消化3 h,至溶液澄清后先后经等体积酚、酚:氯仿、氯仿抽提,酒精沉淀,过夜并风干后溶于适当TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.6)。

1.2.3 PCR反应条件 应用具有多态性的6对中国明对虾微卫星引物,在PTC-200型PCR仪上进行扩增,反应在25 μL的反应体系中进行,其中包括:DNA模板150 ng; 10×Buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0; 50 mmol/L KCl; 0.1% TritonX-100) 2.5 μL; Mg²⁺ 25 mmol/L, 2 μL; Taq酶1 U; dNTP 2.5 mmol/L, 2 μL; 引物20 pmol/L各2 μL; 双蒸水加至25 μL。反应条件为:94℃解链5 min; 94℃变性40 s, 64~66℃退火1 min, 72℃延伸1 min,共29个循环; 72℃充分延伸5 min。6对微卫星引物序列、PCR反应条件见表1。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染 用8%聚丙烯酰胺凝胶检测PCR产物,每个产物上样8 μL(含4 μL上样缓冲液),同时点上分子量标记物DL2000,用1×TBE电泳缓冲液。电泳仪为北京市六一仪器厂生产的DYY-11型,电压维持在400 V,约电泳2 h。

银染方法如下:将电泳后的凝胶立即浸泡在10%的HAc固定液中,室温固定20 min,蒸馏水洗2次(每次3 min),加入1 L染色液(含1.5 g AgNO₃, 2 mL 37% HCHO),室温摇动30 min,取出后用去离子水快速冲洗5 s,立刻置于1 L显色液(含30 g Na₂CO₃, 2 mL 37% HCHO, 4 mg Na₂S₂O₃),摇动至条带出现,放入固定液(10%HAc)中固定。

1.2.5 微卫星DNA片段大小的确定 固定后的聚丙烯酰胺凝胶晾干后,用扫描仪扫描,通过凝胶分析软件Gel-Pro Analyzer(4.5版本)计算各个微卫星位点等位基因的大小。

1.2.6 分析并确定父本基因型 根据得到的微卫星标记片段大小,对每个家系的母本、精液及6个个体进行分析,确定这些后代生物学意义上的父亲。由于子代中的1个等位基因必然来自父本,通过对每

个家系内6个子代个体及其母本等位基因的分析,可以推算出父本的基因型,然后再与精液基因型核对,便可验证推算父本与提供精液的父本是否相同。

表1 6个微卫星位点的性质及PCR反应条件
Tab. 1 Characterization of six microsatellite loci and conditions of PCR

微卫星位点 Microsatellite locus	GenBank 登录号 GenBank accession number	引物 5' -3' Primer 5' -3'	重复类型 Repeat type	退火温度/℃ Ann. temperature
<i>H081</i>	无 None	F: ACA ACA CAT TCT GTC CAT T R: CGT TTG TTG ACC TCT CTA TC	(GTCT) ₃ (GCCT) ₅ (GTCT) ₁₅	62
<i>RS0683</i>	AY132823	专利(申请号 02135713.7)	CCGCTACGCGC(TACCCGC) ₁₃ TACCC	64
<i>RS1101</i>	AY132811	F: CGA GTC GCA GCG AGT CCT R: TAT TCC CAC GCT CTT GTC	G(GAGT) ₂ GAGC(GAGT)GAATGC(GTGA) ₅ GCGA (GTGA)ATGC(GTGA) ₃ G... (GAGT)AAT(GTGA) GCCT(GGTT) ₂ CATT(GAGT) ... (AAG) ₂ TATGTT (AGT) ₂ ... (GAGT)GATT(GAGT) ₂ G... (GTGA) ₃ GC GA(GTGA)ATGC(GTGA) ₄ ATGAAT(GC) ₃ (GTGA) ₃ GCGA (GTGA) ... (GTGA) ₂ C(GAGT) ... (GTGA) ₆ ... (GAGT) GA(ATT) ₂ GT(GTGA)ATGAATG	52
<i>EN0033</i>	AY132813	专利(申请号 02135714.5)	(GA)GT(GA) ₃ AT(GA) ₃ GT(GGGAGAGT) ₆ (GA) ₄	64
<i>RS0622</i>	AY132778	F: TGC TGA AGC TAC ACT ACC TTC G R: TGA TGA AAC GCA AGC AAA GGC	(GTCT) ₂₀ GAGT(GTCT) ₄	66
<i>RS062</i>	AY132777	F: TCA GTC CGT AGT TCA TAC TTG G R: CAC ATG CCT TTG TGT GAA AAC G	(CA) ₁₈ (TA) ₃ (AC) ₅ (AT) ₁₉ (TC) ₅ (AC) ₅	66

2 结果与分析

2.1 微卫星片段的大小

通过凝胶图像分析软件Gel-Pro Analyzer,得到11个母本亲虾和66尾子代的各个微卫星位点的等位基因,根据每个个体产生的条带位置确定其基因型,将每一位点上的等位基因按照分子量由小到大编号,用阿拉伯数字命名等位基因,前面加上各位点编号的后3位数字,如0811表示*H081*位点分子量最小的等位基因1。11个母本在6个微卫星位点共检测出40条等位基因,6个微卫星位点均为多态性,其中*RS0683*位点等位基因最多,共有9个等位基因;

*RS062*位点等位基因最少,有4个等位基因。6个微卫星位点共检测出42种基因型,其中纯合基因型3种,杂合基因型39种。表2是11个母本的6个微卫星位点等位基因情况。

2.2 父子关系的确定

由于子代微卫星标记位点的等位基因1个来自母本,1个来自父本,本实验根据母本基因型和子代基因型推测出了每个家系的父本基因型,并与检测的每个家系的精液基因型进行了比较。如1[#]家系,实验得到了各个引物扩增的母本基因型、精液基因型及推测出的父本基因型(表3)。

表2 11个母本中6个微卫星标记位点的基因型
Tab. 2 Allele distribution of the six microsatellite loci of 11 female parents

家系编号 Family name	微卫星位点 Microsatellite locus					
	<i>H081</i>	<i>RS0683</i>	<i>RS1101</i>	<i>EN0033</i>	<i>RS0622</i>	<i>RS062</i>
1 [#]	0813 0814	6832 6834	1014 1014	0333 0336	6222 6223	0621 0622
2 [#]	0815 0817	6833 6834	1012 1015	0333 0335	6222 6223	0621 0623
3 [#]	0816 0818	6834 6839	1013 1016	0332 0335	6222 6225	0622 0624
4 [#]	0815 0817	6835 6838	1013 1016	0332 0335	6222 6224	0622 0624
5 [#]	0812 0817	6831 6834	1015 1017	0332 0333	6222 6224	0622 0623
6 [#]	0816 0817	6833 6833	1015 1017	0331 0334	6222 6224	0623 0624
7 [#]	0815 0815	6833 6837	1014 1014	0332 0334	6222 6225	0621 0623
8 [#]	0813 0814	6832 6835	1012 1014	0333 0334	6222 6226	0623 0624
9 [#]	0811 0814	6833 6837	1013 1016	0331 0334	6222 6226	0622 0623
10 [#]	0813 0816	6834 6836	1014 1014	0332 0333	6222 6225	0621 0623
11 [#]	0814 0816	6833 6834	1011 1012	0332 0335	6221 6222	0622 0624

表3 1[#]家系检测到和推断出的基因型
Tab. 3 Observed and deduced genotypes of 1[#] family

样本 Specimen	微卫星位点 Microsatellite locus					
	<i>H081</i>	<i>RS0683</i>	<i>RS1101</i>	<i>EN0033</i>	<i>RS0622</i>	<i>RS062</i>
1 [#] 母本 1 [#] dam	0813 0814	6832 6834	1014 1014	0333 0336	6222 6223	0621 0622
子代1 Offspring 1	0813 0813	6832 6835	1014 1017	0333 0333	6221 6222	0621 0621
子代2 Offspring 2	0812 0813	6834 6837	1014 1016	0333 0333	6223 6222	0621 0623
子代3 Offspring 3	0813 0813	6832 6835	1014 1017	0333 0336	6221 6222	0621 0621
子代4 Offspring 4	0812 0813	6832 6835	1014 1017	0335 0336	6223 6222	0621 0623
子代5 Offspring 5	0812 0814	6834 6837	1014 1016	0333 0336	6221 6222	0621 0623
子代6 Offspring 6	0813 0813	6832 6835	1014 1016	0333 0333	6223 6222	0621 0623
推测出的父本 Expected sire	0812 0813	6835 6837	1016 1017	0333 0335	6221 6223	0621 0623
精液 Semen	0812 0813	6835 6837	1016 1017	0333 0335	6221 6223	0621 0623

如表3所示,1[#]家系母本在*H081*位点上的基因型为0813/0814,子代有3种基因型,分别为:0813/0813、0812/0813、0812/0814,其中等位基因0813、0814来自母本,因此可以确定等位基因0812来自父本,又由于子代中出现0813/0813纯合基因型,所以可以推断父

本的另外一个等位基因为0813。因此,可以得出1[#]家系推测父本在*H081*位点上的基因型为0812/0813。1[#]家系母本、子代及精液的微卫星DNA电泳图谱见图1。按照同样的方法,可以得到*RS0683*、*RS1101*、*EN0033*、*RS0622*、*RS062*等位点的父本基因型(表3)。

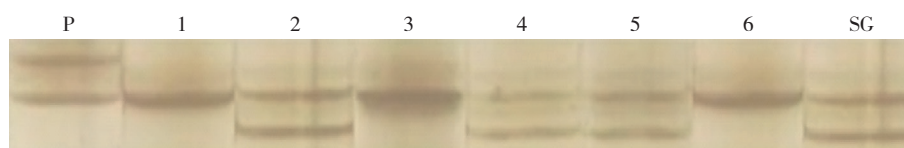


图1 1[#]家系母本、移植精液及6个子代在*H081*位点等位基因的分布

P: 母本; 1-6: 子代; SG: 精液.

Fig. 1 Allele distribution on locus *H081* of 1[#] family dam, semen and six offspring individuals

P: maternal shrimp; 1-6: offspring; SG: semen

同样根据基因型的比较,可以确定其他10个家系的各自父本基因型,结果显示也都与相应的精液基因型相同(表4)。由此可以推断,每个家系母本亲

虾中的精液来源单一,即每尾亲虾纳精囊内精液都只来自于1尾雄虾。

表4 其他10个家系检测到和推断出的基因型
Tab. 4 Observed and deduced genotypes of other ten families

类别 Type	家系编号 Family name	微卫星位点 Microsatellite locus									
		<i>H081</i>	<i>RS0683</i>	<i>RS1101</i>	<i>EN0033</i>	<i>RS0622</i>	<i>RS062</i>				
精液 Semen	2 [#]	0812 0816	6831 6834	1012 1013	0333 0336	6221 6225	0621 0624				
	3 [#]	0817 0818	6831 6835	1011 1016	0332 0336	6221 6224	0621 0624				
	4 [#]	0813 0817	6835 6839	1015 1016	0331 0335	6222 6226	0621 0623				
	5 [#]	0812 0815	6832 6834	1013 1014	0335 0336	6225 6226	0622 0624				
	6 [#]	0816 0818	6833 6837	1012 1017	0332 0334	6222 6225	0622 0624				
	7 [#]	0815 0816	6836 6838	1011 1014	0333 0335	6223 6225	0621 0622				
	8 [#]	0813 0815	6832 6837	1016 1017	0334 0336	6224 6226	0621 0624				
	9 [#]	0811 0813	6833 6839	1013 1015	0331 0336	6222 6223	0623 0624				
	10 [#]	0814 0815	6834 6835	1012 1014	0331 0333	6224 6225	0622 0623				
	11 [#]	0812 0815	6832 6834	1013 1014	0335 0336	6225 6226	0622 0624				
推测出的父本 Expected sire	2 [#]	0812 0816	6831 6834	1012 1013	0333 0336	6221 6225	0621 0624				
	3 [#]	0817 0818	6831 6835	1011 1016	0332 0336	6221 6224	0621 0624				
	4 [#]	0813 0817	6835 6839	1015 1016	0331 0335	6222 6226	0621 0623				
	5 [#]	0812 0815	6832 6834	1013 1014	0335 0336	6225 6226	0622 0624				
	6 [#]	0816 0818	6833 6837	1012 1017	0332 0334	6222 6225	0622 0624				
	7 [#]	0815 0816	6836 6838	1011 1014	0333 0335	6223 6225	0621 0622				
	8 [#]	0813 0815	6832 6837	1016 1017	0334 0336	6224 6226	0621 0624				
	9 [#]	0811 0813	6833 6839	1013 1015	0331 0336	6222 6223	0623 0624				
	10 [#]	0814 0815	6834 6835	1012 1014	0331 0333	6224 6225	0622 0623				
	11 [#]	0812 0815	6832 6834	1013 1014	0335 0336	6225 6226	0622 0624				

3 讨论

亲子鉴定很多采用排除法(Exclusion)来进行^[8]。经典的亲子鉴定方法首先参照母子的基因型,按孟德尔遗传定律逐个检查各个可疑父亲的基因型。只要有一个位点的基因型不合,该可疑父亲就被排除。最后所剩的唯一可疑父亲就被判定为真父^[9-10]。本研究先通过对母本和子代的基因型进行分析,推算出父本的基因型,然后再与精液的基因型进行核对,以判断后代是否来源于同一个父本,从而成功地对11个家系进行了父本鉴定。每个家系内的子代之间是全同胞关系,也就是说自然交尾条件下,1个雌虾只与1尾雄虾交尾,即雌虾纳精囊中的精液只来源于1尾雄虾,从分子水平上验证了正常交配的雌虾

有保护其纳精囊内已贮有的精英并拒绝再次交配的本能^[11]。微卫星DNA在PCR扩增时,有时会出现“无效等位基因”(Null allele),或者子代个体的基因型与亲代基因型不完全吻合的现象^[12],本研究中由于家系子代的取样数量受到了限制,只对每个家系的6个子代个体进行了分析,没有出现上述现象。对于微卫星标记在中国明对虾精液移植子代的父本鉴定中的应用,笔者将增加微卫星位点和检测家系及子代个体的数量进行更深入的研究。

由本研究可以看出,通过对母本、子代及精液的微卫星分析,不仅可以确定父本的基因型,揭示子代之间的亲缘关系,有利于以后育种过程中后代繁殖措施的制定。同时本实验首次采用精液移植法进行中国明对虾的人工繁殖并获得成功。在本研究中,

提供精液的雌虾数量为10尾,共对17尾未交尾雌虾进行了移植,最终有11尾移植的雌虾产卵并孵化成功,移植成功率为64.7%,11尾雌虾所产卵的平均受精率为46.8%,最高受精率为78%。对于获得的平均受精率不高的原因进行分析,可能是移入的精子团体积小,对雌虾纳精囊没有形成有效的刺激而使纳精囊闭合不紧,造成少量海水渗进而使部分精子失活造成。但本研究同时也证实,在雄虾不足的情况下,利用交尾雌虾的精液进行移植授精是可行的,在制定选择育种策略时,可以考虑利用精液移植方法建立家系。

在建立半同胞家系方面,1个雄虾有1个精英,若采用精英移植法,1尾雄虾最多可为1尾雌虾移植,若2尾雌虾均能产生后代,则建立半同胞家系的数量为1个,若其中1尾不能产生后代或2尾都没有后代,则不能建立半同胞家系。而对于精液移植,由于可以向多尾(2~4尾)雌虾进行移植,故提高了让更多雌虾产生后代的可能性,增加了建立半同胞家系的机会。在本研究中,有1尾已交尾雌虾纳精囊内精液移植到4尾未交尾雌虾的纳精囊中,最后2个家系孵化成功,建立了1个父系半同胞家系,从这个结果可以看出,精液移植法可以提高建立半同胞家系的成功率,可以作为构建中国明对虾父系半同胞家系的有效途径之一。至于对于已交尾雌虾内精液最多可分成几份进行移植效果最好,还需做进一步实验确定。在中国明对虾大规模家系选育过程中,需要建立大量的全同胞和半同胞家系,可以考虑利用精液移植法来建立全同胞和半同胞家系,为接下

来进行的家系选育和遗传参数的估算奠定基础。

参考文献:

- [1] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucl Acid Res, 1989, 17: 6463-6471.
- [2] Weber J L, Wong C. Mutation of human short tandem repeats[J]. Human Mol Genet, 1993, 2: 1123-1128.
- [3] Visscher P M, Van der Beck S, Haley C S. Marker assisted selection in animal breeding technology for the 21st century [M]. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998: 119-136.
- [4] Vankan D M, Fandy M J. Estimations of the efficiency and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings [J]. Anim Genet, 1999, 30: 355-361.
- [5] 商海涛,牛荣,魏泓,等. 三品系小型猪35个微卫星G座的遗传学研究[J]. 遗传, 2001, 23(1): 17-20.
- [6] 储明星,王吉振,王爱国,等. 小尾寒羊4个微卫星座位的克隆及序列分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(5): 402-405.
- [7] 刘峰,东方阳,邹继军,等. 应用微卫星标记进行大豆种质多样性和遗传变异性分析[J]. 遗传学报, 2000, 27(7): 628-633.
- [8] Chakraborty R, Shaw M, Schull W J. Exclusion of paternity: the current state of the art [J]. Am J Human Genet, 1974, 26: 477-488.
- [9] Morin P A, Wallis J, Moore J J, et al. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats [J]. Mol Ecol, 1994, 3: 469-478.
- [10] Chakraborty R, Meagher T R, Smouse P E. Parentage analysis with genetics markers in natural populations. 1. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity [J]. Genetics, 118: 527-536.
- [11] 兰伯隆,孔芳. 中国对虾异常交配现象的观察[J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(1): 114-116.
- [12] 高焕,孔杰,于飞,等. 人工控制自然交尾条件下中国对虾父本的微卫星识别[J]. 海洋水产研究, 2007, 20(1): 1-5.

Semen transplantation and paternity assignment by microsatellite genotyping in *Fenneropenaeus chinensis*

LUO Kun¹, GAO Huan², YU Fei³, ZHANG Tianshi¹, ZHANG Qingwen¹, KONG Jie¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. Marine Fisheries Research Institute of Lianyungang, Lianyungang 222042, China)

Abstract: One of the key factors in the process of large-scale families breeding of *Fenneropenaeus chinensis* is the construction of base population with broad genetic variation. The base population can be established by forming a synthetic breeding population where brood stock from different populations are systematically crossed with each other to secure that their offsprings do not inbreed but carry new combinations of alleles. However, lack of male brood stocks restricts the establishment of enough families. In order to resolve this problem, we used semen transplantation to construct families of *F. chinensis* among different populations, and for the sake of obtaining pedigree information, microsatellites were used for identifying parentage relationships among individuals.

Semen from spermathecas of ten mated shrimps was transferred into the spermathecas of 17 shrimps which were not mated, and 11 full-sib families were obtained, including two half-sib families. The average fertilization rate was 46.8% with the highest being 78%. The success rate of artificial insemination by semen transplantation was 64.7%. Six microsatellite markers were used to identify parentage relationships among the individuals. We identified paternity of the 11 families through genotype data of female parents, semen and six individuals of each family, and constructed clear pedigrees by using microsatellite loci. All of the six microsatellite loci were polymorphic. Forty alleles were detected in 11 female parents at six microsatellite loci. The numbers of alleles at each locus were between four and nine. Forty-two kinds of genotypes were acquired in 11 female parents. All the paternal genotypes of the 11 families were inferred based on the genotypes of the female parents and their offsprings. Through the analysis of expected sire genotypes and semen genotypes, we successfully identified the paternity of 11 families. Results indicated that the male parent genotypes were identical with the semen genotypes, which demonstrated that semen in each spermatheca was from one male shrimp, and the offsprings of each family were full-sibs. These results demonstrate that it is feasible to use semen transplantation technique as a way to establish *F. chinensis* families. It also shows that microsatellite markers can be used as a powerful tool for obtaining pedigree information in selective breeding programs of *F. chinensis*. The results of the experiment will establish foundation for producing full-and half-sibs families, and the technology of semen transplantation can provide basis for shrimp breeding programs. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3):456–462]

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; semen transplantation; microsatellite; genotype

Corresponding author: KONG Jie. E-mail: kongjie@sina.com