

大额牛冻精在瘤牛超数排卵中的应用效果及 F₁ 代的亲子鉴定

和占星, 张继才, 亏开兴, 黄必志, 袁希平, 赵刚, 黄梅芬, 张勇, 何永珍

(云南省草地动物科学研究所, 昆明 650212)

摘要: 【目的】本研究旨在探讨大额牛 (*Bos frontalis*) 冻精在瘤牛 (*Bos indicus*) 体内胚胎生产及杂交改良中的应用前景。【方法】对 9 头瘤牛 (婆罗门牛) 供体进行超排, 发情后将供体分为试验组 ($n=5$) 和对照组 ($n=4$), 分别用大额牛和瘤牛 (婆罗门牛) 冻精人工授精 (AI), 以第 1 次 AI 之日为 0 天, 在第 7 天回收胚胎; 对试验组 287 号供体左侧子宫角回收胚胎, 右侧子宫角使胚胎继续着床妊娠; 对 287 号母牛所产 F₁ 代犊牛 (大额牛 × 瘤牛) 进行亲子鉴定; 测定 F₁ 代牛的初生、6 月龄和 12 月龄的体重、体尺指标。【结果】试验组和对照组供体的受精率分别是 90.5% 和 80.8%, 头均获胚数分别是 4.2 ± 1.3 枚和 6.5 ± 4.7 枚, 可用胚数分别是 3.0 ± 1.2 枚和 4.3 ± 5.3 枚, 可用胚率分别是 71.4% 和 65.4%, 两者差异不显著 ($P > 0.05$); 287 号母牛左侧子宫角回收到 2 枚可用胚, 右侧子宫角内胚胎继续发育, 并成功产下 1 头母犊, 妊娠期为 288 d; 对 F₁ 代犊牛亲子鉴定显示, 9 个微卫星座位上犊牛与公牛、犊牛与母牛都具有共享的等位基因, 父子关系相对机会 (RCP) 为 99.9949%, 证明此例亲子鉴定的确是一个三联体家庭, 从而证实了种间杂交的真实; F₁ 代牛的初生、6 月龄和 12 月龄重分别为 31.5 kg、180.0 kg 和 280.0 kg; 初生 ~ 12 月龄平均日增重达 680.8 g。【结论】大额牛冻精在瘤牛超排中应用效果好; 并获得国内首例大额牛 (独龙牛) 与瘤牛杂种牛犊; F₁ 代牛生长较快, 杂种优势明显。

关键词: 大额牛; 瘤牛; 超数排卵; 种间杂交; 亲子鉴定

Application of Frozen Sperm of Mithun in Superovulation of Zebu and Parentage Identification of Crossbred F₁(Mithun×Brahman)

HE Zhan-xing, ZHANG Ji-cai, QU Kai-xing, HUANG Bi-zhi, YUAN Xi-ping, ZHAO Gang,
HUANG Mei-fen, ZHANG Yong, HE Yong-zhen

(Academy of Grassland and Animal Science, Yunnan, Kunming 650212)

Abstract: 【Objective】The objective of this paper was to discuss the application foreground of embryo production and crossbred improvement of zebu (*Bos indicus*) with frozen sperm of Mithun (*Bos frontalis*). 【Method】Nine donors of zebu (Brahman) with estrous after superovulation were divided into experiment group ($n=5$) with frozen sperm of Mithun and control group ($n=4$) with frozen sperm of zebu (Brahman) for AI, respectively. And embryo was recovered on day 7 after AI. No. 287 of Brahman cow was from experiment group, whose embryo in the left uterine was flushed and another embryo in the right uterine was developing continuously on day 7 after AI. No. 287 cow gave birth to a crossbred calf (Mithun×Brahman) and parentage identification was carried out by collecting frozen semen of Mithun and the blood of No. 287 of Brahman cow and crossbred calf assaying 9 microsatellite loci. The body size and weight of the calf was mensurated at the ages of birth, six-month and twelve-month. 【Result】The results of experiment group and control group were 90.5% and 80.8% in fertilized ova rates, 4.2 ± 1.3 and 6.5 ± 4.7 in average recovered embryos, 3.0 ± 1.2 and 4.3 ± 5.3 in average transferable embryos, and 71.4% and 65.4% in transferable embryo rates, respectively, of which were not significantly difference between the two groups ($P > 0.05$). As a result, two transferable embryos recovered from the left uterine, embryo developing in the right uterine of No. 287 of Brahman cow was 288 days of pregnancy length and finally given birth to a calf cow. The results of parentage verification showed that the calf and the bull, the calf and the cow shared the 9 microsatellite loci, and relative chance of paternity (RCP) was 99.9949%, indicating the case was a triple

收稿日期: 2007-06-04; 接受日期: 2007-09-30

基金项目: 云南省科技攻关与高新技术发展项目 (2006NG23), 云南省草地动物科学研究院院长基金 (YNBP2006DF0002)

作者简介: 和占星 (1963-), 男, 纳西族, 云南丽江人, 高级畜牧师, 研究方向为牛羊胚胎工程技术。Tel: 0871-7391355, 13888156825; E-mail: hezx81@126.com

family, and it's true that the potential of interspecies crossbreeding between Mithun and Brahman. The weights at the ages of birth, six-month and 12-month of F₁ calf were 31.5 kg, 180.0 kg and 280.0 kg, respectively. And average daily weight gain of calf from birth to yearling was 680.8 g. 【Conclusion】 An excellent effect was obtained when frozen sperm of Mithun was applied in the superovulation of zebu; the first interspecies crossbred calf from Dulong cattle (Mithun or Gayal) × zebu (Brahman) was obtained in China in January, 2006, and the calf grow faster and shows significant heterosis at present.

Key words: Mithun (*Bos frontalis*); Brahman (*Bos indicus*); Superovulation; Interspecies crossbreeding; Parentage identification

0 引言

【研究意义】大额牛 (*Bos frontalis*) 在中国又称独龙牛, 是半野生珍稀牛种, 仅分布于云南高黎贡山的独龙江和怒江流域的山区。大额牛在恶劣生境下, 生存能力强、生殖年限长, 产肉性能好。因其数量少, 2000 年已列入国家级畜禽品种资源保护名录。本研究对大额牛保种扩繁及杂交利用具有基础性和指导性的作用。【前人研究进展】国内外有关大额牛的染色体和遗传多样性^[1-4]、大额牛生产性能^[5,6]、大额牛冷冻精液技术^[7,8]、大额牛与瘤牛^[2]、荷斯坦牛杂交^[9]等方面均有研究报道。【本研究切入点】尽管大额牛精液冷冻技术已成功, 但大额牛野性强, 采精难度大, 个体间精液品质差异大, 加之原有 2 头公牛已淘汰, 冻精生产中中断多年, 现存数量有限 (约 1.3 万支细管^[8])。云南省黄牛存栏量大, 瘤牛也有一定的数量, 但体型小、产肉性能低, 迄今主要用引进肉牛品种进行杂交改良。大额牛冻精除在牛体外受精研究中少量使用外, 实际生产应用研究甚少, 目前未见国内外有关大额牛冻精用于肉牛超排生产胚胎的报道, 也未见国内成功生产大额牛与瘤牛杂种的报道。有关大额牛与云南黄牛杂种牛肉质特性已有报道^[10], 但未见有关分子生物学证据的报道。在加强大额牛保种的同时, 研究种间杂种优势利用潜能非常必要。【拟解决的关键问题】大额牛和瘤牛 (*Bos indicus*) 为 *Bos* 属中两个不同种。本研究通过大额冻精在瘤牛超排中应用效果的试验以及对种间杂交 F₁ 代牛的亲子鉴定和对首例 F₁ 代牛体重、体尺的测定, 为建立大额牛精子库以及胚胎移植和种间杂交利用提供繁殖、遗传和生产性能方面基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 冷冻精液 分别采自大额牛 (*Bos* 001 号) 和瘤牛 (婆罗门牛, PM114 号) 公牛 (由云南省家畜冷冻精液站生产), 批号分别是 20011006 和 20020425,

冻精解冻后的活力分别为 0.37 和 0.38。

1.1.2 供试母牛 选择年龄 5~10 岁、经产、健康无病、性周期正常、营养状况较好的瘤牛 (婆罗门牛) 为供体, 在云南省肉牛和牧草研究中心示范牧场人工草地上全放牧饲养。

1.1.3 激素及药品 FSH (Denka 制药株式会社, 日本), PGF_{2α} (Pharmacia & Upjohn Company, USA), CUE-MATE™ 阴道孕酮栓 (Duir PfarmAg Ltd., 新西兰), 冲胚液: PBS 液 (自配)。

1.1.4 胚胎回收器具 16~18 号胚胎回收管、胚胎自动灌流仪 (富士平工业株式会社, 日本)。

1.2 试验方法

1.2.1 供体牛超排、人工授精及胚胎回收 在母牛性周期的任何一天, 放置 CUE-MATE™ 阴道孕酮栓 (0 天), 第 9 天开始采用递减法注射 FSH, 总量 36 mg, 每天早晚各肌肉注射 1 次, 连续注射 4 d, 在注射 FSH 的第 3 天注射 PG35 mg; 站立发情后将 9 头供体分为试验组 ($n=5$) 和对照组 ($n=4$), 分别用大额牛和瘤牛冻精人工授精, 每隔 8~12 h 人工授精 1 次, 共 3 次, 输精量 0.75 ml (0.25 ml/次); 以第一次人工授精之日为 0 天, 在第 7 天用非手术回收胚胎。其中 287 号母牛左侧子宫角回收胚胎, 右侧卵巢上只有 1 个发育良好的黄体, 不施行胚胎回收, 使胚胎继续着床妊娠, 以观察能否正常怀孕产犊。获胚数和可用胚数采用 t 检验统计, 受精率和可用胚率采用 χ^2 检验统计。

1.2.2 亲子鉴定 选用大额牛公牛 (*Bos* 001 号, 父本) 冷冻精液 0.5 ml、瘤牛母牛 (287 号, 母本) 及其杂种犊牛 (F₁) 的血液样本 (颈静脉血各 5 ml, 肝素钠抗凝), 采用常规的酚-氯仿抽提方法制备 DNA; 选择 9 个微卫星座位 (合成 9 对微卫星引物, 来源于 GenBank, 引物序列见表 1) 进行 PCR 扩增, 扩增产物用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色法显色; 通过软件识别图中的产物片段大小, 计算父子关系相对机会 (RCP) 值^[11], 进行亲权判断。

1.2.3 F₁ 代犊牛体尺、体重指标 测定杂交牛初生、6 月龄和 12 月龄的体重、体长、体高、十字部高、胸

表 1 9 个微卫星座位的引物序列

Table 1 Primer sequences of 9 microsatellite loci

微卫星座位 Microsatellite loci	引物序列 Primer sequences	
	正向引物 Forward primer sequences	反向引物 Reverse primer sequences
BM2113	GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC	CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC
ETH125	AGG GAG GGT CAC CTC TGC	CTT GTA CTC GTA GGG CAG GC
SPS115	AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC CAG	AAC GAG TGT CCT AGT TTG GCT GTG
ETH225	GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T	ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT
BM1824	GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC	CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG
INRA063	ATT TGC ACA AGC TAA ATC TAA CC	AAA CCA CAG AAA TGC TTG GAA G
TGLA122	CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC	AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C
HEL5	GCA GGA TCA CTT GTT AGG GA	AGA CGT TAG TGT ACA TTA AC
ILSTS005	GGA AGC AAT GAA ATC TAT AGC C	TGT TCT GTG AGT TTG TAA GC

围等指标。

2 结果与分析

2.1 大额牛冻精在瘤牛超数排卵中的应用效果

超数排卵结果如表 2 所示。试验组供体的头均黄体数、获胚数和可用胚数分别比对照组低 2.6 个、2.3 枚和 1.3 枚，均无显著差异 ($P>0.05$)，受精率和可用胚率分别比对照组高 9.7% 和 6.0%，但差异不显著

表 2 两种冻精对超数排卵后瘤牛受精率和可用胚率的影响

Table 2 Effects of frozen sperms of two species (Brahman and Mithun) on rates of fertilized ova and transferable embryo of Brahman

组别 Groups	冻精来源 Source of frozen sperm	超排供体数(头) No. of donors in SOV	头均黄体数(个) Average CL	头均获胚数(枚) Average embryos	头均可用胚数(枚) Average transferable embryos	受精率 Rate of fertilized ova (%)	可用胚率 Rate of transferable embryos (%)
试验组 Experiment group	大额牛 Mithun	5	6.2±0.7	4.2±1.3	3.0±1.2	90.5(19/21)	71.4(15/21)
对照组 Control group	瘤牛 Brahman	4	8.8±4.4	6.5±4.7	4.3±5.3	80.8(21/26)	65.4(17/26)

受精率(%)=4 细胞以上胚胎数/获胚(卵)总数×100%

The rate of fertilized ova(%) = No. of embryos(include upon 4 cells)/ total number of embryos (ova) flushed×100%

($P>0.05$)，说明大额牛冻精在肉牛胚胎生产中具有与瘤牛同等的效果。287 号供体胚胎回收时直肠检查左侧卵巢上有 5 个黄体，回收到发育良好的 2 枚胚胎，进行冷冻保存；2 枚冻胚经解冻培养 24 h 后，其中 1 枚胚胎发育到孵化囊胚阶段(图 1)；右侧卵巢上只有 1 个黄体，使胚胎继续着床妊娠，于 2006 年 1 月顺利产下 1 头大额牛(♂)×瘤牛(♀)杂种母犊，妊娠期 288 d(母牛及其杂交牛犊见图 2)，表明通过人工授精能获得大额牛与瘤牛的种间杂种。

2.2 亲子鉴定结果

对大额牛公牛精液、287 号母牛血液和杂交犊牛血液 3 个样品 9 个微卫星座位的分析结果显示，在每



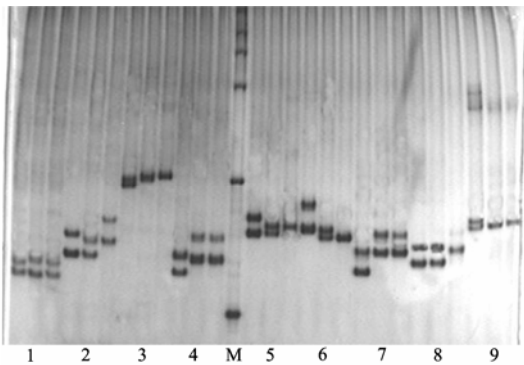
图 1 解冻培养 24 h 后的孵化囊胚

Fig. 1 Hatched blastocyst from thaw to culture for 24 h



图 2 瘤牛(母本)及出生 3 天的 F₁ 代牛犊(♀)
Fig. 2 Brahman (Maternal line) and F₁ calf (♀) of 3-day-old of age

一个座位公牛与犊牛、母牛与犊牛都有共享的等位基因(图 3), 计算父子关系相对机会(RCP)为 99.9949%, 说明公牛与犊牛具有亲子关系, 证实三者是一个三联体家庭。



1. BM2113, 2. ETH125, 3. SPS115, 4. ETH225, M. Marker, 5. BM1824, 6. INRA063, 7. TGLA122, 8. HEL5, 9. ILSTS005
每个位点上的 3 个样品电泳结果从左到右依次为: 母亲(瘤牛)、犊牛(F₁)、父亲(大额牛)
The results of electrophoresis of three samplings at each microsatellite locus were mother (Brahman), calf (F₁) and father (Mithun) left to right, respectively

图 3 9 个基因座的聚丙烯酰胺凝胶电泳图
Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of 9 microsatellite loci

2.3 杂种牛体尺、体重测定结果

F₁ 代犊牛 ($n=1$) 的体重、体尺测定结果如表 3 所示。

3 讨论

3.1 大额牛冷冻精液的应用效果

试验组的受精率和可用胚率高于对照组, 获胚数

表 3 杂交 F₁ 代牛的体尺、体重

Table 3 The body size and weights of crossbreed F₁ at different ages

测定项目 Item	初生 Birth	6 月龄 6-month	12 月龄 12-month
体重 Body weight (kg)	31.5	180.0	280.0
额宽 Eye to eye space (cm)	12	19	19
头长 Head length (cm)	12	38	43
体长 Body length (cm)	61	86	127
体高 Height at wither (cm)	70	100	115
十字部高 Height at hip cross (cm)	77	107	119
胸深 Chest depth (cm)	31	49	57
胸宽 Chest width (cm)	23	30	38
后躯宽 Hip width (cm)	20	32	34
尻长 Rump length (cm)	34	37	43
胸围 Heart girth (cm)	73	138	156
管围 Circumference of cannon bone (cm)	11	15	18

和可用胚数低于对照组, 但均无显著差异, 说明现有大额牛冻精与瘤牛冻精具有同等的受精能力, 在同等条件下获可用胚数的多少主要取决于供体个体对外源激素的敏感性等因素; 胚胎解冻后培养 24 h 能够孵化, 说明胚胎发育良好, 可冷冻保存; 287 号瘤牛母牛用大额冻精人工授精后成功产下 1 头母犊, 母牛妊娠期 288 d, 比 Giasuddin 等^[12]报道的印度大额牛妊娠期 (296.05±3.87 d) 短、比大额牛与普通牛杂交牛的妊娠期 (281.7±1.2 d) 长, 介于奶牛、黄牛与大额牛、瘤牛之间。瘤牛和黄牛杂交较为普遍, 如云南省培育中的 BM_Y 牛[1/2 瘤牛(Brahman)×1/4 莫累灰(Murray Grey)×1/4 云南黄牛(Yunnan yellow cattle)], 大额牛和黄牛杂交在云南高黎贡山一带也有成功的例子。黄牛 (*Bos taurus*)、牦牛 (*Bos grunniens*)、高峰牛 (*Bos indicus*)、大额牛 (*Bos frontalis*) 和云南野牛 (*Bos gaurus readei*) 的染色体数目 (2n) 分别是 60、60、60、58 和 56, 并推测如果大额牛和野牛、黄牛和野牛、高峰牛(瘤牛)和大额牛、高峰牛和野牛之间进行杂交有 3 种可能性: 一是杂交不孕, 二是杂种不育, 三是杂种可育, 后两者可能性较大^[1]。本研究表明确实大额牛与瘤牛杂交可行, 杂交牛能否正常繁殖尚待研究。Winter 等^[2]报道, 大额牛与瘤牛杂交 F₁ 代公牛的精子发生过程达到相当高的阶段, 但是没有精子生成, 说明杂种公牛可能不育。

3.2 种间杂交 F₁ 代亲子鉴定结果

亲子鉴定广泛在法医领域应用^[13,14]。近几年来, 微卫星 DNA 技术在家畜亲子鉴定中应用越来越普遍。

孙业良等^[15]采用已知母女关系的陶赛羊和 7 只嫌父的耳组织为样本, 利用 9 个微卫星位点对 9 只陶赛羊 DNA 扩增, 从中找出父本, 父权概率 99.997%。贾名威等^[16]采用已确定母女关系 2 头奶牛血液样本和 5 嫌父的精液, 用 6 个 STR 基因座进行亲子鉴定, 对 1 头母本已知的奶牛在嫌疑父中找出父本, 父权概率 99.993%。韩春梅等^[17]用 30 只吉戎兔的肝和血液样本进行亲子鉴定结果表明, 双亲资料不清时, 13 个位点的累计非父排除率为 0.935226, 置信度低于 85%; 一亲资料已知时, 13 个位点的累计非父排除率为 0.999329, 置信度为 95%。按国内外亲子鉴定惯例, 当 RCP 值 > 99.73% 时, 则可以认为假设父与孩子具有亲生关系。本研究是在母女关系 (287 号母牛与 F₁ 牛犊) 确定的前提下, 为确定父女 (*Bos* 001 号大额牛公牛与 F₁ 牛犊) 关系, 验证 F₁ 牛犊的真实性而进行亲子鉴定的, RCP 为 99.9949%, 说明公牛与犊牛具有亲子关系, 它们是一个标准的三联体家庭成员。

3.3 种间杂交 F₁ 代牛的生长发育

F₁ 代牛的初生、6 月龄和 12 月龄的体重 (表 3) 分别比印度大额牛^[18]高 11.77、90.67 和 162.59 kg, 分别比云南瘤牛^[19]高 18.50、130.00 和 164.91 kg; 在相同的放牧环境条件下, 分别比婆罗门牛^[20]高 2.90、36.45 和 75.51 kg, 比 BMY 牛^[20]高 1.96、14.38 和 72.58 kg; 初生~6 月龄、6~12 月龄和初生~12 月龄平均日增重分别达 815.93、546.45 和 680.82 g·d⁻¹, 分别比婆罗门牛高 183.84、213.63 和 198.68 g, 分别比 BMY 牛高 81.93、273.45 和 193.48 g。同时也明显高于孟加拉大额牛^[9]和印度大额牛^[18]的日增重。F₁ 代牛 12 月龄的体高、体长和胸围分别比中型大额牛^[21]高 8、18、8 cm, 分别比 BMY 牛^[22]高 7.17、14.50 和 14.00 cm, 说明杂种牛周岁前生长发育快。

4 结论

大额牛冻精可在瘤牛体内胚胎生产中应用; 大额牛与瘤牛种间杂交可行; 此例 F₁ 代牛真实, 为国内首例大额牛 (独龙牛) 与瘤牛的种间杂交牛犊; 杂种牛生长发育快, 杂种优势明显。按中国大额牛目前的生存环境状况, 若不及早采取各种措施加以保护, 群体有可能灭绝^[23]。本研究为有效地开展精液生产与保存、纯种大额牛胚胎生产与冷冻保存, 建立大额牛基因库及种间杂种优势利用等研究提供了参考依据。由于目前仅有 1 头 F₁ 代牛的数据, F₁ 代牛的杂种优势利用潜能有待进一步研究。笔者正致力于大额牛与云南

黄牛、瘤牛的种间杂交试验研究, 有望获得更多的试验数据。

致谢: 亲子鉴定委托中国科学院昆明动物研究所完成, 云南大学杨健康同志提供部分相关参考资料, 谨致谢忱。

References

- [1] 单祥年, 陈宜峰, 罗丽华, 曹筱梅, 宋继志, 曾养志. 我国黄牛属 (*Bos*) 五个种的染色体比较研究. 动物学研究, 1980, 1(1): 75-81.
Shan X N, Chen Y F, Luo L H, Cao X M, Song J Z, Zeng Y Z. Comparative studies on the chromosomes of five species of cattle of the Genus *Bos* in China. *Zoological Research*, 1980, 1(1): 75-81. (in Chinese)
- [2] Winter H, Mayr B, Schlegler W, Dworak E, Krutzler J. Genetic characterisation of the mithun (*Bos frontalis*) and studies of spermatogenesis, blood groups and haemoglobins of its hybrids with *Bos indicus*. *Research in Veterinary Science*, 1986, 40(1): 8-17.
- [3] 兰 宏, 雄习昆, 林世英, 刘爱华, 施立明. 云南黄牛和大额牛 mtDNA 多态性研究. 遗传学报, 1993, 20: 419-425.
Lan H, Xiong X K, Li S Y, Liu A H, Shi L M. Mitochondrial DNA polymorphism of cattle (*Bos taurus*) and mithun (*Bos frontalis*) in Yunnan province. *Acta Genetica Sinica*, 1993, 20: 419-425. (in Chinese)
- [4] 聂 龙, 施立明, 和向东, 赵玉龙, 木文刚, 张建良. 独龙牛遗传多样性及其种群结构的等位酶分析. 遗传学报, 1995, 22(3): 185-191.
Nie L, Shi L M, He X D, Zhao Y L, Mu W G, Zhang J L. Genetic diversity and genetic structure in population mithun (*Bos frontalis*) analyzed by allozyme. *Acta Genetica Sinica*, 1995, 22(3): 185-191. (in Chinese)
- [5] 葛长荣, 陈 韬, 袁希平. 大额牛、云南瘤牛屠宰性能研究. 黄牛杂志, 1996, 22(3): 31-33.
Ge C R, Chen T, Yuan X P. A study on slaughtering performance of Yunnan Zebu and width forehead cattle (*Bos frontalis*). *Journal of Yellow Cattle Science*, 1996, 22(3): 31-33. (in Chinese)
- [6] 徐宝明, 肖汪吉, 葛长荣, 田允波. 云南主要地方牛种体尺测定. 黄牛杂志, 1998, 24(2): 26-29.
Xu B M, Xiao W J, Ge C R, Tian Y B. Body measurements of main native cattle breeds in Yunnan. *Journal of Yellow Cattle Science*, 1998, 24(2): 26-29. (in Chinese)
- [7] 和协超, 沈 放, 季维智, 赵家才, 刘国璋, 杨国荣, 和占星. 电刺激采集大额牛精液及其低温冷冻的初步研究. 兽类学报, 2000, 20(3): 239-240, 232.
He X C, Shen F, Ji W Z, Zhao J C, Liu G Z, Yang G R, He Z X.

- Successful electro-ejaculation and semen cryopreservation of *Bos frontalis*. *Acta Theriologica Sinicavol*, 2000, 20(3): 239-240, 232. (in Chinese)
- [8] 赵家才, 何华川, 张翠兰. 大额牛冷冻精液技术的研究. *黄牛杂志*, 2005, 31(4): 16-18.
- Zhao J C, He H C, Zhang C L. Study on semen freezing method of *Bos frontalis*. *Journal of Yellow Cattle Science*, 2005, 31(4): 16-18. (in Chinese)
- [9] Huque K S, Rahman M M, Jalil M A. Study on the growth pattern of mithuns (*Bos frontalis*) and their crossbred calves. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2001, 14: 1245-1249.
- [10] 范江平, 叶绍辉, 葛长荣, 和天宝, 黄玉路. 杂交大额牛肉质特性研究初报. *云南农业大学学报*, 2005, 20: 600-602.
- Fan J P, Ye S H, Ge C R, He T B, Huang Y L. Research on the meat characteristic of crossbred mithun. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2005, 20: 600-602. (in Chinese)
- [11] 杨庆恩. 亲子鉴定 DNA 分型亲权指数的简化计算法. *中国法医学杂志*, 1998, 13(2): 90-92.
- Yang Q E. The reduced calculation of PI value in case of paternity testing. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 1998, 13(2): 90-92. (in Chinese)
- [12] Giasuddin M, Huque K S, Alam J. Reproductive potentials of mithun (*Bos frontalis*) under semi-intensive management. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2003, 16: 331-334.
- [13] 霍振义, 刘雅诚, 唐晖, 杨剑, 高俊薇, 张庆霞, 贾淑琴. 2718 例亲子鉴定结果的分析. *中国法医学杂志*, 2003, 18(1): 31-32.
- Huo Z Y, Liu Y C, Tang H, Yang J, Gao J W, Zhang Q X, Jia S Q. Analysis of 2718 parentage identification cases. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2003, 18(1): 31-32. (in Chinese)
- [14] 许业莉, 蔡颖, 相大鹏, 庄逸林, 梁希扬. D3S1358 等 10 个短串联重复序列位点在亲子鉴定中的作用. *中国微生物生态学杂志*, 2005, 17(1): 36-38.
- Xu Y L, Cai Y, Xiang D P, Zhuang Y L, Liang X Y. Study on the application of ten STR loci in parentage testing. *Chinese Journal of Microecology*, 2005, 17(1): 36-38. (in Chinese)
- [15] 孙业良, 谢庄, 刘国庆, 任航行, 王刚, 代蓉. 利用微卫星 DNA 技术进行绵羊亲子鉴定. *安徽农业大学学报*, 2005, 32: 301-305.
- Sun Y L, Xie Z, Liu G Q, Ren H X, Wang G, Dai R. Parentage identification of sheep by microsatellite DNA technology. *Journal of Anhua Agricultural University*, 2005, 32: 301-305. (in Chinese)
- [16] 贾名威, 杨利国, 管峰, 陆汉希, 金穗华. 应用 6 个 STR 基因座进行奶牛亲子鉴定. *南京农业大学学报*, 2004, 27(1): 74-77.
- Jia M W, Yang L G, Guan F, Lu H X, Jin S H. Parentage identification of dairy cattle by six STR loci. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2004, 27(1): 74-77. (in Chinese)
- [17] 韩春梅, 张嘉保, 高庆华, 陈庆波. 微卫星 DNA 在吉戎兔亲子鉴定中的应用研究. *遗传*, 2005, 27: 903-907.
- Han C M, Zhang J B, Gao Q H, Chen Q B. Study on parentage testing in JIROUN rabbit by microsatellite markers. *Hereditas*, 2005, 27: 903-907. (in Chinese)
- [18] Bhusan S, Rajkhowa C, Bujarbaruah K M. Body weight and growth pattern in mithun (*Bos frontalis*). *Indian Journal of Animal Sciences*, 2005, 75: 1186-1188.
- [19] 云南省家畜家禽品种志编写委员会. 云南省家畜家禽品种志. 昆明: 云南科技出版社, 1987: 77-81.
- Editorial Committee of the "Breeds of Domestic Animal and Poultry in Yunnan". *Breeds of Domestic Animal and Poultry in Yunnan*. Kunming: Yunnan Scientific and Technical Publishers, 1987: 77-81. (in Chinese)
- [20] 文际坤, 杨国荣, 赵开典, 王安奎, 张继才, 和占星. BMV 牛的扩繁和选育研究. *云南畜牧兽医*, 2003, (3): 1-4.
- Wen J K, Yang G R, Zhao K D, Wang A K, Zhang J C, He Z X. Study on reproduction and selective breeding BMV cattle. *Yunnan Journal of Animal Science and Veterinary*, 2003, (3): 1-4. (in Chinese)
- [21] 田允波, 和绍禹, 葛长荣. 大额牛. *黄牛杂志*, 1998, 24(2): 1-8.
- Tian Y B, He S Y, Ge C R. Mithun. *Journal of Yellow Cattle Science*, 1998, 24(2): 1-8. (in Chinese)
- [22] 赵开典, 朱芳贤, 李天平, 杨国荣. 不同杂交组合牛及纯种牛生长发育比较研究. *黄牛杂志*, 1996, 22(增刊): 11-19.
- Zhao K D, Zhu F X, Li T P, Yang G R. Comparison of growth and development among different crossbred combination and its purebred cattle. *Journal of Yellow Cattle Science*, 1996, 22(Suppl.): 11-19. (in Chinese)
- [23] 马月辉, 吴常信. 群体生存力分析在大额牛保护中的应用研究. *畜牧兽医学报*, 2002, 33: 127-131.
- Ma Y H, Wu C X. Study on conservation of mithun with population viability analysis. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2002, 33: 127-131. (in Chinese)

(责任编辑 高雨, 林鉴非)