

大额牛与婆罗门牛种间杂交的亲子鉴定*

亏开兴, 和占星**, 张继才, 赵刚
(云南省肉牛和牧草研究中心, 云南昆明 650212)

摘要: 利用9个微卫星座位对一例大额牛与婆罗门牛杂交后代进行亲子鉴定, 所有座位都呈孟德尔共显性遗传, 计算的父权相对机会为99.9949%, 证实此例亲子鉴定的确是一个三联体家庭成员, 也证实大额牛 (*Bos frontalis*) 与婆罗门牛 (*Bos indicus*) 种间杂交的可行性。

关键词: 大额牛与婆罗门牛杂交; 亲子鉴定; 种间杂交

中图分类号: S 813.22; Q 953 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X (2008) 03-0339-04

Parentage Identification of Interspecies Crossbreeding between Mithun (*Bos frontalis*) and Brahman Cattle (*Bos indicus*)

QU Kai-xing, HE Zhan-xing, ZHANG Ji-cai, ZHAO Gang
(Yunnan Beef Cattle and Pasture Research Center, Kunming 650212, China)

Abstract: By assaying 9 microsatellite DNA loci, parentage identification was carried out to confirm whether the F1 hybrid of two species of mithun (*Bos frontalis*) × Brahman cattle (*Bos indicus*) existed. All detected loci were co-dominant inheritance and the relative chance of paternity (RCP) was 99.9949%. The results revealed that the offspring in this case was the hybrid between mithun (*Bos frontalis*) and Brahman cattle (*Bos indicus*), and it was potential for inter-species crossbreeding between mithun (*Bos frontalis*) and Brahman cattle (*Bos indicus*).

Key words: mithun × Brahman cattle; parentage identification; inter-species crossbreeding

大额牛又名独龙牛, 在我国仅分布于云南省独龙江、怒江流域, 印度阿萨姆邦、东孟加拉和缅甸北部也有分布。现云南境内大额牛的群体规模不足3000头, 源产地在怒江州贡山县、福贡县境内, 现泸水县有2个异地保种群, 其它地方尚有规模为3~30头大小不等的零星小群体, 牛群基本上栖居高山密林, 交通极为不便, 设施条件非常差。由于大额牛 (*Bos frontalis*) 染色体 $2n = 58$ ^[1], 介于瘤牛 (*Bos indicus*, $2n = 60$)、黄牛 (*Bos taurus*, $2n = 60$) 与野牛 (*Bos gaurus*, $2n = 56$) 之间, 因而被认为是牛属中独立的一个

种^[1,2], 有人认为是野牛与黄牛的杂交后代^[3], 推算染色体数目正好相差一个罗伯逊易位, 但还缺乏更多的科学依据。大额牛的系统分类地位与印度野牛、班腾牛最近^[4]。湿热地区是世界肉牛产业的重要组成部分, 而婆罗门牛属瘤牛品种之一, 这便是适应这种环境的最佳肉牛品种, 婆罗门牛还是干旱沙漠地带的肉牛品种, 其分布广泛, 适应性强; 它也以其自身的优良特性而备受育种学家的青睐和采用导入杂交培育新的肉牛品种^[5]。大额牛与瘤牛、黄牛的种间杂交颇受动物学家们的关注, 并认为种间杂交的可能性, 还有

收稿日期: 2007-08-29 修回日期: 2007-09-19

* 基金项目: 云南省肉牛和牧草研究中心主任基金 (YNBP2006DF002); 云南省科技攻关项目资助 (2006NG23)

** 通讯作者

作者简介: 亏开兴 (1975-), 男, 云南祥云人, 硕士, 助理研究员, 主要从事动物遗传育种的研究。

E-mail: kaxqu@yahoo.com.cn

文献报道了与黄牛杂交后代的肉用性能^[6]，但尚未报道有关分子生物学支持种间杂交的可行性。

微卫星 DNA，或短序列重复，高度多态，遵循典型的孟德尔遗传定律，共显性遗传，已被广泛地应用于法医、畜牧业及野生动物的亲子关系鉴定中^[7-9]，籍此笔者针对一例大额牛与婆罗门牛的种间杂交后代进行亲子鉴定，以提供分子生物学水平的证据，确认大额牛与瘤牛种间杂交的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大额牛公牛冷冻精液（云南省家畜冷冻精液站库存），婆罗门牛及杂交后代颈静脉血 5 ~ 10 mL，血样采自云南省肉牛和牧草研究中心小哨示范牧场，肝素钠抗凝，带回实验室 -20 °C 保存

备用。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取

血液中总 DNA 提取按常规酚/氯仿法提取，精液 DNA 二步消化酚/氯仿提取法提取^[9-11]，略有改进。进行其纯度和浓度检验，稀释至 50 ng/μL 备用。

1.2.2 微卫星引物

引物自上海生工生物工程技术有限公司订购合成，9 个微卫星座位的引物序列信息见表 1，其中 BM 1824，BM 2113，TGLA 122，SPS 115，ETH 225 这 5 对引物为 ISAG (International Society of Animal Genetics) 推荐在牛亲子鉴定中使用。其余引物的引用文献：HEL 5 为 [12]，ILSTS 005 为 [13]，INRA 063 为 [14]，ETH 152 为 [15]。

表 1 微卫星 DNA 座位引物序列

Tab. 1 Primer sequences of 9 microsatellite DNA loci

染色体 chromosome	微卫星座位 locus	引物序列 (5'→3') primer Sequences (5'→3')	退火温度 /°C T _A
1	BM 1824	P1: GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC P2: CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG	58
2	BM 2113	P1: GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC P2: CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC	54
21	HEL 5	P1: GCA GGA TCA CTT GTT AGG GA P2: AGA CGT TAG TGT ACA TTA AC	55
10	ILSTS 005	P1: GGA AGC AAT GAA ATC TAT ATGCC P2: TGT TCT GTG AGT TTG TAA GC	54
18	INRA 063	P1: ATT TGC ACA AGC TAA ATC TAA CC P2: AAA CCA CAG AAA TGC TTG GAA G	58
21	TGLA 122	P1: CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC P2: AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C	54
5	ETH 152	P1: TAC TCG TAG GGC AGG CTG CCT G P2: GAG ACC TCA GGG TTG GTG ATC AG	55
15	SPS 115	P1: AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC CAG P2: CAC AGC CAA ACT AGG ACA CTC GTT	60
9	ETH 225	P1: GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T P2: ACA TGA CAG CCA GC6T GCT ACT	60

1.2.3 PCR 扩增

反应体系按引物各 0.2 μL，dNTP 0.4 μL，10 × Buffer 1.0 μL，BSA 0.2 μL，7.0 μL H₂O 计 10 μL；Taq 酶 0.25 μL，混匀后分装，再加 0.6 μL DNA 模板（50 ng/μL）。以 1 滴石蜡油覆盖，瞬时离心。PCR 反应条件：95 °C 预变性 3 min，然后进行 30 个循环，每个循环包括：94 °C 变性 30 s，52 ~ 58 °C 退火 40 s，72 °C 延伸 30 s；72 °C 后延伸 5 min。1.5% ~ 2.0% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物的特异性^[16]。

1.2.4 电泳及等位基因大小的判别

于 PCR 扩增产物中加入 Loading buffer，混匀；98 °C 变性 2 min，立即置冰上。然后点样至 8% 聚丙烯酰胺非变性凝胶上电泳分型（以 DNA Marker 2000 为对照读数，150 V 电压，电泳 9 h）。常规银染法显带，拍照读数。

1.2.5 父权概率的计算

累积父权概率，或父权相对机会（RCP，relative chance of paternity）按贾名威等^[9]的方法计算。

1.3 杂交犊牛的获得与出生

2005年4月在小哨示范牧场进行超数排卵处理(数据未公开), 冻精为大额牛精液。对于287号婆罗门牛母牛左侧子宫角回收胚胎, 左侧卵巢

上有5个黄体, 回收到2枚胚胎; 而右侧卵巢上只有1个发育良好的黄体, 有意不施行胚胎回收, 使胚胎着床妊娠直至产犊。于2006年1月顺利产下1头母犊(图1), 妊娠期是288 d。



图1 大额牛种公牛、婆罗门牛及其出生后3 d的杂交后代
Fig. 1 The mithun bull, Brahman cow and their 3-day-old offspring

2 结果与分析

对3个个体的9个牛微卫星座位进行检测, 在每一座位上有两个等位基因, 一个等位基因应来自父亲, 而另一等位基因则来自母亲。在检测的9个微卫星座位上, 犊牛与公牛、犊牛与母牛如期地出现了共显性遗传的等位基因位点, 检测结果见表2。所得的RCP为99.9949%, 表明犊牛与测试的公牛具有亲子关系, 属标准三联体亲子关系。

表2 用9个微卫星座位界定3头牛的基因型

Tab. 2 The genotypes of the 3 cattles defined by 9 microsatellite DNA markers

基因位点 locus	母牛 cow	公牛 bull	小牛 calf
BM 2113	130/138	130/138	130/138
ETH 152	148/168	162/188	148/162
SPS 115	240/248	248/248	248/248
ETH 225	132/146	146/146	146/146
BM 1824	176/194	184/184	176/184
INRA 063	180/180	172/172	172/180
TGLA 122	136/156	156/176	156/176
HEL 5	146/162	162/162	146/162
ILSTS 005	189/197	189/189	189/189

3 讨论

亲子鉴定除在法医领域应用外, 也在野生濒危

危动物及畜牧业公畜确认中广泛应用, 旨在控制小群体内的近交发生导致的群体生活力下降, 畜牧业中由于现代繁殖生物技术的发展, 公畜影响面越来越大, 因而优秀公畜的后裔也很多, 优秀种畜在生产上的贡献比较突出, 因此亲子鉴定对畜牧业有重要的指导意义, 将为稀有物种的延续及配种方案的制订提供清晰的系谱信息。微卫星DNA标记就是解决这一问题的有效手段, 马匹、奶牛、肉牛、东北虎、绵羊等动物都有学者成功解决了亲子关系的确认。ELLEGREN等^[17]用5个马科的微卫星座位(必须有6个以上的多态座位)判定马的亲权关系可使排除率达98%以上, 10个位点排除率达99.99%。BINNS等^[18]用6个微卫星位点解决了20匹以前用血型无法判定的纯血马, LEE和CHOI^[19]应用14对马科微卫星引物对纯种马进行鉴定, 结果支持微卫星标记在亲子鉴定中的潜力, 排除率为99.98%。贾名威等^[8]也用6个微卫星座位判清了几头奶牛的嫌疑父亲, 还使用这6对引物为法院做过亲子鉴定, 破案后确与事实吻合。SHERMAN等^[20]使用微卫星座位评价肉牛公牛数量和公牛间亲缘关系对后代的影响, 并计算非父排除率和不明父亲的概率。HEYEN等^[11]、MOMMENS等^[21]也用微卫星引物作了大量的亲子鉴定研究, 同时也指出微卫星是作为遗传距离计算和分子系统发生树构建的理想标记。张于光等^[8]用6对家猫和4对苏门答腊虎共10对

引物鉴定了 7 个父子关系不清的东北虎后代。对于绵羊的嫌疑父亲确认, 微卫星标记的使用也是一样的有效与准确^[22]。

一般地, RCP 高于 99.73% 就认定亲子关系的成立^[22], 笔者获得的 RCP 为 99.9949%, 表明它们的确是一个标准三联体家庭成员, 进而也证实大额牛 (*Bos frontalis*) 与婆罗门牛 (*Bos indicus*) 种间存在杂交的可行性。据调查, 大额牛与黄牛的杂交现象也较为普遍, 且母性能育, 因此这方面的工作也在开展, 届时希望能提供一个分子水平的证据支持大额牛与黄牛杂交的可行性。目前, 大额牛的群体规模较小, 利用大额牛冻精来开展杂交很值得商榷, 大额牛的保种也尤为迫切, 突出的不利因素是生境或栖息地日益缩小、高山竹林竹笋被过度砍伐与猎取、伐木以及道路造成的地理隔离等。

致谢: 中国科学院昆明动物研究所云南省畜禽分子生物学重点实验室提供的优良技术条件支持, 在此表示由衷的感谢。

[参考文献]

- [1] 单祥年, 陈宜峰, 罗丽华, 等. 大额牛核型分析 [J]. 遗传, 1980, 2 (5): 25-27.
- [2] WALKER E P. Mammals of the World [J]. Oxford Press, 1968, (2): 1431.
- [3] FRANCIS H. Extinct and Vanishing Mammals of the Old World, U. S. A. [M]. Lord Baltimore Press, 1945: 520.
- [4] VERKKAAR E L C, NIJIMAN I J, BEEKE M, et al. Maternal and paternal lineages in cross-breeding Bovine species. Has wisent a hybrid origin [J]. Molecular Biology and Evolution, 2004, 21 (7): 1165-1170.
- [5] QU K, WU G, LIAO X, et al. Mitochondrial DNA D-loop variation and genetic background of Brahman cattle [J]. 动物学研究, 2006, 27 (6): 615-620.
- [6] 范江平, 叶绍辉, 葛长荣, 等. 杂交大额牛肉质特性研究初报 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20 (4): 600-602.
- [7] MARKLUND S, ELLEGREN H, ERIKSSON S, et al. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites [J]. Animal Genetics, 1994, 25 (1): 19-23.
- [8] 张于光, 李迪强, 饶力群, 等. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用 [J]. 动物学报, 2003, 49 (1): 118-123.
- [9] 贾名威, 杨利国, 管峰, 等. 应用 6 个 STR 基因座进行奶牛亲子鉴定 [J]. 南京农业大学学报, 2004, 27 (1): 74-77.
- [10] LIEN S. A method for isolation of DNA from frozen bull semen [J]. Animal Breeding and Genetics, 1990, 74: 104.
- [11] HEYEN DW, BEEVER JE, DA Y, et al. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing [J]. Animal Genetics, 1997, 28 (1): 21-27.
- [12] KAUKINEN J, VARVIO S L. Eight polymorphic bovine microsatellites [J]. Animal Genetics, 1993, 24 (2): 148.
- [13] BREZINSKY L, KEMP S J, TEALE A J. ILSTS005: a polymorphic bovine microsatellite [J]. Animal Genetics, 1993, 24 (1): 73.
- [14] VAIMAN D, MERCIER D, MOAZAMI-GOUDARZI K, et al. A set of 99 cattle microsatellites; characterization, synteny mapping, and polymorphism [J]. Mammalian Genome, 1994, 5 (5): 288-297.
- [15] FRIES R, EGGEN A, WOMACK J E. The bovine genome map [J]. Mammalian Genome, 1993, 4 (8): 405-428.
- [16] 亏开兴, 朱芳贤, 吴桂生, 等. 用 6 个微卫星座位研究 BMY 牛和婆罗门牛的遗传多样性和群体遗传结构 [J]. 遗传, 2006, 28 (3): 285-290.
- [17] ELLEGREN H, JOHANSSON M, SANDBERG K, et al. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse [J]. Animal Genetics, 1992, 23 (2): 133-142.
- [18] BINNS M M, HOLMES N G, HOLLIMAN A, et al. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing [J]. The British Veterinary Journal, 1995, 151 (1): 9-15.
- [19] LEE S, CHO G. Parentage testing of thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing [J]. Journal of Veterinary Science, 2006, 7 (1): 63-67.
- [20] SHERMAN G B, KACHMAN S D, HUNGERFORD L L, et al. Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA polymorphism-based measures of exclusion probability and probability of unambiguous parentage [J]. Animal Genetics, 2004, 35 (3): 220-226.
- [21] MOMMENS G, VAN ZEVEREN A, PEELMAN L J. Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L [J]. Animal Genetics, 1998, 29 (1): 12-18.
- [22] 孙业良, 谢庄, 刘国庆, 等. 利用微卫星 DNA 技术进行绵羊亲子鉴定 [J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32 (3): 301-305.