

利用胎盘研究藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)初生性别比例

陈家瑞^{1,2}, 张守栋^{1,2}, 李 邦^{1,2}, 张同作¹, 苏建平^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所 青海省动物生态基因组学重点实验室, 中国青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 中国北京 100049)

摘 要:为研究藏羚羊初生性别比例, 判断母羊怀孕期间有无偏性选择孕育过程, 根据藏羚羊繁殖特点, 在可可西里自然保护区卓乃湖藏羚羊产羔地收集到 116 份藏羚羊胎盘样品, 阿尔金山兔子湖产羔地收集到 32 份胎盘样品, 参照文献中对牛科动物进行性别鉴定的 3 对特异性引物, 利用分子生物学方法对样品性染色体类型进行鉴定, 从而得到藏羚羊新生羊羔的性别, 即藏羚羊初生性别比。结果显示, 148 份藏羚羊胎盘样品中共有雌性 76 头, 雄性 72 头, 初生性别比为 1 : 1.06, 经 χ^2 检验, 差异不显著($P=0.742$), 说明藏羚羊初生性别比未明显偏离理论值 1 : 1。以上研究表明, 雌性藏羚羊在怀孕期间无偏性选择作用或这种选择作用非常微弱, 不足以影响藏羚羊种群性别比例; 而且, 利用胎盘对藏羚羊进行初生性别研究是可行的, 其他有类似繁殖模式的野生动物也可用此方法研究其初生性别比。

关键词: 藏羚羊; 胎盘; 初生性别比; 性别鉴定; PCR

中图分类号: Q145+1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2016)06-0471-04

Studies on Offspring Sex Ratio of Tibetan Antelope (*Pantholops hodgsonii*) by Placenta

CHEN Jia-rui^{1,2}, ZHANG Shou-dong^{1,2}, LI Bang^{1,2}, ZHANG Tong-zuo¹,
SU Jian-ping^{1*}

(1. Qinghai Key Laboratory of Animal Ecological Genomics, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, Qinghai, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To investigate the offspring sex ratio of Tibetan antelope and determine whether sex-biased selection was existent, 116 Tibetan antelope placentas from Zhuonai Lake lambing region in Kekexili Nature Reserve and 32 placentas from Tuzi Lake lambing region in Arjin Mountain National Nature Reserve were collected, which was based on the reproductive characteristics. Then three pairs of bovine sex-specific primers were selected based upon references, and DNA-based sexing was used to determine the sex chromosome type of the placenta samples, by which the sex of the newborns and the sex ratio among them were identified. The results showed that there were 76 females and 72 males among the total 148 placenta samples. The offspring sex ratio was 1 : 1.06, with $P=0.742$ by chi-square test, which meant that no significant sex bias was existent, and that the offspring sex ratio of Tibetan antelope didn't deviate from the theoretical value of 1 : 1. The above-mentioned studies show that, there is no sex-biased selection during the female pregnancy period, or the selective effects may be too weak to affect the sex ratio. It is feasible to study the offspring sex ratio of Tibetan antelope by placenta samples, and this method could also be used for some other wild animals which have the similar reproductive model with Tibetan antelope.

Key words: Tibetan antelope; placenta; offspring sex ratio; sex determination; PCR

(Life Science Research, 2016, 20(6): 471~474)

收稿日期: 2015-12-21; 修回日期: 2016-03-04

基金项目: 青海省住房与城乡建设厅“可可西里申遗生物资源调查专项”资助

作者简介: 陈家瑞(1985-), 女, 河南泌阳人, 博士研究生, 主要从事藏羚羊种群生态学研究; * 通讯作者: 苏建平(1964-), 男, 四川简阳人, 中国科学院西北高原生物研究所研究员, 博士, 主要从事青藏高原动物生态学研究, E-mail: jpsu@nwipb.ac.cn。

性别比例(sex ratio)即种群中雄性与雌性的比例,是动物种群生态学的重要研究指标,是判定种群稳定性的重要因素之一。根据动物种群年龄结构的变化,种群性别可被分为多个阶段。迄今为止的研究中,人们关注最多的为种群的成年性比(adult sex ratio, ASR)^[1, 2],而影响种群成年性别比例的因素有很多,其中包括母体对于初生性比的调节和控制^[3]。对种群个体性别的鉴定是研究性别比例的前提。传统的性别鉴定是基于对动物第二性征的分辨而确定性别,这种方法对于鉴定运动能力较弱、性别表征明显或者家养和半家养动物的性别是简便易行的,但是对于野生的警觉性较高、运动能力较强、性别表征不明显或者幼年时性别表征不明显的动物,显然无法准确判定其性别。随着胚胎学、细胞生物学的研究发展,一些新的对培养的细胞或者胚胎进行染色体型鉴定和性别鉴定的方法逐渐发展起来,如细胞遗传学方法^[4]、免疫学方法^[5]、生物化学方法以及分子生物学方法^[6-9]等。相比分子生物学方法而言,其他3种方法都需要活的动物细胞或组织,也就需要对研究对象进行损伤性取样,而自然界很多野生动物均为保护动物,这就限制了它们在野生动物性别鉴定中的广泛应用。相关研究证明,以PCR为研究手段的分子生物学方法是进行性别鉴定的最快捷、准确、可行性最高的方法^[10-12],且已经广泛应用于动物的性别鉴定^[13-15]。随着粪便分子生物学等无损伤取样研究方法的发展及应用,野生动物的性别鉴定研究也有了新的进展和突破^[16-18]。

胎盘,又称胎衣,是连接发育中的胎儿与母体,进行胎儿与母体间营养吸收、废物排泄、气体交换,以及抵抗感染和分泌激素的器官^[19]。通常,对人和哺乳动物胎盘的研究主要集中于医学上的病理学^[20, 21]、激素水平等基础代谢^[22, 23]以及药学作用^[24, 25]等方面,研究焦点汇集于母体信息的反馈。但是胎盘作为一种胎母器官,由胎儿胎盘及母体胎盘两部分组成,其中胎儿胎盘是胎盘的主要组成部分,其所携带的胎儿遗传基因和反映出的胎儿因素对解决与新生胎儿相关的科学问题同样具有重要的价值。而且胎盘主要由受精卵发育而来,具有和胎儿相同的整套基因组成,只是在后期的发育过程中,由于与母体子宫的接触和结合才使其携带了少量的母体组织。因此可以以胎盘为研究材料,利用分子生物学的研究方法对胎儿进行相关科学问题研究。但迄今为止,利用胎盘

对动物新生胎儿进行性别鉴定等的研究还处于空白阶段。

藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)为我国一级保护动物,隶属偶蹄目牛科山羊亚科羚羊属。有研究表明,藏羚羊种群结构中,雌性明显多于雄性^[26],但其中的调节方式及机制还鲜有研究,而且在雌性藏羚羊怀孕期间母体对胎儿性别是否有选择作用或选择作用的强弱也处于未知状态。藏羚羊新出生小羊羔的性别组成是唯一可以获得的反映母羊怀孕期间是否有性别偏向生育的指标,但新出生的小羊羔性别仅靠肉眼是无法辨别的,因此,利用其他辅助手段的性别鉴定方法是研究藏羚羊初生性别比例的不二选择。本文以藏羚羊胎盘为研究对象,采用PCR方法,对藏羚羊新出生小羊羔性别进行鉴定,以期用于后期藏羚羊种群性别比例研究的相关工作。

1 研究材料与方法

1.1 研究材料

已知性别的雌性样品为历年收集的难产死亡雌性样品,雄性样品为羌塘自然保护区森林公安局收缴的盗猎雄性羊头上取下的少量皮子。藏羚羊胎盘为2014年6月25日至7月3日期间于可可西里自然保护区卓乃湖藏羚羊产羔地及新疆阿尔金自然保护区兔子湖产羔地搜集得到,共收集到148份藏羚羊胎盘样品,去除表层可能污染的组织,取内部纯净组织,无水乙醇固定后带回实验室备用。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组DNA提取

采用氯仿异戊醇法^[27]抽提基因组DNA。

1.2.2 引物合成及PCR扩增

藏羚羊性别鉴定引物参照文献中已有的牛科动物性别鉴定通用引物KY1/KY2^[28]、SE47/SE48^[29]和Y1/Y2^[30],各引物序列及退火温度等信息见表1。扩增程序为95℃预变性10 min; 95℃变性1 min,退火30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环; 72℃延伸7 min。实验样品扩增前,先用往年收集的已知性别藏羚羊皮张样品检验各引物用于性别鉴定的准确性,确定完全无误后再用于实验样品的性别鉴定。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测

PCR扩增产物用浓度为2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,电泳电压为60~80 V,之后进行凝胶成像。

表 1 引物序列及相关信息
Table 1 Primer sequences and the related information

Primers	Sequences (5'-3')	Annealing temperature/℃	Productive size/bp
KY1/KY2	F: GCCCAGCAGCCCTTCCAG	60	♂: 219+174
	R: TGGCCAAGCTTCCAGAGGCA		♀: 219
SE47/SE48	F: CAGCCAAACCTCCCTCTGC	60	♂: 280+217
	R: CCCGCTTGGCTTGTCTGTTGC		♀: 280
Y1/Y2	F: GGATCCGAGACACAGAACAGG	55	♂: 300
	R: GCTAATCCATCCATCCTATAG		♀: -

1.2.4 数据分析

藏羚羊初生性比为雄性数量与雌性数量的比。使用 SPSS 19.0 软件计算差异显著性。

性别比(♀ : ♂)为 1.06 : 1 ($n=148$, $\chi^2=0.108$, $P=0.742$), 差异不显著, 即藏羚羊的出生性别比例未明显偏离理论值 1 : 1。

2 研究结果

2.1 引物检验结果

用已知性别的雌雄样品对 3 对引物进行验证, 结果如图 1 所示: 对于 KY1/KY2 引物, 雄性样品扩增出两条长度分别约为 220 bp 和 180 bp 的扩增产物, 雌性样品扩增出 220 bp 左右的扩增产物; 对于 SE47/SE48 引物, 雄性样品扩增出两条长度约 280 bp 和 220 bp 的 DNA 产物, 雌性样品扩增出长度约 280 bp 的 DNA 产物; 对于 Y1/Y2 引物, 雄性样品扩增出 300 bp 左右的扩增产物, 雌性样品无扩增产物。上述结果与参考文献中其他牛科动物扩增片段相近, 且 3 对引物所检验出的雌雄个体结果一致, 表明用这 3 对引物对藏羚羊个体进行性别鉴定的结果是可信的。

2.2 藏羚羊初生性别比例

利用 KY1/KY2、SE47/SE48、Y1/Y2 三对引物, 分别对藏羚羊胎盘基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测后对比各引物扩增结果得出: 148 份样品共有雌性 76 头, 雄性 72 头, 雌雄

3 讨论分析

藏羚羊是青藏高原特有的物种^[3], 在长期对高原环境的适应进化中, 很好地适应了青藏高原独特的恶劣气候环境, 并成为青藏高原典型的代表动物和自然生态系统的重要指标。多年来, 对藏羚羊的研究主要集中在数量与分布、社群特征、迁徙和产仔、遗传多样性、行为时间分配及活动节律、青藏铁路和青藏公路对其迁徙的影响等方面^[32-36], 但由于其栖息地海拔高、环境条件恶劣, 警觉性高, 同时缺乏较好的研究材料等原因, 对藏羚羊性别比例的研究甚少, 且都是肉眼观察判定其性别^[37], 误差较大, 尤其是对其初生性别比例的研究, 一直处于空白阶段。

已有的多数观察结果均表明藏羚羊群体中雌性明显多于雄性, 而究其调节机制, 也多用雌性死亡率偏高简单带过^[26, 38]。本文为探究在藏羚羊雌性怀孕期间有无性别选择作用, 根据藏羚羊每年产羔期相对集中, 且产羔地固定等特点, 即每年 6~7 月份藏羚羊进入产羔期, 除少部分留在本

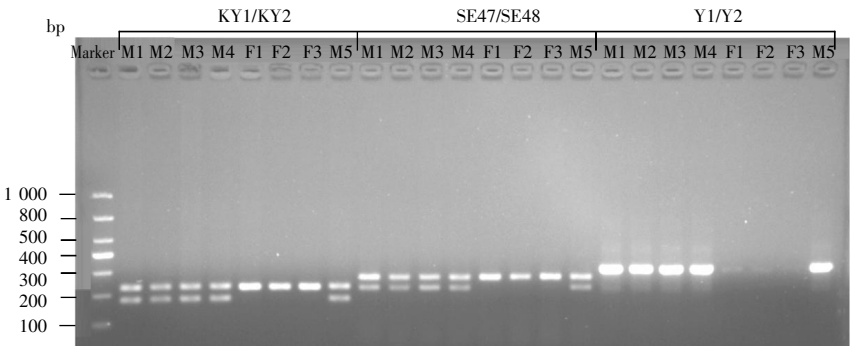


图 1 藏羚羊已知性别个体性别鉴定电泳图
KY1/KY2 和 SE47/SE48 引物扩增结果显示, 雄性样品有两条扩增带, 雌性样品只有一条扩增带; Y1/Y2 扩增结果显示, 雄性样品有一条扩增产物, 雌性无扩增产物。M: 雄性; F: 雌性。

Fig.1 Electrophoresis products for sex-known Tibetan antelope
For KY1/KY2 and SE47/SE48 primers, the females consistently showed a single band and the males showed double bands, while for Y1/Y2 primers, the males showed a Y-linked band and the females had no amplification product. M: Male; F: Female.

土产羔的羊群外,绝大多数藏羚羊羊群会经历几十数百公里的迁移,到卓乃湖、太阳湖等产羔地集体产羔,以藏羚羊胎盘为研究材料,利用分子生物学方法对其出生性别比例进行研究,得到藏羚羊初生性比为 1:1.06,未明显偏离理论值 1:1。由此结果虽然不能明确地推断出雌性藏羚羊怀孕期间没有性别的偏向选择作用,但至少可以说明即使有这种作用存在,其对藏羚羊的初生性比乃至整个种群性别比例的影响非常微弱,不足以导致其种群出现明显的雌性多于雄性的结果,因此必然还有其他的因素,使得在藏羚羊的生长发育过程中,雄性死亡率高于雌性死亡率。

本文以胎盘为材料研究了藏羚羊初生性别比例,为后续研究藏羚羊种群性别组成变化及种群发展趋势等提供了研究基础及判断依据,同时也为其他具有相似生产模式的野生动物(如岩羊)的初生性别比例研究提供了很好的研究参考。但由于本研究在取样时气候突变等原因造成的样本数量偏小,后续仍需加大采样量,并且希望能够更加全面地在藏羚羊各个产羔地收集胎盘样品,以得到更加完整和精确的藏羚羊初生性别比例数据。

参考文献(References):

- [1] MARTIN J G A, FESTA-BIANCHET M. Sex ratio bias and reproductive strategies: what sex to produce when?[J]. *Ecology*, 2011, 92(2): 441-449.
- [2] BERGER J, GOMPPER M E. Sex ratios in extant ungulates: products of contemporary predation or past life histories?[J]. *Journal of Mammalogy*, 1999, 80(4): 1084-1113.
- [3] BYERS J A, HOGG J T. Environmental effects on prenatal growth rate in pronghorn and bighorn: further evidence for energy constraint on sex-biased maternal expenditure[J]. *Behavioral Ecology*, 1995, 6(4): 451-457.
- [4] BONDIOLI K R, ELLIS S B, PRYOR J H, *et al.* Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production[J]. *Theriogenology*, 1992, 70(1): 95-104.
- [5] 田万强, 魏红芳. 家畜早期胚胎性别鉴定方法在畜牧业中的应用[J]. 黄牛杂志(TIAN Wan-qiang, WEI Hong-fang. Application of early embryo sex diagnosis in animal husbandry[J]. *Journal of Yellow Cattle Science*), 2001, 27(5): 43-46.
- [6] POMP D, GOOD B A, GEISERT R D, *et al.* Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or-11 pig embryos[J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(5): 1408-1415.
- [7] WU B. Amplification of the Sry gene allows identification of the sex of mouse preimplantation embryos[J]. *Theriogenology*, 1993, 40(3): 441-452.
- [8] RAO K B, TOTTEY S M. Sex determination in sheep and goats using bovine Y-chromosome specific primers via polymerase chain reaction: potential for embryo sexing[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1992, 30(9): 775-777.
- [9] 李汶, 陆长富, 卢光. 运用 PCR 对小鼠植入前胚胎进行性别诊断[J]. 生命科学研究(LI Wen, LU Chang-fu, LU Guang. Sexing of mouse preimplantation embryos using polymerase chain reaction[J]. *Life Science Research*), 2001, 5(1): 48-51.
- [10] BREDBACKA P, VELMALA R, PEIPPO J, *et al.* Survival of biopsied and sexed bovine demi-embryos[J]. *Theriogenology*, 1994, 41(5): 1023-1031.
- [11] BREDBACKA P, PEIPPO J. Sex diagnosis of ovine and bovine embryos by enzymatic amplification and digestion of DNA from the ZFY/ZFX locus[J]. *Agricultural Science in Finland*, 1992, 1(2): 233-238.
- [12] MACHATY Z, PALDI A, CSAKI T, *et al.* Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 98(2): 467-470.
- [13] HATTORI R S, MURAI Y, OURI M, *et al.* A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2012, 109(8): 2955-2959.
- [14] QUEMERE E, PERRIER C, BESNARD A L, *et al.* An improved PCR-based method for faster sex determination in brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2014, 6(4): 825-827.
- [15] LIEW W C, BARTFAI R, LIM Z, *et al.* Polygenic sex determination system in zebrafish[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34397.
- [16] 张震, 白秀娟. 应用分子粪便学方法调查太阳岛地区灰松鼠性别比例[J]. 经济动物学报(ZHANG Zhen, BAI Xiu-juan. Investigation of sex ratio of gray squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the region of sun island with molecular scatology method[J]. *Journal of Economic Animal*), 2007, 11(1): 49-50.
- [17] KUROSE N, MASUDA R, TATARA M. Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: a non-invasive method for conservation on the Tsushima Islands, Japan[J]. *Journal of Heredity*, 2005, 96(6): 688-697.
- [18] 田新民, 张明海. 基于粪便 DNA 的马鹿种群数量和性比[J]. 生态学报(TIAN Xin-min, ZHANG Ming-hai. Population size and sex ratio of wapiti (*Cervus elephas xanthopygus*) as revealed by fecal DNA[J]. *Acta Ecologica Sinica*), 2010, 30(22): 6249-6254.
- [19] POUGH F H, ANDREWS R M, CADLE J E, *et al.* *Herpetology*[M]. New York: Prentice Hall, 1998. 544.
- [20] REDMAN C W G, SARGENT I L. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—a review[J]. *Placenta*, 2003, 24: 21-27.
- [21] GIELCHINSKY Y, ROJANSKY N, FASOULIOTIS S J, *et al.* Placenta accreta—summary of 10 years: a survey of 310 cases[J]. *Placenta*, 2002, 23(2): 210-214.
- [22] AHMED A, DUNK C, AHMAD S, *et al.* Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen—a review[J]. *Placenta*, 2000, 21: 16-24.
- [23] MYATT L, BROCKMAN D E, EIS A L W, *et al.* Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta[J]. *Placenta*, 1993, 14(5): 487-495.
- [24] 杨桂芹, 邹兴淮. 胎盘及其提取物的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 沈阳农业大学学报(YANG Gui-qin, ZOU Xing-huai. Research advances on chemical compositions, pharmacological effect and clinic application of placenta and its extract from human and animals[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*), 2003-04, 34(2): 150-154.
- [25] 陆晖, 闫晓梅, 张双全. 羊胎盘活细胞素微量元素和氨基酸组成的分析[J]. 南京师大学报(自然科学版)(LU Hui, YAN Xiao-mei, ZHANG Shuang-quan. Composition analyses of microelements and amino acids in sheep placenta living cell extract[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*), 2001, 24(1): 79-82.
- [26] 刘务林. 西藏藏羚羊[M]. 北京: 中国林业出版社(LIU Wu-lin. Tibetan Antelope[M]. Beijing: Chinese Forestry Press), 2006. 26-30.
- [27] MAMIATIS T, FRITSCH E F, SAMBROOK J, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 463-470.

关于 LRRFIP1 启动干扰素表达的分子机制在前文已有叙述,然而目前的研究盲区在于病毒或细菌感染细胞后,病原体如何与 LRRFIP1 蛋白相互作用,并通过怎样的机制启动 LRRFIP1,促使其诱导干扰素的表达。这方面的问题可能是今后研究需要注重的方向。

综上,本文的研究进一步明确了人 LRRFIP1 在肝细胞中能够诱导 IFN- β 的表达,为人 LRRFIP1 蛋白的功能研究提供了更多信息。

参考文献(References):

- [1] LIU Y T, YIN H L. Identification of the binding partners for flightless I, a novel protein bridging the leucine-rich repeat and the gelsolin superfamilies[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(14): 7920-7927.
- [2] FONG K S, DE COUET H G. Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system[J]. *Genomics*, 1999, 58(2): 146-157.
- [3] SURIANO A R, SANFORD A N, KIM N, *et al.* GCF2/LRRFIP1 represses tumor necrosis factor alpha expression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(20): 9073-9081.
- [4] DAI P, JEONG S Y, YU Y. Modulation of TLR signaling by multiple MyD88-interacting partners including leucine-rich repeat Fli-1-interacting proteins[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(6): 3450-3460.
- [5] BAGASHEV A, FITZGERALD M C, LAROSA D F, *et al.* Leucine-rich repeat (in Flightless I) interacting protein-1 regulates a rapid type I interferon response[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2010, 30(11): 843-852.
- [6] YANG P Y, AN H Z, LIU X G, *et al.* The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a β -catenin dependent pathway[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(6): 487-494.
- [7] KATO H, SATO S, YONEYAMA M, *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response[J]. *Immunity*, 2005, 23(1): 19-28.
- [8] DRAHOS J, RACANIELLO V R. Cleavage of IPS-1 in cells infected with human rhinovirus[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(22): 11581-11587.
- [9] OHTSUKA H, OIKAWA M, ARIAKE K, *et al.* GC-binding factor 2 interacts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines[J]. *International Journal of Cancer*, 2011, 129(7): 1599-1610.
- [10] DOUCHI D, OHTSUKA H, ARIAKE K, *et al.* Silencing of LRRFIP1 reverses the epithelial-mesenchymal transition via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Letters*, 2015, 365(1): 132-140.
- [11] GOODALL A H, BURNS P, SALLES I, *et al.* Transcription profiling in human platelets reveals LRRFIP1 as a novel protein regulating platelet function[J]. *Blood*, 2010, 116(22): 4646-4656.
- [12] SCHOGGINS J W, WILSON S J, PANIS M, *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 481-485.
- [28] BRINKMAN T J, HUNDERTMARK K J. Sex identification of northern ungulates using low quality and quantity DNA[J]. *Conservation Genetics*, 2009, 10(4): 1189-1193.
- [29] WEIKARD R, PITRA C, KUHN C. Amelogenin cross amplification in the family Bovidae and its application for sex determination[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73(10): 1333-1337.
- [30] APPA RAO K B C, KESAVA RAO V, KOWALE B N, *et al.* Sex-specific identification of raw meat from cattle, buffalo, sheep and goat[J]. *Meat Science*, 1995, 39(1): 123-126.
- [31] 冯祚建, 何玉邦, 叶晓堤, 等. 青海可可西里地区的哺乳类[M]// 武素功, 冯祚建. 青海可可西里地区生物与人体高山生理. 北京: 科学出版社(FENG Zuo-jian, HE Yu-bang, YE Xiao-ti, *et al.* Mammals in Qinghai Hoh Xil Region[M]// WU Su-gong, FENG Zuo-jian. Biological and Human Physiology in Qinghai Hoh Xil Region. Beijing: Science Press), 1996. 320.
- [32] SCHALLER G B, REN J R, QIU M J. Observations on the Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*)[J]. *Applied Animal Behaviour Science*, 1991, 29(1): 361-378.
- [33] 连新明, 苏建平, 张同作, 等. 可可西里地区藏羚的社群特征[J]. 生态学报(LIAN Xin-ming, SU Jian-ping, ZHANG Tong-zuo, *et al.* The characteristics of social groups of the Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*) in the Kekexili region[J]. *Acta Ecologica Sinica*), 2005, 25(6): 1341-1346.
- [34] 连新明, 张同作, 曹伊凡, 等. 夏季雌性藏羚昼间行为时间分配及活动节律[J]. 兽类学报(LIAN Xin-ming, ZHANG Tong-zuo, CAO Yi-fan, *et al.* Diurnal behavioral time budgets and activity rhythm of the female Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*) in summer[J]. *Acta Theriologica Sinica*), 2007, 27(1): 53-57.
- [35] 裘丽, 冯祚建. 青藏公路沿线白昼交通运输等人类活动对藏羚羊迁徙的影响[J]. 动物学报(QIU Li, FENG Zuo-jian. Effects of traffic during daytime and other human activities on the migration of Tibetan antelope along the Qinghai-Tibet highway, Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Acta Zoologica Sinica*), 2004, 50(4): 669-674.
- [36] 殷宝法, 于智勇, 杨生妹, 等. 青藏公路对藏羚羊、藏原羚和藏野驴活动的影响[J]. 生态学杂志(YIN Bao-fa, YU Zhi-yong, YANG Sheng-mei, *et al.* Effects of Qinghai-Tibetan highway on the activities of *Pantholops hodgsonii*, *Procapra picticaudata* and *Equus kiang*[J]. *Chinese Journal of Ecology*), 2007, 26(6): 810-816.
- [37] LESLIE D M, SCHALLER G B. *Pantholops hodgsonii* (Artiodactyla: Bovidae)[J]. *Mammalian Species*, 2008, 817: 1-13.
- [38] SCHALLER G B. Wildlife of the Tibetan Steppe[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1998. 55-64.

(上接第 474 页)