

WHBE 兔、日本大耳白兔和新西兰兔 遗传多样性的 RAPD 分析

蔡月琴, 陈民利, 潘永明, 朱亮, 徐剑钦, 屠珏, 王德军, 徐孝平

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 应用随机引物扩增多态性 DNA 技术 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 对大耳白黑眼兔 (white hair black eyes rabbit, WHBE rabbit)、日本大耳白兔 (Japanese white rabbit, JW rabbit) 和新西兰兔 (New Zealand white rabbit, NZW rabbit) 3 个实验兔品系进行遗传分析。**方法** 选用 90 只实验兔的皮肤组织样品提取基因组 DNA, 用 60 个随机引物对实验兔基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 根据电泳结果筛选出多态性较高的引物进行 RAPD-PCR 分析, 再利用 Popgene 3.2 统计软件对 3 个品系的扩增条带进行遗传分析, 获得实验数据。**结果** 分析结果表明: (1) 60 个随机引物中筛选出 25 个多态性较高的引物, 3 个品系实验兔共检测到 493 个扩增片段, 长度在 100 ~ 1800 bp 之间, 筛选的 25 个引物中, 其中 16 个引物既可扩增出 3 个品系共同的 DNA 条带, 也可扩增出 WHBE 兔特有的特征条带; (2) WHBE 兔位点数为 234 个, 其中多态位点数 166 个, 多态位点比为 70.94%, JW 兔位点数为 228 个, 其中多态位点数 122 个, 多态位点比为 53.51%, NZW 兔位点数为 231 个, 其中多态位点数 94 个, 多态位点比为 40.69%; (3) 三个群体的 Shannon 多样性指数分别为 0.3385, 0.2222 和 0.1905; (4) JW 兔和 NZW 兔的遗传相似系数最高, 为 0.8443, 其次为 WHBE 兔和 JW 兔的遗传相似系数, 为 0.8204, WHBE 兔和 NZW 兔的遗传相似系数最低, 为 0.7862。**结论** 结果表明 WHBE 兔与 JW 兔和 NZW 兔之间有遗传的相似性, 也存在着遗传差异, 应用 RAPD 技术可以很好地检测实验兔不同品系之间以及同一品系不同个体之间的亲缘关系。

【关键词】 随机引物扩增多态性 DNA 技术; 兔; 遗传多样性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 04-0065-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.04.015

RAPD analysis of the genetic diversity in WHBE rabbit, Japanese white rabbit and New Zealand white rabbit

CAI Yue-qin, CHEN Min-li, PAN Yong-min, ZHU Liang, XU Jian-qin, TU Jue, WANG De-jun, XU Xiao-pin

(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To analyze the genetic variation among white hair black eyes (WHBE) rabbit, Japanese white (JW) rabbit and New Zealand white (NZW) rabbit using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. **Methods** Thirty rabbits (male/female 1:1) of each strain were used in this study. The genomic DNA was extracted from 90 rabbits. Sixty arbitrary primers were used to amplify DNA of rabbits with RAPD-PCR method. Based on the preliminary experiments, polymorphic primers were selected to analyze the genetic variation among the three rabbit strains. The experimental data were analyzed using Popgene 3.2 software. **Results** (1) Twenty-five polymorphic primers were selected among 60 arbitrary primers. 493 amplified fragments were detected ranging from 100 bp to 1800 bp. Sixteen primers among 25 arbitrary primers could not only amplify the common DNA bands of 3 rabbit breeds, but also amplify particular alleles in the WHBE rabbit. (2) 234 RAPD sites were detected by agarose gel electrophoresis in WHBE rabbit, among which 166 sites were polymorphic, accounting for 70.94%. 228 RAPD sites were detected by agarose gel electrophoresis in the JW

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (编号:30770322); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目。

[作者简介] 蔡月琴 (1982-), 女, 助理研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: cyq810@hotmail.com

[通讯作者] 陈民利 (1963-), 女, 教授, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: cml991@aliyun.com

rabbit, while 122 sites of them were polymorphic, accounting for 53.51%. 231 RAPD sites were detected by agarose gel electrophoresis in the NZW rabbits, with 94 sites being polymorphic, accounting for 40.69%. (3) The Shannon genetic diversity index of WHBE rabbit, JW rabbit and NZW rabbit was 0.3385, 0.2222 and 0.1905, respectively. (4) The genetic similarity between JW rabbit and NZW rabbit was highest among the three rabbit breeds (0.8443), followed by that between WHBE rabbit and JW rabbit (0.8204), and the genetic similarity between WHBE rabbit and NZW rabbit (0.7862) was the lowest. **Conclusions** Our results demonstrate that there are both genetic similarities and genetic variations among WHBE rabbit, JW rabbit and NZW rabbit. The RAPD technique can be used to detect the genetic relationships among different breeds and different individuals of the same breed of rabbits.

【Key words】 Random amplified polymorphic DNA, rabbit; Genetic diversity

大耳白黑眼兔特征为全身纯白色的毛被、黑眼, 又称为白毛黑眼兔 (white hair black eyes rabbit, 简称 WHBE 兔), 该兔是本研究组在实验用日本大耳白兔 (JW 兔) 生产群中发现了一只雄性 WHBE 兔后, 通过回交—近交方式 (包括同胞和半同胞之间的交配) 进行保存的一个新实验兔封闭群, 已连续封闭繁殖 7 代, 生产种群达 400 多对, 经鉴定命名为日本大耳兔黑眼系, 现主要用于抗体的制备。本研究组对 WHBE 兔血液学研究发现, WHBE 兔的网织红细胞、白细胞显著低于 JW 兔, 而淋巴细胞和血红蛋白含量均显著高于 JW 兔^[1]; 遗传学分析发现 WHBE 兔群体的基因纯合度高于 JW 兔, 具有更优的遗传稳定性^[2-4]。在 WHBE 兔与 JW 兔遗传育种中, 发现第一代中未出现 WHBE 兔, 在进行回交或第二代中均出现了 WHBE 兔, WHBE 兔自交后代未出现分化, 这在毛色基因遗传学研究中是一种新发现, 由于 WHBE 兔遗传性状稳定, 表型易于鉴别, 遗传容易控制, 为实验动物遗传质量标准化研究的极为理想的实验动物。

RAPD 技术自创立以来, 由于其灵敏、方便、多态性高等优点, 被广泛用于多种动植物的系统进化、种质鉴定、群体遗传变异分析、目标性状基因的分子标记以及遗传图谱的快速构建等领域^[5-8]。本文利用 RAPD 分子标记技术对 3 个品系兔群体遗传多样性进行研究, 检测实验兔不同品系之间以及同一品系不同个体之间的亲缘关系及其遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

WHBE 兔 30 只, JW 兔 30 只, NZW 兔 30 只, 雌雄各半, 由浙江中医药大学实验兔生产基地 [SCXK (浙) 2009-0042] 提供。采集耳廓皮肤样品, -20℃ 保存。

1.1.2 主要仪器和试剂

S1000 PCR 扩增仪 (Bio-Rad); EPS 601 水平电泳仪 (GE); Bioimaging Systems 凝胶成像系统 (UVP); 台式冷冻离心机 (Thermo); UHQ 无离子纯水仪 (Millipore), Varioskan flash 多功能酶标仪 (Thermo)。

PCR 引物由上海生工生物工程公司合成, PCR 反应试剂包括 dNTP mixture, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 10 $\times$ PCR buffer, $MgCl_2$ (25 mmol/L), DL2000 DNA marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品基因组 DNA 的提取

分别取 90 只兔的耳廓皮肤组织 100 mg 剪碎, 加入 500 μ L 消化缓冲液, 混匀后加入终浓度为 100 μ g/mL 的蛋白酶 K, 55℃ 消化过夜。经苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提, 无水乙醇沉淀基因组 DNA, 70% 无水乙醇洗涤一遍, 烘干, 加入 200 μ L TE 缓冲液溶解的 DNA, 经多功能酶标仪检测 DNA 纯度和 DNA 含量, 将 DNA 浓度稀释至 50 μ g/mL, -20℃ 冻存备用。

1.2.2 RAPD-PCR

根据文献^[9-12], 选择了 60 个 RAPD-PCR 引物用于本实验。

20 μ L PCR 反应体系: 1 $\times$ PCR buffer, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.25 mmol/L dNTP, 20 pmol 随机引物, 1.25 U Taq 酶, 300 ng DNA 模板, 加 ddH₂O 至 20 μ L。

PCR 程序: 预变性 94℃ 7 min, 然后 94℃ 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 40 个循环, 72℃ 延伸 10 mins, 4℃ 保存。

1.2.3 PCR 产物的琼脂糖水平电泳鉴定

(1) 电泳缓冲液的制备: 配制 50 $\times$ TAE 缓冲液, 取 60 mL 加蒸馏水至 3000 mL, 配置成 1.0 $\times$ TAE 稀释缓冲液, 待用。

(2) 水平电泳胶制备: 称取 0.45 g 琼脂糖, 置于锥形瓶中, 加入 30 mL 1.0 $\times$ TAE 缓冲液, 放入微波炉加热至琼脂糖全部熔化, 取出, 加入 2.5 μ L

Gelred 染液,摇匀。

(3) 胶板制备:将胶槽置于水平面上,插上梳子,小心倒入已制备好的电泳胶,形成均匀的胶层。待胶完全凝固后拔出梳子,然后向槽内加入 $1.0 \times \text{TAE}$ 缓冲液至液面没过胶板上表面。

(4) 加样电泳:取 PCR 产物 $5 \mu\text{L}$,加入 $1 \mu\text{L}$ $6 \times \text{loading buffer}$,并用移液枪小心将样品点入电泳槽内,最后在第一个孔加入 $2.5 \mu\text{L}$ DL2000 DNA marker。合上电泳槽盖,接通电源,电压在 60 V ,电流 40 mA ,时间 90 min 。

(5) 拍照观察:凝胶用 UVP 凝胶成像系统拍照,保存。

1.2.4 数据统计和处理

记录下电泳后凝胶上清晰可见的扩增条带,每一个体的扩增条带以“1”或“0”记录,出现扩增条带的记为“1”,相应位点无扩增条带的记为“0”,将此结果输入 Popgene 3.2 软件中,统计相应结果:

(1) 多态位点比:在某一特定位点上,若扩增片段出现的频率小于 0.99 ,则此位点称为多态位点。多态位点比率 $P = (\text{多态位点数}/\text{检测到的位点总数}) \times 100$

(2) 遗传相似系数和遗传距离:按 Nei^[13] 的方法计算群体间的遗传相似系数 S : $S = 2N_{ij}/(N_i +$

$N_j)$,其中 N_{ij} 为两群体共有的位点数, N_i 和 N_j 分别表示两群体各自的位点数。遗传距离: $D = 1 - S$ 。

(3) Shannon 多样性指数:Shannon 多样性指数是生态学中用于度量物种多样性的最常用方法,Chalmers 将其改进后用于量化分析 RAPD 数据的遗传多样性。其计算公式:

$$H = -\sum P_i \ln P_i / N,$$

其中 H 为多样性指数; P_i 为表型频率,即第 i 个位点在群体中出现的频率, N 为检测到的总位点数。以上数据均利用 Popgene 3.2 软件进行计算。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

从 60 个引物 ($p1 \sim p60$,上海生工生物工程公司)中筛选出 25 个扩增重复性好、多态性较高的引物对 3 个实验兔品系进行 RAPD 扩增。表 1 列出了这 25 个随机引物的序列及其在 3 个实验兔品系中的扩增结果,共检测到 493 个扩增片段,长度在 $100 \sim 1800 \text{ bp}$ 之间。结果显示 WHBE 兔的扩增条带数最多 (182),其次是 JW 兔 (164),条带最少的是 NZW 兔 (147);JW 兔与 NZW 兔的共有条带数最多,WHBE 兔与 JW 兔的共有条带数比 WHBE 兔与 NZW 兔的共有条带数多。

表 1 25 个随机引物序列及其在 3 个实验兔品系中的扩增结果

Tab. 1 Sequences of twenty-five random primers and their amplification results of the three rabbit strains

引物号 Primers	引物序列 Primer sequences	RAPD 条带数			RAPD 共有条带数		
		WHBE 兔	JW 兔	NZW 兔	WHBE 兔 JW 兔	JW 兔 NZW 兔	WHBE 兔 NZW 兔
P2	TTCCGCCACC	5	5	5	5	5	5
P7	CCCAGCTAGA	10	8	9	8	7	9
P8	GA TAGGTGG	10	8	5	8	5	5
P9	GTACTCGTCA	10	8	5	8	5	5
P11	GTCTTCGTC	10	5	5	5	4	5
P12	CAAAGGGCGG	8	10	10	7	9	7
P13	AGCCCAAAGG	5	4	4	4	4	4
P14	AACGGCGGTC	7	4	5	4	4	5
P15	AGCCGGGTAA	9	7	9	4	3	7
P16	GGTGCACGTT	8	10	9	8	9	7
P17	TCTCGCCTAC	14	11	11	11	9	11
P18	CTTGGCACGA	11	15	11	11	11	7
P19	AAGTCCGCTC	7	5	6	5	5	6
P22	CAGCTCACGA	7	6	5	6	5	5
P32	GTCCCGACGA	5	6	5	5	5	5
P33	GTGCGCGTAC	3	3	3	3	3	3
P36	CACCGTATCC	6	5	6	5	5	5
P41	CCCAAGGTCC	7	9	6	7	6	5
P42	GGTGCGGGAA	8	4	3	4	3	3
P45	TCAGGGAGGT	8	2	3	2	2	2
P46	AAGACCCCTC	5	4	4	4	3	3
P48	TCACCACGGT	3	3	3	3	3	3
P52	TTATCGCCCC	6	5	3	5	3	4
P55	ACGCACAACC	5	6	5	4	5	3
P57	CTACTGCCGT	5	11	7	5	6	4
合计	182	164	147	129	141	128	

表 2 35 个未扩增出条带或无多态性的随机引物序列

Tab. 2 Sequences of thirty-five no bands amplified or no polymorphism primers

引物号 Primers	引物序列 Primer sequences	引物号 Primers	引物序列 Primer sequences
P1	CTGGGCACGA	P35	GGTCTACACC
P3	TGGCGCAGTG	P37	CTTCCCCAAG
P4	ACGCCAGAGG	P38	GAGTCTCAGG
P5	ACAGGTGCTG	P39	ACGGCGTATG
P6	CAGACAAGCC	P40	GTGACATGCC
P10	CAGTCGGTAT	P43	CCAGATGCAC
P20	AGCATGGCTC	P44	GTGACATGCC
P21	TTCGAGCCAG	P47	AGATGCAGCC
P23	CTCTCCGCCA	P49	CTTCACCCGA
P24	GGCTCATGTG	P50	CACCAGGTGA
P25	AGCGTCCTCC	P51	GAGTCTCAGG
P26	GTCAGGGCAA	P53	CCCGATTCCG
P27	CAGGCCCTTC	P54	TGCGGCTGAG
P28	TGCGCCCTTC	P56	GGTGA CTGTG
P29	GTCCACACGG	P58	GGACTGCAGA
P30	TTCGAGCCAG	P59	ACGGCGTATG
P31	GATGACCGCC	P60	AACGGTGACC
P34	TGAGCGGACA		

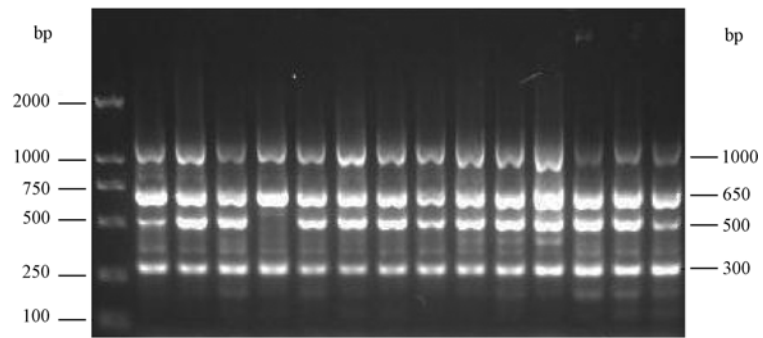


图 1 引物 P14 扩增图谱
Fig. 1 The electrophoretic patterns of RAPD amplified with primer P14

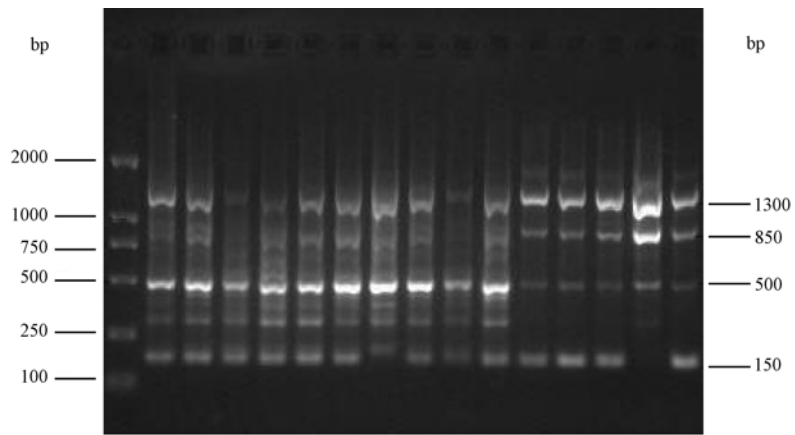


图 2 引物 P32 扩增图谱
Fig. 2 The electrophoretic patterns of RAPD amplified with primer P32

2.2 遗传多样性结果

3 个群体位点数为 228 ~ 234 个不等,多态位点数在 94 ~ 166 个不等,多态位点比例在 40.69% ~ 70.94% 之间,Shannon 指数为 0.1905-0.3385 (表 3)。WHBE 兔的多态位点比例和 Shannon 多样性值在三个群体中均为最高,说明 WHBE 兔相对于 JW 兔和 NZW 兔而言具有较高的遗传多样性水平。

2.3 遗传相似性结果

表 3 3 个实验兔品系 RAPD 标记结果分析

Tab.3 Results of RAPD among the three rabbit strains

群体 populations	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点比/% Percentage of polymorphic loci	Shannon 多样性值 Shannon's index of diversity
大耳白黑眼兔 WHBE rabbit	234	166	70.94	0.3385
日本大耳白兔 JW rabbit	228	122	53.51	0.2222
新西兰兔 NZW rabbit	231	94	40.69	0.1905

表 4 3 个实验兔品系的遗传相似性指数(上)及遗传距离(下)

Tab.4 The genetic similarity index (above) and genetic distance (below) among the three rabbit strains

群体 Populations	大耳白黑眼兔 WHBE rabbit	日本大耳白兔 JW rabbit	新西兰兔 NZW rabbit
大耳白黑眼兔 WHBE rabbit	—	0.8204	0.7862
日本大耳白兔 JW rabbit	0.1796	—	0.8443
新西兰兔 NZW rabbit	0.2138	0.1557	—

3 讨论

随机扩增多态性 DNA 技术(random amplified polymorphic DNA, RAPD)是 1990 年由 Willams 和 Welsh 几乎同时发展起来的一项基于 PCR 技术的 DNA 分子水平上的大分子多态性检测技术^[14,15]。因其具有简便、快速、经济、需样量少和多态性好等特点,受到广泛关注。近年来,此技术已成功应用于遗传多样性检测、基因定位、品系鉴定、医学诊断、遗传图谱构建和系统学研究等诸多领域。

家兔的 RAPD 标记多态性丰富,RAPD 技术能迅速而较准确地提供大量的遗传标记,将不同品系加以区分^[9-12,16]。陈民利等^[9]选用 10 个随机引物对 3 个实验兔品系共 22 个样本 DNA 样本进行了 RAPD 扩增,可扩增出不同品系之间共有的条带和各自的特征条带,可将 WHBE 兔与日本大耳白兔和新西兰兔品系很好地区分开来。赵立虎等^[10]从 7 套共 140 个随机引物中筛选出 10 个多态性较高的引物用于新西兰白兔、青紫兰兔和日本大耳白兔 3 个品系的 RAPD 鉴定。庞荣清等^[11]从 25 个随机引物中筛选出 5 个具有较高多态性的引物,分别对 5 个群体的 80 只家兔基因组 DNA 进行了 RAPD-PCR 扩增,得到了 5 个家兔群体之间的远近不同的进化亲缘关系和聚类结果。Soto 等^[12]利用 RAPD 技术

群体间的遗传距离和遗传相似系数见表 4,JW 兔与 NZW 兔的遗传相似系数最高,为 0.8443,WHBE 兔与 JW 兔的遗传相似系数为 0.8204,高于 WHBE 兔与 NZW 兔的遗传相似系数(0.7862);JW 兔与 NZW 兔的遗传距离最小(0.1557),WHBE 兔和 JW 兔之间的遗传距离(0.1796)小于 WHBE 兔和 NZW 兔之间遗传距离(0.2138)。

从 31 个引物中选用 8 个多态性好的引物用于 Volcano 兔(*Romerolagus diazi*)的遗传分析。本研究选用了 60 个针对兔的 RAPD-PCR 引物用于本次实验,以获得更多的多态性位点,使结果更趋准确。对三个实验兔品系随机采样,共采集 90 个样品(WHBE 兔 30 只,JW 兔 30 只,NZW 兔 30 只),能均匀覆盖种群内所有的世代和家系,因此,由这些个体得出的实验结果能够真实全面地反映三个种群的遗传多样性。

利用筛选出来的 25 条多态性高的引物在 3 个实验兔品系中进行遗传分析,共检测到 493 个扩增片段,长度在 100 ~ 1800 bp 之间。其中 WHBE 兔的多态位点比例和 Shannon 多样性值在三个群体中均为最高,分别为 70.94% 和 0.3385,而 NZW 兔的多态位点比例和 Shannon 多样性值在三个群体中最低,分别为 40.69% 和 0.1905,说明 WHBE 兔相对于 JW 兔和 NZW 兔而言具有较高的遗传多样性水平,这一结果也证实了中科院上海实验动物中心刚引进的新西兰兔品系个体遗传品质相对较纯。3 个品系实验兔的遗传相似系数范围在 0.7862 ~ 0.8443 之间,其中 WHBE 兔与 JW 兔的遗传相似系数为 0.8204,高于 WHBE 兔与 NZW 兔的遗传相似系数(0.7862);WHBE 兔和 JW 兔之间的遗传距离(0.1796)小于 WHBE 兔和 NZW 兔之间遗传距离

(0.2138), 这些结果与 WHBE 兔来源于日本大耳白兔, 其血缘关系较近相一致。

日本大耳白兔和新西兰兔作为特种经济动物在我国饲养已有很长的历史, 人为地定向选育, 造成了血缘杂交, 同时长期的饲养环境改变或特殊的饲养环境导致出现遗传学上的基因突变或漂变, WHBE 兔的出现可能就是这种结果, 该兔的眼球为黑色, 且存在血液学和免疫学上的特点。本次研究用大量引物对该三个品系进行 RAPD 分析, 不但可以提供品系鉴定的分子依据, 还可以结合其它标记方法进行目的基因的克隆和标记辅助选择, 为 WHBE 兔的遗传育种及其在医学领域中的应用提供参考。

参 考 文 献

- [1] 寿旗扬, 陈民利, 朱科燕, 等. WHBE 兔血液流变学及凝血功能测定及分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(6): 415-418.
- [2] 陈民利, 赵伟春, 应华忠, 等. WHBE 兔遗传特异性的 RAPD 分析 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2005, 31(4): 493-498.
- [3] 蔡月琴, 屠珏, 余佳, 等. RAPD 标记技术用于 WHBE 兔近交系培育中的遗传分析 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(5): 326-329.
- [4] 陈民利, 朱亮, 蔡月琴, 等. 微卫星技术在大耳白黑眼兔近交系培育中的监测分析 [J]. 动物学研究, 2010, 31(4): 401-407.
- [5] Yap FC, Yan YJ, Loon KT, et al. Phylogenetic analysis of different breeds of domestic chickens in selected area of Peninsular Malaysia inferred from partial cytochrome b gene information and RAPD markers [J]. Anim Biotechnol, 2010, 21(4): 226-240.
- [6] Yazbeck GM, Brandão RL, Cunha HM, et al. Detection of two morphologically cryptic species from the cursor complex (*Akodon* spp.; Rodentia, Cricetidae) through the use of RAPD markers [J]. Genet Mol Res, 2011, 10(4): 2881-2892.
- [7] Dutra NC, Telles MP, Dutra DL, et al. Genetic diversity in populations of the viper *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 in Central Brazil using RAPD markers [J]. Genet Mol Res, 2008, 7(3): 603-613.
- [8] Apostolidis AP, Gelia D, Mamuris Z. Genetic diversity among Balkan trout populations based on RAPD analysis [J]. Genetika, 2011, 47(8): 1097-1102.
- [9] 陈民利, 赵伟春, 应华忠, 等. WHBE 兔遗传特异性的 RAPD 分析 [J]. 浙江大学学报. 2005, 31(4): 493-498.
- [10] 赵立虎, 谢夏阳, 赵丹凤, 等. RAPD 分子标记技术用于实验兔品系鉴定的初探 [J]. 上海交通大学学报. 2007, 25(1): 66-70.
- [11] 庞荣清, 陈成功, 刘万臣, 等. 家兔随机扩增多态性 DNA 分析 [J]. 中国兽医学报. 2000, 20(2): 195-194.
- [12] Soto V, Montiel J, Matsumura P, et al. Assessment of the genetic variability in the captive population of Volcano Rabbit (*Romerolagus diazi*) [J]. Vet Méx, 2005, 36(2): 119-127.
- [13] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106(949): 283-292.
- [14] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [15] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [16] 杨丽萍, 张玉笙, 吕连山, 等. 不同品系家兔的 RAPD 遗传分析 [J]. 中国养兔杂志, 2000, (3): 15-18.

[收稿日期] 2013-03-27