

УДК 591.151:636.932.3

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПОПУЛЯЦИИ НУТРИЙ (*Myocastor coypus*), РАЗВОДИМЫХ В ПОЛЬШЕ

© 2016 г. И. Гуйа<sup>1</sup>, С. Лапински<sup>1</sup>, Л. Мигдал<sup>2</sup>, С. Палка<sup>2</sup>, Т. Зомбек<sup>3</sup>, С. Н. Сергина<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Университет сельского хозяйства в Кракове, Институт зоологии, Краков 30-059, Польша

<sup>2</sup>Университет сельского хозяйства в Кракове, кафедра генетики и животноводства, Краков 30-059, Польша

<sup>3</sup>Национальный научно-исследовательский институт животноводства, Балице, Краков 32-083, Польша

<sup>4</sup>Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск 185910, Россия

e-mail: cvetnick@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.09.2015 г.

Разработана панель микросателлитных маркеров для оценки генетического разнообразия внутри популяции разводимых в Польше нутрий. Все 10 использованных микросателлитных маркеров оказались полиморфными. Фактическая средняя гетерозиготность внутри популяции составила 41%. Число аллелей на локус в среднем равнялось 9.2. Средняя гетерозиготность целой популяции оказалась ниже ожидаемой, что указывает на отклонение от равновесия Харди–Вайнберга в популяции нутрии. Низкие значения  $M$  (от 0.078 до 0.545) индекса Гарза–Вильямсона свидетельствуют о снижении генетической изменчивости в исследованной популяции и о сокращении ее численности.

**Ключевые слова:** нутрия, *Myocastor coypus*, генетический ресурс, микросателлитные маркеры, разнообразие.

**DOI:** 10.7868/S0016675816050064

Нутрия (*Myocastor coypus*) – крупный полуводный грызун родом из Южной Америки, интродуцированный в Европу в начале XX столетия. Пик расцвета нутриеводства наблюдался в 1970-е и 1980-е гг. [1]. Основными производителями шкур нутрии в то время были Польша (3 млн штук в год), СССР и Германия. Среди других европейских стран, занимавшихся разведением нутрии, также заслуживают внимания Чехословакия, Венгрия, Италия и Югославия. В 1990-е гг. производство шкур нутрии значительно сократилось в результате изменений организационно-экономической системы [1–3].

Снижение числа разводимых животных привело к включению нутрии в охраняемые генетические ресурсы в нескольких странах. С 2007 г. восемь цветовых форм (*standard*, *greenland*, *pearl*, *black*, *amber gold*, *pastel*, *snow white* и *sable*) нутрии занесены в Программу консервации, которая координируется Польским Национальным научно-исследовательским институтом животноводства (National Research Institute of Animal Production in Poland). К основным целям Программы относятся: 1) увеличение количества животных до 500 самок нутрий форм *standard* и *greenland* и до 200 самок каждой из остальных цветовых форм нутрий, 2) сохранение моделей всех цветовых форм нут-

рии, а также 3) поддержание генетической изменчивости охраняемой популяции нутрии [4].

Несмотря на реализацию Программы, число племенных хозяйств снижается ежегодно. В Польше в 2013 г. функционировали только три фермы, насчитывавшие 139 самок нутрий *standard*, 125 – *greenland*, 10 – *pearl*, 67 – *black*, 35 – *amber gold*, 32 – *pastel*, 25 – *snow white* и 13 – *sable* [5, 6].

Микросателлиты (короткие tandemные повторы, STR) используются в качестве молекулярных маркеров ДНК для генетической идентификации и контроля происхождения животных, изучения генетического разнообразия в популяции и выбора животных в ходе реализации селекционных программ. В целях защиты генетических ресурсов разработанная панель микросателлитных маркеров может помочь определить уровень генетического разнообразия между субпопуляциями цветовых форм и выяснить уровень инбридинга внутри каждой из них. На данный момент для нутрии проанализированы 27 микросателлитных маркеров [7].

Цель исследования состояла в определении уровня генетической изменчивости у шести цветовых форм разводимых в Польше нутрий путем разработки панели микросателлитов для популя-

**Таблица 1.** Характеристика праймеров, использованных в мультиплексной ПЦР-реакции [7]

Локус	Номер доступа в генетической базе данных	Сиквенс праймера (5' → 3')
<i>McoA04</i>	AY642486	F–CGGGAGAAAAGGAATTGATTAAC R–ACTGGCAGAGAATTCAGAGAAC
<i>McoB17</i>	AY642488	F–CAATCTTGGGAATTTTCATAGC R–TTTTATTTCTTGAGCATTTGGAG
<i>McoC118</i>	AY642491	F–CCATGTGTGAAGGTGATTTCTC R–AGTTCGATCCCCAGCACAAC
<i>McoC124</i>	AY642492	F–ATCTGCTGTTTTGCCAATAATC R–ATGACCAGGATTCAAGTGAAG
<i>McoD10a</i>	AY642498	F–TTTTGATACTAGCACCAATTATCTTTT R–AAAAACATACATATCCATTTCAGCAA*
<i>McoD59</i>	AY642502	F–TATTTGAAGCCCAGGAGACTAA R–ACATCGTCCCTACTGTTTCAAG
<i>McoD60</i>	AY642503	F–TCACTCAATAAATACTCAGGATGC R–TGGGTGTAGGTGTAGGTAGACA
<i>McoD69</i>	AY642505	F–TTCCATCCCTGGTACCATATAC R–TGAAGCATTAGATGCCTTTGTA
<i>McoD214</i>	AY642507	F–TTCACAAATCAGAGGCTACAAC R–GTGTTCTTCATTTGATGCTCAG
<i>McoD228</i>	AY642511	F–TGTAAGGTTCTGGGTTCAATC R–GGTCTTAACACATGAGTACAAAGCTC

\* Обратный праймер для микросателлита *McoD10a* изменен для мультиплексной ПЦР-реакции.

ции животных в ходе реализации Программы консервации генетических ресурсов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовались 92 нутрии, принадлежащие к шести цветовым формам (41 *standard*, 15 *black*, 19 *greenland*, 9 *pastel*, 4 *snow white*, 4 *white mark*). Все животные получены от трех племенных хозяйств Польши.

Общая геномная ДНК была выделена из периферической крови в соответствии со стандартным протоколом Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit. Готовые образцы хранились при –20°C в растворе ЭДТА до следующего этапа анализа.

Из 27 микросателлитов, охарактеризованных Callahan et al. [7], были выбраны 10 (*McoD214*, *McoD10a*, *McoD59*, *McoD69*, *McoC124*, *McoD60*, *McoB17*, *McoC118*, *McoA04*, *McoD228*) с целью разработки панели микросателлитов для польской популяции нутрий (табл. 1). Мечение микросателлитных маркеров осуществлялось компанией “Life Technologies” (Applied Biosystems), к каждому прямому праймеру на 5'-конце была прикреплена метка в виде одного из следующих флуоресцентных красителей: VIC – *McoA04*, *McoC118*, *McoD228*, 6-FAM – *McoB17*, *McoD10a*,

*McoD60*, NED – *McoC124*, *McoD69*, PET – *McoD214*, *McoD59*.

Ранее выделенная ДНК, флуоресцентно-меченые праймеры и AmpliTaq Gold Polymerase (Life Technologies, Applied Biosystems) использовались в мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР проводилась в следующих условиях: начальная денатурация – 95°C, 10 мин; затем в каждом из последующих 28 циклов – денатурация – 95°C, 30 с; отжиг праймеров – 59°C, 90 с; элонгация – 72°C, 30 с и финальная элонгация – 72°C, 60 мин.

Полиморфизм микросателлитных маркеров определяли с помощью многоцветного капиллярного электрофореза, основанного на лазерном сканировании флуоресцентно-меченых фрагментов с использованием генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems), и оценивали с помощью программного обеспечения Peak Scanner версии 1.0 (Life Technologies).

Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга анализировали с использованием программы Arlequin v. 3.0 [8]. Число состояний в цепи Маркова было равным 1000000. Ожидаемая ( $H_E$ ) и фактическая ( $H_O$ ) гетерозиготность, а также индекс фиксации ( $F_{IS}$ ) вычисляли в программе Arlequin v. 3.0 [8]. Вероятный эффект “бутылочного горлышка” на генетическую изменчивость в преде-

**Таблица 2.** Сводные статистические данные для 10 локусов микросателлитов, проанализированных в польской популяции нутрий

Локус	$NA$	Аллельный диапазон	$H_O$	$H_E$	$M$	$F_{IS}$
<i>McoD10a</i>	9	36	0.185	0.617	0.078	0.702
<i>McoD60</i>	5	16	0.250	0.350	0.294	0.287
<i>McoB17</i>	5	10	0.087	0.491	0.455	0.284
<i>McoD69</i>	20	38	0.533	0.839	0.171	0.367
<i>McoC124</i>	4	16	0.587	0.634	0.235	0.074
<i>McoD214</i>	13	30	0.641	0.857	0.419	0.253
<i>McoD59</i>	6	14	0.554	0.678	0.400	0.183
<i>McoC118</i>	9	22	0.293	0.825	0.391	0.646
<i>McoA04</i>	6	10	0.402	0.654	0.545	0.386
<i>McoD228</i>	20	42	0.543	0.912	0.465	0.405
Среднее	9.70	23.40	0.408	0.686	0.345	0.407
SD	5.73	12.11	0.182	0.168	0.139	0.184

Примечание.  $NA$  – число аллелей,  $H_O$  – фактическая гетерозиготность,  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность,  $SD$  – стандартное отклонение,  $M$  – индекс Гарза–Вильямсона,  $F_{IS}$  – индекс фиксации.

**Таблица 3.** Неравновесие по сцеплению среди проанализированных пар 10 локусов в популяции нутрий

	<i>McoD10a</i>	<i>McoD60</i>	<i>McoB17</i>	<i>McoD69</i>	<i>McoC124</i>	<i>McoD214</i>	<i>McoD59</i>	<i>McoC118</i>	<i>McoA04</i>	<i>McoD228</i>
<i>McoD10a</i>	–									
<i>McoD60</i>	<b>0.000</b>	–								
<i>McoB17</i>	<b>0.007</b>	0.158	–							
<i>McoD69</i>	0.057	0.134	<b>0.002</b>	–						
<i>McoC124</i>	<b>0.006</b>	0.661	0.599	0.617	–					
<i>McoD214</i>	0.178	0.055	<b>0.001</b>	0.545	<b>0.009</b>	–				
<i>McoD59</i>	0.020	0.475	<b>0.001</b>	0.139	0.080	0.121	–			
<i>McoC118</i>	<b>0.001</b>	0.158	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.032	<b>0.000</b>	0.040	–		
<i>McoA04</i>	0.109	0.231	0.093	0.781	0.431	0.341	0.156	<b>0.004</b>	–	
<i>McoD228</i>	0.401	0.664	<b>0.000</b>	0.082	0.724	0.346	0.494	<b>0.000</b>	0.363	–

Примечание. Пары локусов с высокодостоверными различиями ( $P < 0.01$ ) выделены полужирным шрифтом.

лах исследованной популяции оценивали в соответствии с индексом Гарза–Вильямсона  $M$  [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было идентифицировано 92 аллели для 10 локусов (табл. 2). Все микросателлиты оказались полиморфными. В целой популяции количество аллелей микросателлитов варьировало от 4 (*McoC124*) до 20 (*McoD69* и *McoD228*). Значения фактической гетерозиготности колебались от 0.087 для маркера *McoB17* до 0.641 для маркера *McoD214*. Средняя индивидуальная гетерозиготность среди популяции польской нутрии равнялась 41% подобно данному показателю, оцененному в 50%, для популяции нутрии, разводимой в

Чешской Республике [10], а также таковому (46%) для дикой популяции нутрии, обитающей в штате Мэриленд, США [7]. Tunes et al. [11] выявили более высокую фактическую гетерозиготность (66%) по 16 проанализированным микросателлитным локусам в популяции диких нутрий из аргентинских пампасов.

Мы наблюдали высокодостоверное ( $P < 0.01$ ) неравновесие по сцеплению среди 14 пар локусов (табл. 3). Ранее Kaplanova et al. [10] выявили неравновесие по сцеплению среди шести пар локусов, однако не зафиксировано какого-либо неравновесия по сцеплению между парами локусов в популяциях нутрий, обитающих как в Аргентине, так и в США [7, 11].

**Таблица 4.** Разнообразие по микросателлитам среди субпопуляций польских нутрий, выявляемое по 10 локусам

Цветовая форма	$NG$	$NA$	$SD$	$H_O$	$SD$	$H_E$	$SD$	$AR$	$SD$
<i>Standard</i>	82	6.800	2.857	0.395	0.200	0.612	0.191	20.40	10.190
<i>Black</i>	30	4.700	1.792	0.367	0.226	0.572	0.190	15.90	10.644
<i>Greenland</i>	38	5.400	2.289	0.426	0.234	0.639	0.159	15.10	8.031
<i>Pastel</i>	18	4.200	1.470	0.400	0.278	0.654	0.155	13.10	7.778
<i>Snow white</i>	8	3.700	0.900	0.475	0.236	0.739	0.106	15.00	8.485
<i>White mark</i>	8	3.500	1.025	0.550	0.218	0.700	0.133	13.20	8.286

Примечание.  $NG$  – число копий генов,  $NA$  – число аллелей,  $H_O$  – фактическая гетерозиготность,  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность,  $AR$  – аллельный диапазон,  $SD$  – стандартное отклонение.

Индекс Гарза–Вильямсона ( $M$ ) различался во всех исследованных локусах: самое низкое значение ( $M = 0.078$ ) отмечено для самого полиморфного локуса *McoD10a*, самое высокое значение ( $M = 0.545$ ) – для наименее полиморфного *McoA04* (табл. 2). Исследования, проведенные на различных видах животных, свидетельствуют, что значения индекса  $M$  Гарза–Вильямсона, равные 0.8 и выше, характерны для популяции, не подвергавшейся уменьшению размера, тогда как величины около 0.7 и ниже говорят о прохождении популяции через фазу низкой численности (например, польские и украинские популяции веслоноса (*Polyodon spathula*)) [12]. Низкие значения  $M$  в пределах 0.2–0.4 свойственны для вымирающих популяций и указывают на значительное снижение их размера в прошлом (например, популяция галапагосской игуаны (*Amblyrhynchus cristatus*)) [13].

Низкие величины  $M$  индекса Гарза–Вильямсона, варьирующие от 0.078 до 0.545, свидетельствуют о том, что польская популяция нутрии вымирает, а в прошлом претерпела значительное уменьшение в размере.

Тест на соответствие генотипических частот равновесию Харди–Вайнберга в каждом локусе показал высокостатистически достоверное ( $P < 0.01$ ) отклонение. Callahan et al. [7] после коррекции уровня статистической значимости с помощью последовательной процедуры Бонферрони обнаружили отклонения от ожидаемого у двух локусов в популяциях американских и аргентинских нутрий. Tunez et al. [11] также зафиксировали статистически достоверные ( $P < 0.01$ ) отклонения от ожидаемого уровня у четырех локусов в популяции нутрий из аргентинских пампасов.

Стандартная цветовая форма (*standard*) нутрии характеризовалась самым высоким средним числом аллелей на локус (7.0). Аллельный диапазон был самым широким для формы *standard* (20.4) и самым низким для формы *pastel* (13.10). Все шесть цветовых форм нутрии характеризовались более низкими значениями фактической гетерозиготности по сравнению с ожидаемой (табл. 4). Ин-

декс фиксации ( $F_{IS}$ ) был самым низким для маркера *McoC124* (0.074), тогда как самые высокие значения этого показателя ( $F_{IS}$ ) наблюдались для локусов *McoC118* (0.646) и *McoD10a* (0.702). Высокий уровень индекса фиксации и самая низкая гетерозиготность для локусов *McoC118* и *McoD10a* свидетельствуют о дефиците гетерозигот и высоком уровне инбридинга.

Ранее при анализе родословной и генетического разнообразия популяции нутрий [6] мы выявили низкий уровень средних коэффициентов корреляции (0.0140) и инбридинга (0.0027), несмотря на то, что спаривания животных были проведены в соответствии с установленными стандартами. Тем не менее результаты данного исследования, основанного на молекулярном анализе, доказывают, что генетическая вариативность польской популяции нутрий низка.

Таким образом, все цветовые формы нутрии, включенные в реализацию польской Программы консервации генетических ресурсов, представляют собой значительный ресурс генетического разнообразия. Устранение какой-либо из цветовых форм неизбежно приведет к потере генетической вариации. Несмотря на включение нутрии в Программу консервации генетических ресурсов, малое количество животных и отсутствие мероприятий по улучшению качества породы путем скрещивания способствуют вымиранию популяции. Очевидно, что необходимо проводить соответствующие действия, чтобы спасти популяцию разводимых в неволе нутрий. Мы считаем, что протестированный набор микросателлитных маркеров будет полезен при индивидуальной идентификации и контроле происхождения в охраняемой популяции.

Работа была поддержана Грантом министерства науки и высшего образования (Ministry of Science and Higher Education grant) № N N311 401839 (Польша).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kopanski R.* Husbandry of nutria (in Polish). Warszawa: PWRiL, 1977.
2. *Barabasz B., Bielański P., Łapiński S.* A genetic resources conservation programme as an opportunity to save nutria breeding in Poland (in Polish) // *Wiadomos'ci Zootechniczne*. 2007. V. 3. P. 61–65.
3. *Kowalska D., Bielański P., Łapiński S.* Nutrias — prospects for breeding (in Polish) // *Wiadomos'ci Zootechniczne*. 2010. V. 48. P. 39–45.
4. *Kowalska D., Bielański P.* The nutria. A genetic resources conservation programme as an opportunity for farmers (in Polish). Krakow: The National Research Institute of Animal Production, 2010. 56 p.
5. *Krajowe Centrum Hodowli Zwierząt (KCHZ, National Animal Breeding Centre)*. Breeding of fur animals in 2013 (in Polish). Warszawa: KCHZ, 2014.
6. *Łapiński S., Migdał Ł., Guja I. et al.* Pedigree analysis and monitoring of genetic diversity of nutrias (*Myocastor coypus*) included in the Genetic Resources Conservation Programme in Poland (in Polish) // *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*. 2015. V. 2. P. 17–24.
7. *Callahan C.R., Henderson A.P., Eackles M.S., King T.L.* Microsatellite DNA markers for the study of population structure and dynamics in nutria (*Myocastor coypus*) // *Mol. Ecol. Notes*. 2005. V. 5. P. 124–126. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.00861.x
8. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005. V. 1. P. 47–50. Available from <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>
9. *Garza J.C., Williamson E.G.* Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10. P. 305–318.
10. *Kaplanova K., Putnova L., Bryndova M. et al.* Microsatellite variability in nutria (*Myocastor coypus*) genetic resource in the Czech Republic // *Czech J. Animal Sci.* 2012. V. 57. P. 171–177.
11. *Tunez J.I., Guichon M.L., Centron D. et al.* Relatedness and social organization of coypus in the Argentinean pampas // *Mol. Ecol.* 2009. V. 18. P. 147–155. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.04006.x
12. *Kaczmarczyk D., Luczynski M., Brzuzan P.* Genetic variation in three paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum) stocks based on microsatellite DNA analysis // *Czech J. Animal Sci.* 2012. V. 57. P. 345–352.
13. *Tzika A.C., Rosa S.F.P., Fabiani A. et al.* Population genetics of Galapagos land iguana (genus *Conolophus*) remnant populations // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. P. 4943–4952. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03967.x

## Microsatellite Markers Polymorphism in the Breeding Nutria (*Myocastor coypus*) Population in Poland

I. Guja<sup>a</sup>, S. Łapiński<sup>a</sup>, Ł. Migdał<sup>b</sup>, S. Pałka<sup>b</sup>, T. Ząbek<sup>c</sup>, and S. N. Sergina<sup>d</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Animal Sciences, University of Agriculture in Krakow, Krakow, 30-059 Poland*

<sup>b</sup> *Department of Genetics and Animal Breeding, University of Agriculture in Krakow, Krakow, 30-059 Poland*

<sup>c</sup> *National Research Institute of Animal Production, Balice, Krakow, 32-083 Poland*

<sup>d</sup> *Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185610 Russia*

*e-mail: cvetnick@yandex.ru*

The aim of the research was to establish a microsatellite panel to determine the genetic diversity within the breeding nutria population in Poland. In the study, 92 animals representing six color forms were used. Ten fluorescently labeled microsatellite markers were investigated by multicolored capillary electrophoresis. All the microsatellites were polymorphic. The average heterozygosity observed among the population was 41%. The mean number of alleles per locus was 9.2. The average heterozygosity observed in the whole population was lower than expected. This implies that the nutria population deviates from the Hardy–Weinberg equilibrium. Low *M* values (from 0.078 to 0.545) of the Garza–Williamson index reveal a reduction of genetic variation in the investigated population and suggest that the breeding nutria population was remnant.

*Keywords:* nutria, *Myocastor coypus*, genetic resource, microsatellite markers, diversity.