

Генетически изолированные экотипы косаток (*Orcinus orca*) Дальнего Востока России

Борисова Е.А.¹, Филатова О.А.¹, Шпак О.В.², Мещерский И.Г.², Бурдин А.М.³

1. Биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

2. Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, Москва, Россия

3. Камчатский Филиал Тихоокеанского Института Географии ДВО РАН,
г. Петропавловск-Камчатский, Россия

Genetically isolated ecotypes of killer whales (*Orcinus orca*) from the Russian Far East

Borisova E.A.¹, Filatova O.A.¹, Shpak O.V.², Meschersky I.G.², Burdin A.M.³

1. Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

2. A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

3. Kamchatka Branch of Pacific Institute of Geography DVO RAS, Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia

Косаток, обитающих в водах Дальнего Востока России, относят к двум экотипам — плотоядному и рыбающему. Различия в пищевой специализации между ними были выявлены не только путем непосредственных наблюдений охоты одних групп исключительно на рыбу, а других — на морских млекопитающих, но и на основе изотопного анализа проб кожи, отобранных от особей каждого типа (Бурдин и др. 2004, Ivkovich et al. 2010, Филатова и др. 2014).

Исследования косаток северо-восточной части Тихого океана показали, что животные разных экотипов различаются по социальной структуре, поведению и некоторым морфологическим признакам (Ford 1984, Baird, Stacey 1988, Baird, Whitehead 2000, Baird 2000). Было выявлено и наличие репродуктивной изоляции между этими типами (Hoelzel et al. 1991, 1998, Barrett-Lennard 2000). Сходство косаток восточной Камчатки (самого изученного в российских водах региона) с сообществами рыбающих и плотоядных косаток северо-восточной части Тихого океана было показано в ряде работ (Филатова 2005; Тарасян 2005, Burdin et al. 2010). Однако, вопрос о степени обособленности рыбающих и плотоядных косаток Дальнего Востока России долгое время оставался невыясненным.

Для прояснения вопроса о генетической обособленности косаток Дальнего Востока, относящихся к двум различным экотипам, мы провели анализ аллельного состава девяти микросателлитных локусов ядерной ДНК: DlrFCB12, DlrFCB13, DlrFCB17 (последовательности праймеров см. в Buchanan et al. 1996), 464/465 (Fullard et al. 2000), MK5, MK9 (Krutzen et al. 2001), Ttr11, Ttr48 (Rosel et al. 2005), Dde66 (Coughlan et al. 2006). Образцы были получены из четырёх регионов: из Авачинского и Карагинского заливов п-ова Камчатка, из акватории Командорских островов (о. Беринга) и из западной части Охотского моря. Общий объем анализируемого материала представлен в таблице 1, районы сбора проб — на рис. 1.

Пробы были собраны методом дистанционной биопсии с использованием отстреливаемой из арбалета стрелы с металлическим наконечником в виде трубочки. Три образца были получены от мёртвых животных, найденных на берегу. Образцы сохранялись в 96%-м спирте.

Killer whales inhabiting the waters of the Far East of Russia can be related to two ecotypes — carnivore and piscivore. The differences in a food specialization between them were revealed not only by direct observation of hunting of some groups only for fish, and the others for marine mammals, but also on the basis of isotopic analysis of samples of the skin taken from individuals of each type (Burdin et al. 2004, Ivkovich et al. 2010, Filatova et al. 2014).

The studies of killer whales of the north-eastern part of the Pacific Ocean showed the animals of different ecotypes are different in social structure, behaviour, and some morphological characteristics (Ford 1984, Baird, Stacey 1988, Baird, Whitehead 2000, Baird 2000). Presence of reproductive isolation between these specimens was revealed as well (Hoelzel et al. 1991, 1998, Barrett-Lennard 2000). The similarity of killer whales of east Kamchatka (the most studied region in Russian waters) to communities of carnivore and piscivore killer whales of the north-eastern part of the Pacific Ocean was shown in a number of studies (Filatova 2005; Tarasyan 2005, Burdin et al. 2010). But the question about the degree of isolation of carnivore and piscivore killer whales of the Far East of Russia for a long time has remained unclear.

We performed analysis of allele composition of nine microsatellite loci of nuclear DNA to clarify the question about genetic isolation of the Far East killer whales belonging to two different ecotypes: DlrFCB12, DlrFCB13, DlrFCB17 (for primer sequence see Buchanan et al. 1996), 464/465 (Fullard et al. 2000), MK5, MK9 (Krutzen et al. 2001), Ttr11, Ttr48 (Rosel et al. 2005), Dde66 (Coughlan et al. 2006). The samples were received from four regions: from Avacha and Karaginsky gulfs of the Kamchatka Peninsula, from the water area of the Commander Islands (the Bering island), and the western part of the Sea of Okhotsk. Total volume of the tested material is presented in table 1, the regions of samples collection — in fig. 1.

The samples were collected by the method of remote biopsy with the use of an arrow being shot with

Табл. 1. Районы, годы сбора и объем материала биопсии косаток Дальнего Востока России.
 Tab. 1. Regions, years of collection, and volume of material of biopsy of killer whales of the Far East of Russia.

Region	Ecotype	Number of samples
Karaginsky Gulf (2008-2009)	fish-eating	2
Bering Island (2009, 2011, 2013)	fish-eating	10
Bering Island (2010)	mammal-eating	1
Bering Island (2009, 2011)	unknown *	2
Avacha Gulf (2004, 2010-2013)	fish-eating	45
Avacha Gulf		
(2010-2013)	mammal-eating	5
Okhotsk Sea (western part) (2011-2013)	mammal-eating	28
Okhotsk Sea (western part) (2013)	unknown *	1
Total:		94
(2010-2013)	mammal-eating	5
Okhotsk Sea (western part) (2011-2013)	mammal-eating	28
Okhotsk Sea (western part) (2013)	unknown *	1
Total:		94

*пробы от найденных на берегу особей / samples from stranded animals

Для выявления возможных дублей каждое животное при взятии биопсии фотографировали для последующей идентификации. Кроме этого, для выявления образцов-дубликатов с последующим их исключением из анализа по результатам генотипирования использовали программу GeneCap 1–2 (Wilberg, Dreher 2005). Для определения возможной принадлежности особей общей выборки к разным популяциям методом кластеризации использовали программу Structure v.2.3.3 (Pritchard et al. 2000). Значение логарифма вероятности (Estimated Ln Prob of Data) для каждого «К» (предполагаемого числа генетически обособленных групп) рассчитывали как среднее для трёх повторностей на основе 500 000 реплик каждая. Наибольшее значение этого логарифма свидетельствует о большей вероятности наличия соответствующего числа генетических групп (популяций). Уровень генетических различий между предполагаемыми популяциями в частотах встречаемости аллелей (Fst-критерий) и степень его статистической достоверности определяли при помощи программы Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2005).

При анализе данных о частотах встречаемости аллелей методом кластеризации с использованием модели «admixture» выявляется явная гетерогенность в пределах общей совокупности — исследуемые особи разделяются на два чётких генетических кластера, среднее значение логарифма вероятности (ln Pr) для K=2 составило –1835,9 против –2217,8 для K=1.

a crossbow with a metal tip in the form of a tubule. Three samples were received from dead animals found on the shore. The samples were stored in 96% alcohol.

To identify possible double samples, each animal was photographed during taking of biopsy for the subsequent identification. In addition, to identify duplicate samples with their subsequent exception from the analysis based on the results of genotyping, they used a GeneCap 1–2 (Wilberg, Dreher 2005) software. To identify possible grouping of individuals of a total sample to different populations by the clustering method, they used a software Structure v.2.3.3 (Pritchard et al. 2000). The value of a logarithm of probability (Estimated Ln Prob of Data) for each «K» (the assumed number of genetically detached groups) was calculated as an average for three replication on the basis of 500 000 replicas. The largest value of this logarithm indicates a higher probability of presence of the corresponding number of genetic groups (populations). The level of genetic differences between the alleged populations in frequencies of occurrence of alleles (Fst-criterion) and the degree of its statistical credibility was determined with help of a software Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2005).

During analysis of the data on frequencies of occurrence of alleles by the clustering method with the use of the model «admixture», an obvious heteroge-



Рис. 1. Места сбора генетического материала. Точки взятия проб от плотоядных косаток обозначены квадратами, от рыбоядных — треугольниками.

Fig. 1. Places of collection of genetic material. The points of taking of samples from carnivore killer whales are marked with squares, from the piscivorous ones — triangles.

В первый кластер попадают пробы, взятые от животных, отнесённых к рыбоядному типу — обе карагинские, десять командорских и 45 проб с Авачинского залива. Сюда же по аллельному составу была отнесена и одна из косаток неизвестного экотипа (о. Беринга, см Табл. 1). Во второй кластер вошли образцы от плотоядных животных — один командорский образец, пять авачинских и все 28 проб с Охотского моря, а также два оставшихся образца неопределённого типа (о. Беринга и западной части Охотского моря).

При использовании модели «admixture-LOCPRIOR», учитывающей места сбора образцов, деление на два кластера по экотипу сохраняется вне зависимости от места встречи животного (рис. 2). Наибольшее значение логарифма вероятности остаётся для $K=2$ ($\ln Pr = -1835,3$), в то время как для $K=1$, $K=3$ и $K=4$ (по числу географических групп) величина логарифма меньше ($-2217,9$; $-1848,5$ и $-1843,8$ соответственно).

neity within the limits of a general aggregation is revealed — the studied individuals are divided into two well-defined genetic clusters, an average value of a logarithm of probability ($\ln Pr$) for $K=2$ was -1835.9 against -2217.8 for $K=1$.

The samples, taken from the animals assigned to a piscivore type, get into the first cluster — both from the Karaginsky gulf, ten from the Commander Islands, and 45 samples from the Avacha gulf. By the allele composition one of the killer whales of an unknown ecotype was assigned here as well (the Bering Island, see Tab. 1). The second cluster included the samples from carnivore animals — one Commander Islands sample, five Avacha and all 28 samples from the Sea of Okhotsk, as well as two remained samples of an unidentified type (the Bering island and the western part of the Sea of Okhotsk).

By using of the model «admixture-LOCPRIOR» which takes into consideration the places of collection of samples, the division into two clusters by the ecotype is preserved regardless of an animal occurrence place (fig. 2). The largest value of a logarithm of probability is retained for $K=2$

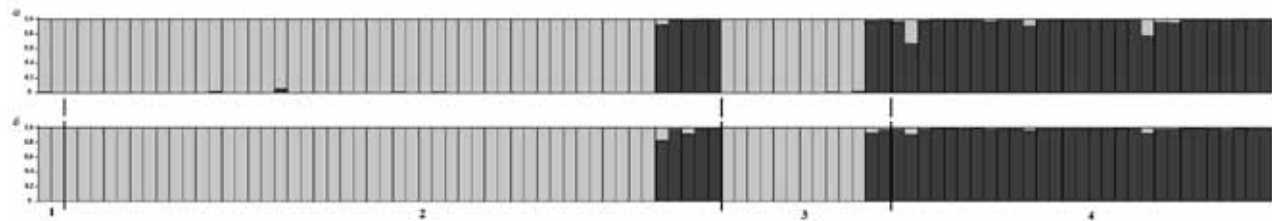


Рис. 2. Вероятность отнесения особей к одной из двух генетических групп (популяций). Каждый столбик соответствует одному животному. а- модель «admixture», б- «admixture-LOCPRIOR». 1 — Карагинский залив, 2 — Авачинский залив, 3 — Командорские о-ва, 4 — западная часть Охотского моря.

Fig. 2. Probability of assigning of individuals to one of two genetic groups (populations). Each column corresponds to one animal. a is a model «admixture», б- «admixture-LOCPRIOR». 1 — the Karaginsky gulf, 2 — the Avacha gulf, 3 — the Commander Islands, 4 — the western part of the Sea of Okhotsk.

Между этими двумя кластерами наблюдается достоверное отличие в частотах встречаемости аллелей, что свидетельствует в пользу их генетической изоляции друг от друга ($F=0,23901$, $p<0,00001$). Для каждого из них характерно наличие и специфичных аллелей: для первого кластера, состоящего из рыбадных косаток, специфичные аллели отмечены в трёх из девяти исследованных локусов (их суммарная доля 6,9% от общего числа аллелей, общая частота-11,3%); для второго кластера, куда вошли особи плотоядного типа, наличие таких аллелей характерно для всех локусов и их суммарная доля составила 51,7%, а общая частота-38,7%. Кроме того, у плотоядных косаток, по сравнению с рыбадными, отмечено большее количество аллелей для всех локусов и более высокие средние показатели генетического разнообразия (0,668492 по сравнению с 0,480193 у рыбадных).

На основе полученных нами данных можно заключить, что косатки Дальнего Востока России, относящиеся к двум различным экотипам — рыбадному и плотоядному, с высокой степенью вероятности представляют разные репродуктивные группы (популяции). При этом более высокое генетическое разнообразие плотоядных косаток может свидетельствовать о том, что их популяция состоит не только из животных исследуемых нами регионов, но включает зверей и из других районов, нами не изученных. Учитывая существующие между экотипами различия в социальной организации, поведении, пищевой специализации, морфологии и принимая во внимание полученные данные в поддержку генетической изоляции между этими типами, необходимость рассматривать рыбадных и плотоядных косаток по отдельности при мониторинге, охране, управлении и определении объёмов допустимого изъятия животных из природных популяций дальневосточных морей кажется очевидной.

($\ln Pr = -1835.3$) while for $K=1$, $K=3$ and $K=4$ (by the number of geographical groups) the value of a logarithm is smaller (-2217.9 ; -1848.5 and -1843.8 respectively).

A significant difference in frequencies of occurrence of alleles is observed between these two clusters, which points out in favour of their genetic isolation from each other ($F=0,23901$, $p<0,00001$). For each of them also presence of specific alleles is typical: for the first cluster consisting of piscivore killer whales the specific alleles were identified in three from nine studied loci (total cumulative percentage is 6.9% of the total number of alleles, total frequency — 11.3%); for the second cluster which included the individuals of a carnivore type, presence of these alleles is typical of all loci and their total cumulative percentage made 51.7% and total frequency — 38.7%. In addition, in comparison to the piscivore killer whales carnivore ones had a larger quantity of alleles for all loci and higher average indicators of a genetic diversity (0.668492 in comparison with 0.480193 of piscivore killer whales).

On the basis of data received by us one can conclude that killer whales of the Far East of Russia which belong to two different ecotypes — carnivore and piscivore — are different reproductive groups (populations) with high degree of probability. At the same time the greater genetic diversity of carnivore killer whales can indicate that their population consists not only of the animals of the regions studied by us, but also includes the animals from other regions not studied by us. Taking into consideration differences existing between ecotypes — in social organization, behavior, food specialization, morphology and taking into consideration the data received in support of genetic isolation between these specimens, the need to consider carnivore and piscivore killer whales separately during monitoring, conservation, management and determination of volumes of admissible harvesting of animals from natural populations of the Far East seas seems obvious.

Список использованных источников / References

1. Бурдин А. М., Хойт Э., Сато Х., Тарасян К. К., Филатова О. А., 2004. Резидентные и транзитные косатки (*Orcinus orca*) юго-восточного побережья Камчатки // Материалы Третьей Международной Конференции «Морские Млекопитающие Голарктики», Коктебель, Украина. С. 105–108.
2. Тарасян К. К., 2005. Экология косатки Авачинского залива // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. МГУ им. М. В. Ломоносова
3. Филатова О. А., 2005. Акустический репертуар и вокальные диалекты косаток акватории восточной Камчатки и сопредельных территорий // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. МГУ им. М. В. Ломоносова
4. Филатова О. А., Борисова Е. А., Шпак О. В., Мещерский И. Г., Тиунов А. В., Гончаров А. А., Федутин И. Д., Бурдин А. М., 2014. Репродуктивно изолированные экотипы косаток *Orcinus orca* в морях Дальнего Востока России // Зоологический журнал. Т. 93. № 8. С. 1–9.
5. Baird R. W., P. J. Stacey., 1988. Variation in saddle patch pigmentation in populations of killer whales (*Orcinus orca*) from British Columbia, Alaska, and Washington State // Can. J. Zool. V. 66. P. 2582–2585.

6. Baird R. W., Whitehead H., 2000. Social organization of mammal-eating killer whales: group stability and dispersal patterns // *Can.J.Zool.* V. 78. P. 2096–2105.
7. Baird R. W., 2000. The killer whale: foraging specializations and group hunting / *Cetacean Societies* (Ed. by J. Mann, R. C. Connor, P. L. Tyack and H. Whitehead). P. 127–153.
8. Buchanan F. C., Friesen M. K., Littlejohn R. P., Clayton J. W., 1996. Microsatellites from the beluga whale, *Delphinapterus leucas* // *Molecular Ecology.* V. 5. P. 571–575.
9. Burdin A. M., LeDuc R. G., Robertson K. M., Weller D. W., 2010. Genetic diversity in killer whales (*Orcinus orca*) in the Russian Far East seas // 18th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Quebec City, 12–16 October, P. 44
10. Coughlan J., Mirimin L., Dillane E., Rogan E., Cross T. F., 2006. Isolation and characterization of novel microsatellite loci for the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) and cross amplification in other cetacean species // *Molecular Ecology.* V. 6. P. 490–492.
11. Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinformatics Online.* V. 1. P. 47–50.
12. Ford J. K. B., 1984. Call traditions and dialects of killer whales (*Orcinus orca*) in British Columbia. // Ph.D. thesis. Univ. British Columbia, Vancouver. 288 p.
13. Fullard K. J., Early G., Heide-Jorgensen M. P., Bloch D., Rosing-Asvid A., Amos W., 2000. Population structure of long-finned pilot whales in the North Atlantic: a correlation with sea surface temperature? // *Molecular Ecology.* V. 9. P. 949–958.
14. Ivkovich T. V., Filatova O. A., Burdin A. M., Sato H., Hoyt E., 2010. The social organization of resident type killer whales (*Orcinus orca*) in Avacha Gulf, Northwest Pacific, as revealed through association patterns and acoustic similarity // *Mammalian Biology.* V. 75. P. 198–210.
15. Krutzen M., Valsecchi E., Connor R. C., Sherwin W. B., 2001. Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus* // *Molecular Ecology.* V. 1. P. 170–172.
16. Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* V. 155. P. 945–959.
17. Rosel P. E., Forgetta V., Dewar K., 2005. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) // *Molecular Ecology.* V. 5. P. 830–833.
18. Wilberg M. J., Dreher B. P., 2004. GENECAP: a program for analysis of nuclear data for capture-recapture population estimation // *Mol. Ecol. Notes.* Vol. 4. P. 783–785.