

Борисова Е.А.¹, Мещерский И.Г.², Шпак О.В.², Глазов Д.М.², Литовка Д.И.³, Рожнов В.В.²

Оценка влияния географической изоляции на степень генетической обособленности в популяциях белухи (*Delphinapterus leucas*) российского Дальнего Востока

1. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

3. ЧукотТИНРО, Анадырь, Россия

Borisova E.A.¹, Meschersky I.G.², Shpak O.V.², Glazov D.M.², Litovka D. I.³, Rozhnov V.V.²

*Evaluation of effect of geographical isolation on level of genetic distinctness in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) populations in Russian Far East*

1. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

2. A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, Russia

3. Chukotka branch of Pacific Research Fisheries Center, Anadyr, Russia

Являясь обычным видом для Охотского и Берингова морей (Клейненберг и др. 1964), в настоящее время белуха редко встречается у юго-западного побережья полуострова Камчатка и практически никогда – у восточного, что свидетельствует об определённой географической изоляции охотоморских белух от белух Берингова моря и Арктики (Мельников 2001). Однако правомерность выделения отдельных популяций внутри Охотского моря до сих пор оставалась спорной. Анализ распределения аллелей микросателлитных локусов показал, что белухи сахалино-амурского и шантарского летних скоплений представляют единую популяцию (Языкова и др., наст. сборник). Тем больший интерес представляет вопрос об изолированности животных этих скоплений от белух, летующих у берегов западной Камчатки. Хотя два этих района и разделены расстоянием более чем в 1000 км, зимовка «сахалинских» белух в северных районах моря (результаты спутникового прослеживания – Шпак и др. 2010) позволяет предполагать возможность их встречи и спаривания с «камчатскими» в зимне-весенний период.

Для оценки степени генетической изоляции групп белух Охотского моря, как между собой, так и по отношению к белухам Берингова моря, мы провели оценку частот встречаемости аллелей восьми микросателлитных локусов ядерной ДНК: DlrFCB4, DlrFCB5 и DlrFCB17, EV94Mn, 415/416, 417/418, 464/465 и 468/469.

Сбор материала проводился в Сахалинском заливе, у западного побережья Камчатки и в Анадыр-

The beluga whale is a species commonly occurring in the Sea of Okhotsk and the Bering Sea (Клейненберг и др. 1964). But beluga whales are rarely seen off southwestern coast of the Kamchatka Peninsula and are almost never seen off the eastern coast of Kamchatka, which indicates that the Sea of Okhotsk beluga whale stock is geographically separated from the Bering Sea stock and the Arctic stock (Мельников 2001). However, the possibility of existence of separate stocks within the Sea of Okhotsk has been disputed. Analysis of allelic distributions of microsatellite loci has shown that beluga whales that form the Sakhalin-Amur summer aggregation and the Shantar Islands summer aggregation belong to the same population (Языкова и др., this book). Of even greater interest is the issue whether beluga whales that aggregate in the above-mentioned sites are isolated from the stock summering off Kamchatka's west coast. Although the Sakhalin-Amur summer aggregation is separated from the Kamchatka's west coast summer aggregation by a distance of over 1000 km, the fact that Sakhalin-Amur stock spends the winter in the northern part of the Sea of Okhotsk (as was indicated by satellite tracking data – Шпак и др. 2010) leaves open a possibility of the encounters and mating between the Sakhalin-Amur stock and Kamchatka's west coast stock during the winter and spring months.

To assess the degree of genetic isolation both between different groups of the Sea of Okhotsk population and between the Sea of Okhotsk and the Bering Sea populations of beluga whales, we estimated allele frequencies at eight nuclear DNA microsatellite loci: DlrFCB4, DlrFCB5 and DlrFCB17, EV94Mn, 415/416, 417/418, 464/465 and 468/469.

ском лимане. Большинство проб были собраны методом дистанционной биопсии, небольшая часть – от мёртвых животных. Уникальность образцов, взятых методом биопсии, определяли в процессе генотипирования, половую принадлежность – с помощью ПЦР-диагностики по методу Роузел (Rosel 2003). Количество особей, годы сбора, а также половой состав выборок приведены в табл. 1, а показатели разнообразия по каждому из локусов – в табл. 2.

Samples were collected in the Sakhalin Gulf, on the Kamchatka's west coast, and in the Anadyr Estuary. Most of the samples were collected by the method of remote biopsy sampling. Some samples were collected from dead animals. Uniqueness of biopsy samples was identified by genotyping. Gender verification was performed by PCR, using the method described in (Rosel 2003). The number of individuals, the years the samples were collected, and gender identity are shown in Table 1. Diversity indices for all loci are shown in Table 2.

Район сбора / <i>Locality</i>	Годы / <i>years</i>	♂	♀	н/о n/r	всего total
Сахалинский залив / <i>Sakhalin Bay</i>	2009-2011	29	24	2	55
Западная Камчатка / <i>Western Kamchatka</i>	2010-2011	25	7	-	32
Анадырский лиман / <i>Anadyr Estuary</i>	2010-2011	57	15	2	74

Табл. 1. Районы и годы сбора и количество проанализированных особей.
Table 1. Localities, years and samples sizes.

Табл. 2. Разнообразие аллелей 8 микросателлитных локусов в выборках белух из 3 районов. Als – число отмеченных аллелей; Ho – наблюдаемый уровень гетерозиготности; He – ожидаемый уровень гетерозиготности; P – уровень значимости при оценке несоответствия распределению Харди-Вайнберга. Последняя строка: для числа аллелей приводится их сумма, для показателей уровня гетерозиготности – средние значения.

Table 2. Allelic diversity of eight microsatellite loci in samples of beluga whale from three localities. Als – number of alleles; Ho – observed heterozygosity; He – expected heterozygosity; P – statistical significance level for escape from Hardy-Weinberg equilibrium. Bottom line: a sum for number of alleles and means for heterozygosity indices.

Локус <i>Locus</i>	Сахалинский залив <i>Sakhalin Bay</i> , n=55				Зап. Камчатка <i>W. Kamchatka</i> , n=32				Анадырский лиман <i>Anadyr' Estuary</i> , n=74			
	Als	Ho	He	P	Als	Ho	He	P	Als	Ho	He	P
Cb4	10	0,80	0,80	0,66	7	0,68	0,78	0,08	8	0,81	0,76	0,18
Cb5	5	0,71	0,66	0,58	4	0,66	0,58	0,95	4	0,56	0,6	0,67
Cb17	8	0,72	0,78	0,76	7	0,81	0,77	0,98	11	0,72	0,84	0,18
Ev94	4	0,65	0,68	0,24	4	0,68	0,69	0,40	6	0,81	0,79	0,71
415	4	0,74	0,69	0,69	4	0,75	0,74	0,97	4	0,62	0,72	0,17
417	8	0,78	0,75	0,17	8	0,78	0,81	0,05	9	0,79	0,81	0,25
464	3	0,41	0,50	0,04	3	0,39	0,63	0,01	5	0,4	0,49	0,14
468	5	0,53	0,69	0,04	4	0,55	0,66	0,10	7	0,64	0,75	0,11
	47	0,67	0,69		41	0,66	0,71		54	0,67	0,72	

У «анадырских» животных, по сравнению с «охотоморскими», отмечено большее количество аллелей для большинства локусов и несколько более высокие средние показатели разнообразия. В пределах Охотского моря большее число аллелей было обнаружено у «сахалинских» белух, однако средние показатели гетерозиготности у двух охотоморских групп практически одинаковы.

Между всеми тремя выборками отмечены высоко достоверные отличия в частотах встречаемости аллелей (табл. 3), что свидетельствует об их принадлежности к разным репродуктивным группам (популяциям).

Beluga whales from the Anadyr Estuary population had a greater number of alleles at most loci and somewhat higher mean diversity index values than beluga whales from the Sea of Okhotsk population. Comparison of different groups of the Sea of Okhotsk population showed a greater number of alleles in the Sakhalin stock, but mean heterozygosity values of both Sea of Okhotsk stocks were almost the same. The highly significant differences in allele frequency between three sample sets tested (Table 3) showed that three stocks belong to different populations (or reproductive groups).

При этом уровень генетических отличий белух Сахалинского залива от животных западного побережья Камчатки оказывается даже несколько выше, чем уровень отличий «камчатских» белух от белух Анадырско-го лимана

Анализ методом кластеризации (программа Structure 2.3.3, Pritchard et al. 2000) также обнаруживает явную гетерогенность в пределах общей совокупности – анализируемая выборка с большей вероятностью разделяется на три (значение LnP , логарифма вероятности, $= -3537,2$), нежели на две ($\text{LnP} = -3600,3$) группы. Выявленная гетерогенность напрямую связана с местом сбора образцов – «анадырские», «камчатские» и «сахалинские» белухи отличаются сходно высокой вероятностью отнесения именно к «своей» группе каждая (рис. 1).

Moreover, the genetic differences between the Sakhalin stock and the Kamchatka's west coast stock were even somewhat greater than the genetic differences between the Anadyr Estuary stock and the Kamchatka's west coast stock.

Using a clustering method (the software Structure 2.3.3, Pritchard et al. 2000), we confirmed the existence of obvious heterogeneity of the entire universal set: there was a higher probability that the samples being analysed were divided into three groups (the log probability $\text{LnP} = -3537.2$) rather than two ($\text{LnP} = -3600.3$). The heterogeneity directly correlated with the sample collection locations. All the three sets of samples (samples from the Anadyr Estuary, Kamchatka's west coast, and Sakhalin Gulf) had a similarly high probability of belonging to their own stock (Fig. 1).

Табл. 3. Значения F_{st} -критерия (над диагональю) и уровень статистической значимости отличий (под диагональю) при сравнении выборок по частоте встречаемости аллелей восьми микросателлитных локусов.
Table 3. Samples pairwise F_{ST} s (above diagonal) and statistical significance level (below diagonal) for the samples comparison by frequencies of eight microsatellite loci alleles.

Район сбора <i>Locality</i>	Сахалинский залив <i>Sakhalin Bay</i>	Зап. Камчатка <i>W. Kamchatka</i>	Анадырский лиман <i>Anadyr' Estuary</i>
Сахалинский залив / <i>Sakhalin Bay</i>	***	0,06768	0,07422
Зап. Камчатка / <i>W. Kamchatka</i>	0,00000	***	0,06556
Анадырский лиман / <i>Anadyr' Estuary</i>	0,00000	0,00000	***

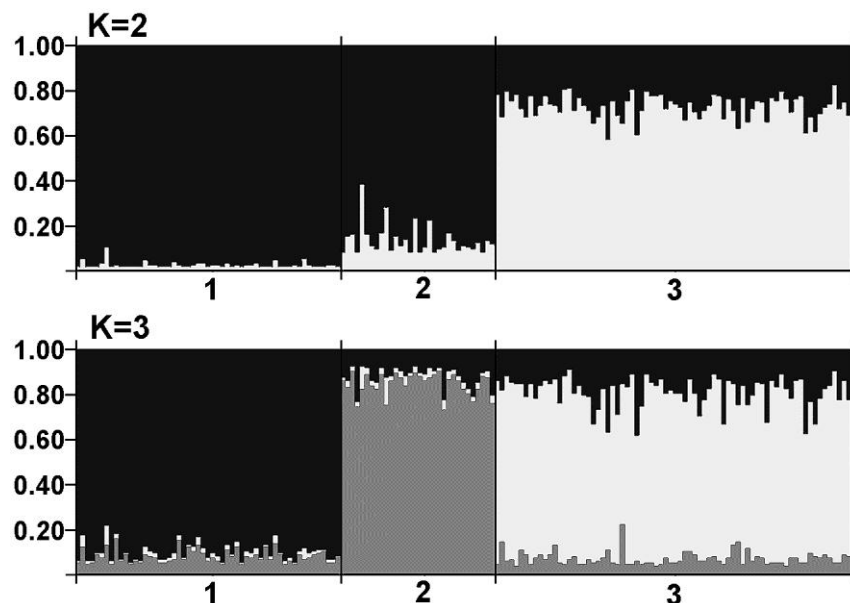


Рис. 1. Вероятность принадлежности особей обобщенной выборки ($n=161$) к одному из двух ($K=2$) или трех ($K=3$) гипотетических генетических кластеров. Модель «Admixture-LOCPRIOR», 500 000 реплик. Районы сбора образцов: 1 – Сахалинский залив, 2 – западное побережье Камчатки, 3 – Анадырский лиман.

Fig. 1. Probability of individuals of total sample ($n=161$) to belong to one of two ($K=2$) or three ($K=3$) hypothetical genetic clusters. Admixture-LOCPRIOR model, 500000 replications. Sampling localities: 1 – Sakhalin Bay, 2 – Western Kamchatka, 3 – Anadyr' Estuary.

Таким образом, при отсутствии выраженных географических преград в пределах единой акватории и возможной близости районов зимовок и путей ми-

Thus, despite the absence of obvious geographical obstacles between two stocks inhabiting the same Sea of Okhotsk and despite the possible nearness of their win-

граций, между двумя группами белух Охотского моря поддерживается не меньший уровень генетической обособленности, чем между географически разделенными популяциями Охотского и Берингова морей.

Важно отметить, что при раздельном анализе самцов и самок статистически достоверные отличия между тремя районами сохраняются для обеих групп, однако уровень отличий самцов Камчатки и Сахалина ($F_{st}=0,08046$) оказывается в два раза выше, чем самок из этих районов ($F_{st}=0,0372$). При этом внутри западно-камчатской выборки между самцами и самками также обнаруживаются существенные различия в частотах встречаемости аллелей ($F_{st}=0,0356$, $P=0,018$), в то время как выборки самцов и самок из Сахалинского залива и из Анадырского лимана генетически однородны.

При использовании метода кластеризации обособленность самок камчатской группы от самок из Сахалинского залива не выявляется (хотя, как уже сказано, критерий F_{st} определяет различия между ними как статистически достоверные) – наименьшее значение логарифма вероятности соответствует двум группам («анадырской» и «охотоморской»: $LnP=-1059,9$ при $K=2$ и $LnP=-1062,2$ при $K=3$, рис. 2), в то время как при анализе самцов продолжает выявляться обособленность всех трех групп: $LnP=-2449,6$ при $K=3$ и $LnP=-2485,4$ при $K=2$, рис. 3).

tering grounds and migration routes, these two stocks have a level of genetic isolation that is as high as the level of genetic isolation between the geographically separated the Sea of Okhotsk stock and the Bering Sea stock.

It is of importance that separate analyses for males and females still showed statistically significant differences between the three areas tested. Although the level of difference between the Kamchatka's west coast beluga males and Sakhalin beluga males was two times higher ($F_{st}=0.08046$) than the level of difference between the Kamchatka and Sakhalin females ($F_{st}=0.0372$). Moreover, there was a significant difference in allele frequencies ($F_{st}=0.0356$, $P=0.018$) between males and females of the Kamchatka's west coast stock, while there were no genetic differences between males and females of the Sakhalin Gulf stock or between males and females of the Anadyr Estuary stock.

The clustering method did not reveal any genetic isolation between females of the Kamchatka's west coast stock and females of the Sakhalin Gulf stock (although we have already mentioned that there were statistically significant differences in the F_{st} values) – two groups (the Anadyr and the Sea of Okhotsk ones) had the minimum value of the log probability: $LnP=-1059.9$, $K=2$ and $LnP=-1062.2$, $K=3$, Fig. 2. However, the analysis of males by the clustering method showed isolation of all the three groups: $LnP=-2449.6$, $K=3$ and $LnP=-2485.4$, $K=2$, Fig.3.

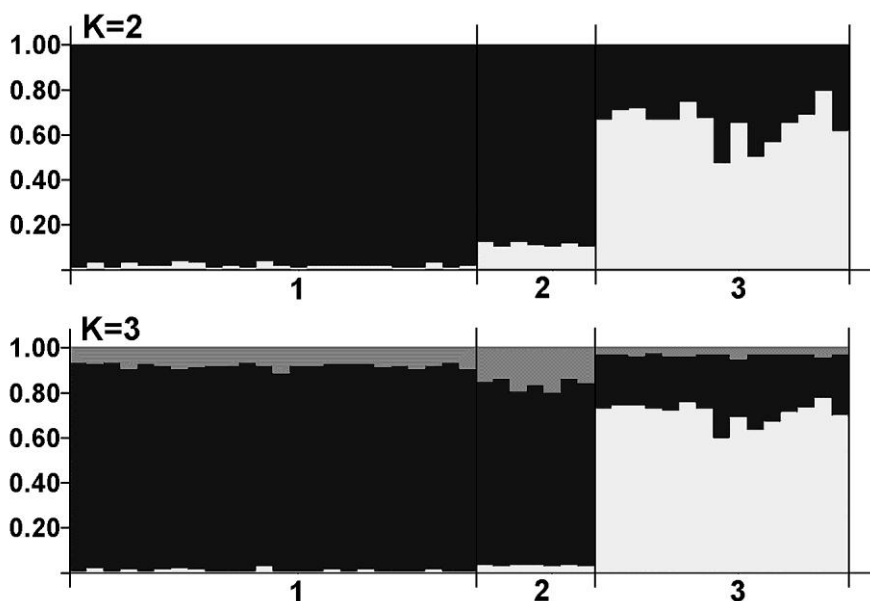


Рис. 2. Вероятность принадлежности особей в выборке самок ($n=46$) к одному из двух ($K=2$) или трех ($K=3$) гипотетических генетических кластеров. Модель и районы сбора образцов – см. рис. 1.

Fig. 2. Probability of individuals of sample of females ($n=46$) to belong to one of two ($K=2$) or three ($K=3$) hypothetical genetic clusters. Model and localities – see fig.1.

Для представления о том, с чем может быть связана

To understand the possible causes of the isolation, fur-

выявленная особенность, необходимы дальнейшие исследования и увеличение объема выборки.

Работа выполнена в рамках Программы «Белуха-Белый кит» ИПЭЭ РАН Постоянно действующей экспедиции РАН по изучению животных Красной книги Российской Федерации и других особо важных животных фауны России при поддержке Русского географического общества.

ther research and large sample sizes are required.

The research was done under the Beluga White Whale Program conducted by the Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, with the support of the Russian Geographical Society. The program is part of the Permanent expedition of Russian Academy of Science studying Red Book animals and other focus species of Russia.

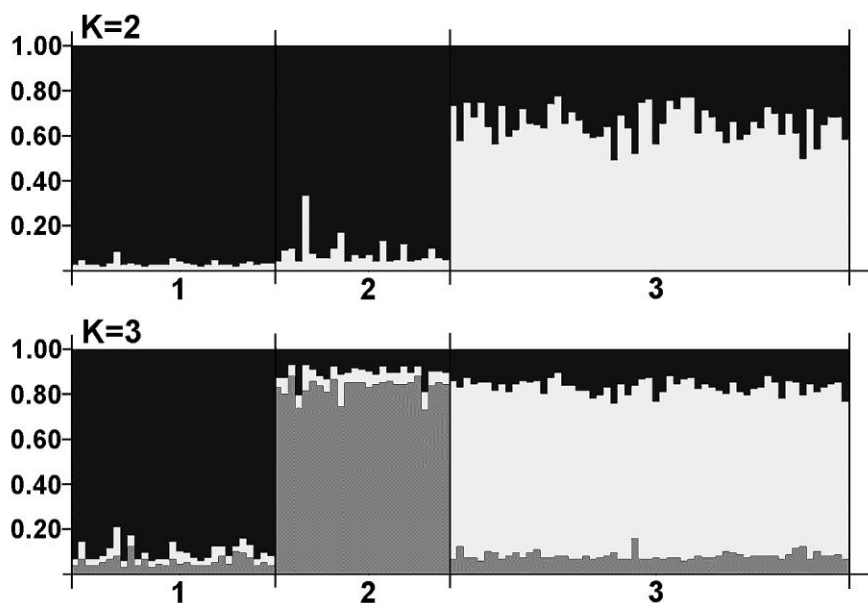


Рис. 3. Вероятность принадлежности особей в выборке самцов ($n=111$) к одному из двух ($K=2$) или трех ($K=3$) гипотетических генетических кластеров. Модель и районы сбора образцов – см. рис. 1.

Fig. 3. Probability of individuals of sample of males ($n=111$) to belong to one of two ($K=2$) or three ($K=3$) hypothetical genetic clusters. Model and localities – see fig.1.

Список использованных источников / References

- Клейненберг С.Е., Яблоков А.В., Белькович В.М., Тарасевич М.Н. 1964. Белуха. Наука, Москва. 455 стр. [Kleinenberg S.E., Yablokov A.V., Bel'kovich V.M., Tarasevich M.N. 1969. Beluga (*Delphinapterus leucas*): Investigation of the species. Academy of Sciences of the USSR, Moscow. Translated by Israel Program for Scientific Translations. 455 pp.]
- Мельников В.В. 2001. Белуха Охотского моря. С. 51-58 в Результаты исследований морских млекопитающих Дальнего Востока в 1991-2000 гг. ВНИРО, Москва [Melnikov V.V. 2001. Beluga Whale of the Sea of Okhotsk. Pp. 51-58 in Research work on marine mammals in the North Pacific in 1991-2000. VNIRO, Moscow]
- Шпак О.В., Эндрюс Р.Д., Глазов Д.М., Литовка Д.И., Хоббс Р.К., Мухаметов Л.М. 2010. Сезонные миграции охотоморской белухи *Delphinapterus leucas* летнего сахалинско-амурского скопления. Биология моря, 36(1): 56-62 [Shpak O.V., Andrews R.D., Glazov D.M., Litovka D.I., Hobbs R.C., Mukhametov L.M. 2010. Seasonal migrations of Okhotsk Sea belugas from the Sakhalin-Amur summer aggregation. Marine biology, 36(1): 56-62]
- Языкова М.Г., Мещерский И.Г., Шпак О.В., Глазов Д.М., Литовка Д.И., Борисова Е.А., Рожнов В.В. 2012. Молекулярно-генетический анализ сахалинско-амурского и шантарского летних скоплений белухи (*Delphinapterus leucas*) в Охотском море. Наст. Сборник [Yazykova M.G., Meschersky I.G., Shpak O.V., Glazov D.M., Litovka D.I., Borisova E.A., Rozhnov V.V. 2012. Molecular genetic analysis of Sakhalin-Amur and Shantar beluga' (*Delphinapterus leucas*) summer aggregations in the Okhotsk Sea. Th[is book]
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155(2): 945-959.
- Rosel P.E. 2003. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. Conserv. Genetics, 4: 647-649.