

0,41. Следовательно, первая схема наложения тавро оказывается более эффективной (рис. 2а).

Таким образом, применение схемы наложения тавро, при которой чётные цифры смещаются на пол-линии вверх, а нечетные на пол-линии вниз, позволит более чем вдвое сократить вероятность неверного считывания тавро, и рекомендуется авторами для использования при таврении ластоногих.

Hence, the former pattern of branding proves more effective (Fig. 2a).

Thus the application of branding pattern whereby the even digits are displaced half a line upwards, and the uneven figures, half a line down, would reduce more than twofold the probability of an erroneous interpretation of the brand and is to be recommended by the authors for the use in branding pinnipeds.

#### Список использованных источников / References

Merrick R.L., Loughlin T.R., Calkins D.G. 1996. Hot branding: a technique for long-term marking of pinnipeds. U.S. Department of Commerce, Seattle, WA

Языкова М.Г.<sup>1</sup>, Мещерский И.Г.<sup>2</sup>, Шпак О.В.<sup>2</sup>, Глазов Д.М.<sup>2</sup>, Литовка Д.И.<sup>3</sup>, Борисова Е.А.<sup>4</sup>, Рожнов В.В.<sup>2</sup>

### **Молекулярно-генетический анализ сахалино-амурского и шантарского летних скоплений белухи (*Delphinapterus leucas*) в Охотском море**

1. Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия
2. Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия
3. Чукотский филиал Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра, Анадырь, Россия
4. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Yazykova M.G.<sup>1</sup>, Meschersky I.G.<sup>2</sup>, Shpak O.V.<sup>2</sup>, Glazov D.M.<sup>2</sup>, Litovka D.I.<sup>3</sup>, Borisova E.A.<sup>4</sup>, Rozhnov V.V.<sup>2</sup>

### ***Molecular genetic analysis of Sakhalin-Amur and Shantar beluga (*Delphinapterus leucas*) summer aggregations in the Sea of Okhotsk***

1. Russian State Agrarian University – K.A. Timiryazev Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia
2. A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, Russia
3. Chukotka branch of Pacific Research Fisheries Center, Anadyr, Russia
4. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Интенсивные исследования генетической структуры стад белух, держащихся у берегов американского континента, проводятся с конца XX в. (Brown Gladden et al. 1997, 1999, de March and Postma 2003, O`Corry-Crowe et al. 1997, 2010, и др.), но аналогичные работы в России были начаты только в самое последнее время (Мещерский и др. 2008, 2010). Основное внимание уделяется белухам дальневосточных морей, эксплуатация стад которых представляет наибольший интерес.

Intensive studies of the genetic structure of populations of beluga whales inhabit North America waters held from the end of XX century (Brown Gladden et al. 1997, 1999, de March and Postma 2003, O`Corry-Crowe et al. 1997, 2010, etc.), but similar work in Russia began only recently (Meschersky et al. 2008, 2010). The focus of the studies is on beluga Eastern seas, where exploitation of beluga stocks is of most interest.

В Охотском море, отделенном от тихоокеанских вод полуостровом Камчатка и Курильскими островами, существует несколько мест летней концентрации белух: Сахалинский залив и Амурский лиман, заливы Шантарского региона (Николая, Ульбанский, Тугурский и Удская губа), залив Шелихова (Гижигинская и Пенжинская губы) и западное побережье Камчатки (Мельников 2001). Для анализа генетической структуры групп белух, летующих в разных районах западной части Охотского моря нами был определен состав нуклеотидных последовательностей контрольного региона мтДНК (497 п.н.) и аллельный состав 19 микросателлитных локусов яДНК (DlrFCB1, DlrFCB2, DlrFCB3, DlrFCB4, DlrFCB5, DlrFCB6, DlrFCB8, DlrFCB10, DlrFCB11, DlrFCB13, DlrFCB14, DlrFCB16, DlrFCB17, EV37Mn, EV94Mn, 415/416, 417/418, 464/465, 468/469) у животных из Сахалинского (сборы 2006-2010 гг.), Ульбанского и Тугурского (сборы 2010-2011 гг.) заливов, Удской губы (сборы 2008-2011 гг.) и залива Николая (сборы 2009-2010 гг.) – рис. 1.

In the Okhotsk Sea, separated from open Pacific by Kamchatka peninsula and Kuril Islands, there are some areas where belugas aggregate in summer period: Sakhalinsky Bay and Amur Estuary, bays of Shantar region (Nikolaya, Ulbansky, Tugursky, and Udskaaya Bays), Gulf of Shelihov (Gizhinskaya and Penzhinskaya Bays), as well as off the west coast of Kamchatka (Мельников 2001). To analyze genetic structure of groups of belugas summering in different areas of Western part of the Okhotsk Sea we sequenced the mitochondrial DNA control region (497 bp) and determined allelic composition of 19 microsatellite loci of nuclear DNA (DlrFCB1, DlrFCB2, DlrFCB3, DlrFCB4, DlrFCB5, DlrFCB6, DlrFCB8, DlrFCB10, DlrFCB11, DlrFCB13, DlrFCB14, DlrFCB16, DlrFCB17, EV37Mn, EV94Mn, 415/416, 417/418, 464/465, 468/469) for belugas from Sakhalinsky Bay (collected in 2006-2010), Ulbansky and Tugursky bays (collected in 2010-2011), Udskaaya Bay (2008-2011) and Nikolaya Bay (2009-2010) – Fig. 1.

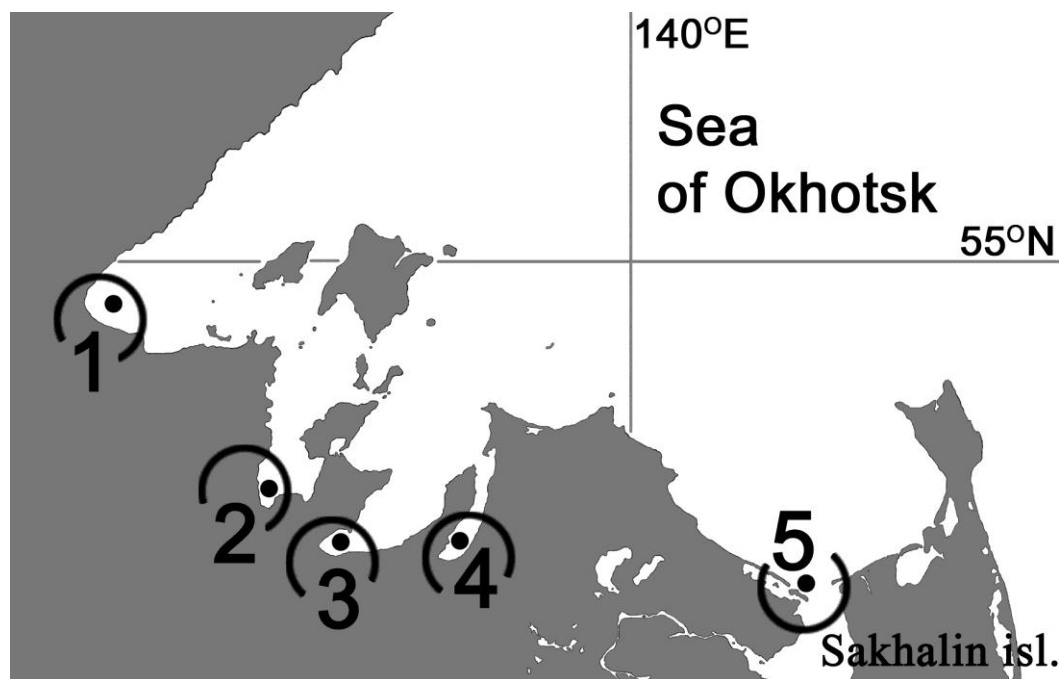


Рис. 1. Районы сбора материала. Заливы: 1 – Удская губа, 2 – Тугурский, 3 – Ульбанский, 4 – Николая, 5 – Сахалинский.

Fig. 1. Sample collecting localities: 1 – Udskaaya Bay, 2 – Tugursky Bay, 3 – Ulbansky Bay, 4 – Nikolaya Bay, 5 – Sakhalin Bay

Материалом для исследования служили образцы кожи, собранные преимущественно методом дистанционной биопсии и в небольшом количестве – от мертвых животных.

Анализ распределения частот аллелей 19 микросателлитных локусов показал, что средние значения генетического разнообразия для всех выборок являются сходными, варьируя от 0,590 в Удской губе до 0,643 в заливе Николая. Статистически достоверные отличия в частоте встречаемости аллелей

DNA was extracted from skin samples, the most of which was collected by remote biopsy and in some cases from dead animals.

Analysis of 19 microsatellite loci alleles distribution showed that averaged indexes of genetic diversity were similar for all samples, varying from 0.590 in Udskaaya Bay to 0.643 in Nikolaya Bay. Statistically significant differences in

были отмечены только между выборками из Ульяновского и Сахалинского заливов, но ни для каких других пар сравнения, в том числе и с участием выборок из этих заливов (табл. 1).

allele frequencies were found only for pair of samples Sakhalinsky Bay vs. Ulbansky Bay, but not for any other pairs of comparison (Table 1).

Табл. 1. Значения Fst-критерия (над диагональю) и уровень статистической значимости отличий (под диагональю) при сравнении выборок из разных районов по частоте встречаемости аллелей 19 микросателлитных локусов. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные отличия.

Table 1. Fst values (above diagonal) and statistical significance level (below diagonal) for pairwise comparison of samples from different localities by 19 microsatellite loci alleles frequencies. Statistically significant values are given in bold.

Р-н сбора материала <i>Sampling site</i>	Удская губа <i>Udskaya Bay</i> , n=77	Тугурский залив <i>Tugursky Bay</i> , n=26	Ульбанский залив <i>Ulbansky Bay</i> , n=61	Залив Николая <i>Nikolaya Bay</i> , n=8	Сахалинский залив <i>Sakhalin Bay</i> , n=37
Удская губа <i>Udskaya Bay</i>	***	0,00000	0,00234	0,00000	0,00141
Тугурский залив <i>Tugursky Bay</i>	0,95312	***	0,00000	0,00000	0,00000
Ульбанский залив <i>Ulbansky Bay</i>	0,11719	0,90430	***	0,00000	<b>0,00759</b>
Залив Николая <i>Nikolaya Bay</i>	0,65137	0,71094	0,59180	***	0,00201
Сахалинский залив <i>Sakhalin Bay</i>	0,27930	0,53809	<b>0,00000</b>	0,35352	***

Анализ методом кластеризации (программа Structure v.2.3.3 – Pritchard et al. 2000) показал высокую степень гетерогенности общей выборки, никак не связанную, однако, с районами пребывания белух (рис. 2, анализ для K=3 и K=4 демонстрирует аналогичный уровень неопределенности связи генотипа с местом происхождения образца).

В исследованных районах летних скоплений белух выявлено 13 гаплотипов контрольного региона мтДНК, из которых наиболее распространенными оказались три – S022, доминировавший во всех районах, S001, доминировавший в Сахалинском заливе и заливе Николая, и S148, доминировавший в Тугурском заливе и Удской губе (табл. 2).

Для Сахалинского залива отмечено наибольшее количество гаплотипов, среди которых три (S051, S053 и S063) уникальны, т.е. не отмечены ни в одном другом исследованном районе. Самым низким гаплотипическим и нуклеотидным разнообразием отличается выборка из Ульяновского залива, в остальных заливах эти показатели находятся на сходном уровне. Отличия в нуклеотидных последовательностях гаплотипов у белух, держащихся в разных районах, оказываются статистически высокодостоверными, за исключением пар сравнения Тугурский залив/Удская губа и Сахалинский залив/залив Николая (табл. 3).

The model-based clustering method, realized in Structure v.2.3.3 software (Pritchard et al. 2000) showed a high level of total sample heterogeneity by no way correlated, however, with spatial belugas distribution (see Fig. 2 – results for both K=3 and K=4 demonstrated no correlation between genotype and sample collection locality).

In studied summer beluga aggregations 13 haplotypes of the mtDNA control region were revealed. The most frequent were three of them: S022 which prevailed in beluga in all areas, S001, prevailed in Sakhalinsky and Nikolaya Bays, and S148, prevailed in Tugursky and Udskaya Bays (Table 2).

The largest number of haplotypes was found in Sakhalinsky Bay, and three (S051, S053 and S063) ones found there were unique, i.e. not observed in any other studied areas. The lowest haplotypic and nucleotide diversity was found for sample from Ulbansky Bay. In other bays these indexes were at a similar level. Differences in nucleotide sequences of mtDNA control region in belugas, summering in different areas are highly statistically significant, except for the comparison pairs Tugursky Bay vs. Udskaya Bay and Sakhalinsky Bay vs. Nikolaya Bay (Table 3).

Табл. 2. Встречаемость (%) гаплотипов контрольного региона мтДНК (497 п.н.) и индексы генетического разнообразия в выборках белух из заливов западной части Охотского моря. Жирным шрифтом выделены доминирующие (встречаемость >15%) гаплотипы.

Table 2. Occurrence (%) of the mtDNA control region haplotypes (497 bp) and genetic diversity indices in beluga whale samples from bays of western part of the Okhotsk Sea. The major haplotypes (occurrence >15%) are given in bold.

Гаплотип / <i>Haplotype</i>	Удская губа <i>Udskaya Bay</i> , n=84	Тугурский залив <i>Tugursky Bay</i> , n=31	Ульбанский залив <i>Ulbansky Bay</i> , n=61	Залив Николая <i>Nikolaya Bay</i> , n=8	Сахалинский залив <i>Sakhalin Bay</i> , n=72
S001	1,2 (1 ind.)	0	0	<b>50,0</b>	<b>23,6</b>
S022	<b>36,9</b>	<b>29</b>	<b>80,3</b>	<b>25,0</b>	<b>36,1</b>
S148	<b>34,5</b>	<b>25,8</b>	3,28	0	1,4
S247	2,4	9,68	0	0	0
S300	9,52	3,2 (1 ind.)	0	0	1,4
S303	1,2 (1 ind.)	0	0	0	0
S706	14,3	12,9	1,6 (1 ind.)	0	1,4 (1 ind.)
S130	0	12,9	8,2	12,5 (1 ind.)	0
S327	0	6,45	4,9	12,5 (1 ind.)	0
S011	0	0	1,6 (1 ind.)	0	13,9
S051	0	0	0	0	6,94
S053	0	0	0	0	9,72
S063	0	0	0	0	5,56
Число гаплотипов (в т.ч. уникальных) <i>Number of haplotypes (including founds in this bay only)</i>	7(1)	7(0)	6(0)	4(0)	9(3)
Гаплотипич. разнообразие <i>Haplotypic diversity (H)</i>	0,723	0,828	0,350	0,750	0,788
Нуклеотидн. разнообразие <i>Nucleotide diversity (π, %)</i>	0,388	0,429	0,138	0,431	0,341

Представленность у белух, летующих в близко расположенных друг от друга заливах, уникальных сочетаний материнских линий свидетельствует о высокой степени филопатрии. Потомки одних самок устойчиво, из поколения в поколение, направляются летом в одни и те же районы. В то же время все белухи западной части Охотского моря обладают единым ядерным генофондом, т.е. являются представителями одной популяции. Поддержание общности генофонда, вероятно, происходит при спаривании на местах совместных зимовок и/или на единых весенних миграционных путях.

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 и проекта «Современный статус белух амурского скопления (Охотское море, Россия): оценка устойчивости»

The fact that groups of beluga summering in close spaced bays represent unique combinations of maternal lines indicates a high degree of philopatry. Descendants of one or the other female persistently, from generation to generation, follow in the summer to certain areas. At the same time, all belugas of western part of the Okhotsk Sea share a single nuclear gene pool, i.e. represent a single population. Maintaining a common gene pool probably occurs during mating at joint wintering areas and / or on common spring migration routes.

The research was done under the Beluga White Whale Program (the program is part of the Permanent expedition of Russian Academy of Science studying Red Book animals and other focus species of Russia) conducted by the Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, with the support of the Russian Geographical Society and the project "Current status of the Sakhalin-Amur beluga aggregation (The Okhotsk Sea, Russia): sustainability assessment" (contractor: "Dolphin and I" Ltd: rehabilitation and health center), with the fi-

(исполнитель ООО РОЦ «Дельфин и Я»), финансирование Ocean Park Corporation – Hong Kong; Georgia Aquarium Inc., SeaWorld Parks and Entertainment, Mystic Aquarium and Institute for Exploration – USA; Kamogawa Sea World – Japan).

nancial support of Ocean Park Corporation (Hong Kong); and with the financial support of Georgia Aquarium Inc., SeaWorld Parks and Entertainment, Mystic Aquarium and Institute for Exploration, (USA); Kamogawa Sea World (Japan).

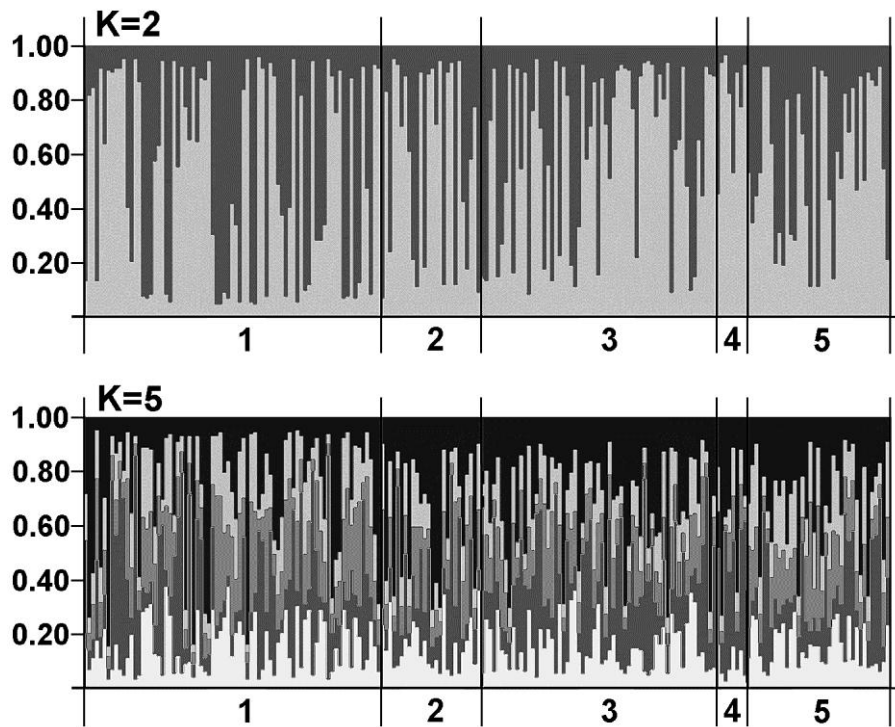


Рис. 2. Вероятность принадлежности особей обобщенной выборки ( $n=209$ ) к одному из двух ( $K=2$ ) или пяти ( $K=5$ ) генетических кластеров (обозначены оттенками серого цвета) при заданном числе этих кластеров. Модель «Admixture-LOCPRIOR», 300000 реплик. Места происхождения образцов – как на рис. 1.

Fig. 2. Probability of individuals of total sample ( $n=209$ ) to belong to one of two ( $K=2$ ) or five ( $K=5$ ) genetic clusters (marked by gray gradations) in case the clusters number is specified. Admixture-LOCPRIOR model 300000 replications. Sampling localities as on fig. 1.

Табл. 3. Уровень отличий в нуклеотидных последовательностях ( $\Phi_{st}$ -критерий) контрольного региона мтДНК (497 п.н.) (над диагональю) и уровень статистической значимости отличий (под диагональю) при сравнении выборок из пяти заливов западной части Охотского моря. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные отличия.

Table 3. Difference in nucleotide sequences of the the mtDNA control region (497 bp) ( $\Phi_{st}$ , above diagonal) and statistical significance level (below diagonal) for pairwise comparison of samples from five bays of western part of the Okhotsk Sea. Statistically significant values are given in bold.

Район сбора материала / Sampling site	Удская губа / Udskaaya Bay, n=77	Тугурский залив / Tugursky Bay, n=26	Ульбанский залив / Ulbansky Bay, n=61	Залив Николая / Nikolaya Bay, n=8	Сахалинский залив / Sakhalin Bay, n=37
Удская губа / Udskaaya Bay	***	0,00000	<b>0,15478</b>	<b>0,21489</b>	<b>0,17812</b>
Тугурский залив / Tugursky Bay	0,36719	***	<b>0,12317</b>	<b>0,18206</b>	<b>0,17470</b>
Ульбанский залив / Ulbansky Bay	<b>0,00000</b>	<b>0,00098</b>	***	<b>0,35167</b>	<b>0,14455</b>
Залив Николая / Nikolaya Bay	<b>0,00195</b>	<b>0,00293</b>	<b>0,00000</b>	***	0,04039
Сахалинский залив / Sakhalin Bay	<b>0,00000</b>	<b>0,00000</b>	<b>0,00000</b>	0,14746	***

Список использованных источников / References

- 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]
- Мещерский И.Г., Холодова М.В., Звычайная Е.Ю. 2008. Молекулярно-генетическая характеристика белухи (*Delphinapterus leucas*: Cetacea, Monodontidae), летующей в южной части Охотского моря, в сравнении с североамериканскими популяциями. Генетика, 44(9): 1268-1274 [Meschersky I.G., Kholodova M.V., Zvychainaya E.Yu. 2008. Molecular-genetic characteristics of beluga whale (*Delphinapterus leucas*: Cetacea, Monodontidae) summering in the southern Sea of Okhotsk comparing with North American populations. Genetics, 44(9): 1268-1274]
- Мещерский И.Г., Шпак О.В., Эндрюс Р.Д., Глазов Д.М., Мухаметов Л.М., Рожнов В.В. 2010. К вопросу о единстве летнего скопления белух (*Delphinapterus leucas*) западной части Охотского моря. С. 390-395 в Морские млекопитающие Голарктики. Сборник научных трудов. Калининград [Meschersky I.G., Shpak O.V., Andrews R.D., Glazov D.M., Mukhametov L.M., Rozhnov V.V. 2010. On the stock unity of the belugas (*Delphinapterus leucas*) summering in the Western part of the Okhotsk Sea. Pp. 390-395 in Marine mammals of the Holarctic. Collection of scientific papers. Kaliningrad]
- Brown Gladden J.G., Ferguson M.M., Clayton J.W. 1997. Matriarchal genetic population structure of North American beluga whales *Delphinapterus leucas* (Cetacea: Monodontidae). Mol. Ecol., 6: 1033-1046.
- Brown Gladden J.G., Ferguson M.M., Friesen M.K., Clayton J.W. 1999. Population structure of North American beluga whales (*Delphinapterus leucas*) based on nuclear DNA microsatellite variation and contrasted with the population structure revealed by mitochondrial DNA variation. Mol. Ecol., 8: 347-369.
- de March B.G.E., Postma L.D. 2003. Molecular genetic stock discrimination of belugas (*Delphinapterus leucas*) hunted in Eastern Hudson Bay, Northern Quebec, Hudson Strait, and Sanikiluaq (Belcher Islands), Canada, and comparison to adjacent populations. Arctic, 56: 111-124.
- O'Corry-Crowe G.M., Suydam R.S., Rosenberg A., Frost K.J., Dizon A.E. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. Mol. Ecol., 6: 955-970.
- O'Corry-Crowe G.M., Lydersen C., Heide-Jørgensen M.P., Hansen L., Mukhametov L.M., Dove O., Kovacs K.M. 2010. Population genetic structure and evolutionary history of North Atlantic beluga whales (*Delphinapterus leu-*