серых китов с численностью, активностью и состоянием моржей в районе о. Врангеля. Поскольку оба вида питаются бентосом, их присутствие в регионе должно зависеть от состояния кормовой базы – бентосных сообществ.

the Wrangel Island region. Because both of these species are bottom feeders, their presence in the area should be related to the status of the benthic marine animal assemblages that constitute their food resources.

Мещерский И.Г.[1], Кулешова М.А.[2], Литовка Д.И.[3], Бурканов В.Н.[4,5], Андрюс Р.Д.[6,7], Цидулко Г.А.[1], Ильяшенко В.Ю.[1], Рожнов В.В.[1]

Состав митохондриальных линий серых китов (*Eschrichtius robustus*) дальневосточных морей России: контрольный регион и белок-кодирующие участки

1. Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия
2. Московский Педагогический Государственный Университет, Москва, Россия
3. Чукотский филиал Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра, Анадырь, Россия
4. Камчатский филиал Тихоокеанского института географии ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский, Россия
5. Национальная лаборатория по изучению морских млекопитающих, НМФС, НОАА, Сиэтл, США
6. Университет штата Аляска, Фербенкс, США
7. Центр изучения морской жизни Аляски, Сьюорд, США

Meschersky I.G.[1], Kuleshova M.A.[2], Litovka D.I.[3], Burkanov V.N.[4,5], Andrews R.D.[6,7], Tsidulko G.A.[1], Ilyashenko V.Yu.[1], Rozhnov V.V.[1]

Mitochondrial lines composition of Gray whale (Eschrichtius robustus) in Russian Far Eastern seas: the control region and protein-coding fragments

1. A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, Russia
2. Moscow Pedagogical State University, Moscow, Russia
3. Chukotka branch of Pacific Research Fisheries Center, Anadyr, Russia
4. Kamchatka Branch of Pacific Geographical Institute, FEB RAS, Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia
5. National Marine Mammal Laboratory, AFSC, NMFS, NOAA, Seattle, USA
6. University of Alaska, Fairbanks, USA
7. Alaska SeaLife Center, Seward, USA

В российских водах серые киты (*Eschrichtius robustus*) в период летнего нагула и сезонных миграций встречаются вдоль берегов Чукотского, Берингова и Охотского морей и Тихого океана. В северных районах (побережье Чукотского полуострова и Корякии) проводят лето особи чукотско-калифорнийской популяции, зимующие и размножающиеся у берегов американского континента (Scammon 1869, Томилин 1957). Более южные районы, в частности северо-восточное побережье о. Сахалин, являются историческим ареалом охотско-корейской популяции, практически истребленной к началу 1970-х гг. (Берзин Кузмин 1975). Позже киты вновь стали регулярно встречаться около о. Сахалин, однако вопрос о том, являются ли они уцелевшими аборигенными особями или их потомками или мигрантами из американских вод, осваивающими новые кормовые районы, остается открытым (Берзин 1995, Ilyashenko 2011).

In Russian waters, gray whales (*Eschrichtius robustus)* occur along the shores of the Chukchi, Bering and Okhotsk seas and along the Pacific coast, during their fattening period in summer and seasonal migrations. The northern regions (the coast of Chukotka Peninsula and Koryakia) are the summering area for the California-Chukotka gray whale population (whose winter breeding grounds are near the North American continent) (Scammon 1869, Томилин 1957). The regions that are somewhat south (the northeastern coast of Sakhalin Island, in particular) are the historical range of the Okhotsk-Korean population that had been almost exterminated by the early 1970s (Берзин Кузмин 1975). Later on, gray whales were again spotted on a regular basis near Sakhalin, but whether they are the indigenous individuals that survived or their next generations, or whether they are an American population that migrate into Russian waters opening up new feeding areas is still an open question (Берзин 1995, Ilyashenko 2011).

Препринт

R. LeDuc с соавторами (2002) на основании анализа участка контрольного региона митохондриальной ДНК (мтДНК) длиной 523 п.н. в пробах биопсии кожи показали, что между выборками китов, встреченных у северо-восточного побережья о. Сахалин и животных, заведомо принадлежащих к чукотско-калифорнийской популяции, имеются достоверные различия в частоте встречаемости гаплотипов данного участка. Однако сам факт наличия у особи того или иного гаплотипа не позволял однозначно судить о ее популяционной принадлежности. Дальнейшее увеличение выборок не изменило принципиальным образом полученную ранее картину.

Мы проанализировали нуклеотидные последовательности как аналогичного участка (контрольный регион – «dloop», 555 п.н., дополненный последовательностью гена тРНК-пролина – «tRNA-Pro», 65 п.н.), так и белок-кодирующих участков мтДНК: гены цитохрома б («cytb», 1137 п.н.) и второй субъединицы НАДФ-дегидрогеназы («ND2», 1044 п.н.) Исследовали образцы кожи китов, добытых в рамках аборигенного промысла у берегов Чукотского п-ова (84 особи), а также образцы, собранные методом биопсии у особей, встреченных в 2010-2011 гг. у берегов Корякского побережья, восточного побережья Камчатки и о. Сахалин (16, 17 и 14 особей соответственно). Случаи повторного взятия биопсии от одной особи определяли анализом аллелей пяти микросателлитных локусов. Пол животных определяли методом ПЦР-диагностики: доля самцов во всех случаях составила 55-60%. Достоверных отличий в частоте встречаемости гаплотипов у разных полов не отмечено. Для 4 особей, встреченных у о. Сахалин, идентифицировать последовательность контрольного региона не удалось.

Медианная сеть гаплотипов фрагмента tRNA-Pro+dloop, 620 п.н. (рис. 1) в целом соответствует результатам, представленным в работе R. LeDuc с соавторами (2002) – варианты последовательностей образуют три группы, одна из которых представлена единственным гаплотипом «B», а две другие – значительным числом вариантов каждая. Последовательности, отмеченные нами у китов из района о. Сахалин и/или преобладающие у побережья Камчатки («A», «B» и «C»), присутствуют во всех трех группах.

R. LeDuc and co-authors (2002) collected biopsy skin samples from the gray whales encountered in the coastal waters off northeastern Sakhalin Island and the from the gray whales indubitably belonging to the California-Chukotka population. The analysis of a 523-base-pair fragment from the mtDNA control region in the biopsy samples showed that there were statistically significant differences in the frequency distributions of haplotypes between the Sakhalin and the California-Chukotka populations. However, the mere presence of a certain haplotype does not permit unambiguous assignment of the individual to any given population. Further increase in the number of samples did not lead to any fundamental changes in the picture that had been previously delineated.

We analysed nucleotide sequences in an analogous fragment (555 bp, control region (or D-loop), containing the sequence of proline tRNA gene – “tRNA-Pro”, 65 bp), and in protein coding regions of the mtDNA: cytochrome b (cyt b) genes (1137 bp) and the second subunit of NADH dehydrogenase (ND2, 1044 bp). We examined skin samples from whales taken by aboriginal hunters in the coastal waters of the Chukotka Peninsula (84 individuals) and skin biopsy samples from whales encountered in 2010-2011 off the Koryak coast, east coast of Kamchatka, and Sakhalin Island (16, 17, and 14 individuals, respectively). To exclude the repeated sampling of one individual, we analysed alleles at five microsatellite loci. We used PCR-diagnostics for sex determination: the proportion of males was 55-60% in all cases. There were no statistically significant differences in the frequency distributions of haplotypes between sexes. It was not possible to identify control region sequences for four whales encountered off Sakhalin Island.

In general, the median joining haplotype network for tRNA-Pro+dloop, 620 bp (Fig. 1) correlated with the findings presented in the research paper by R. LeDuc and co-authors (2002) – sequence variants are divided into three groups, one of them is represented only by the haplotype B, and each of two other groups are represented by a considerable number of variants. The sequences found by us in the whales encountered off Sakhalin Island and/or the whales that prevailed off the Kamchatka’s coast (A, B, and C) were present in all three groups.

Preprint

Рис. 1. Медианная сеть гаплотипов tRNA-Pro+dloop (620 п.н.). Обозначения гаплотипов по LeDuc et al., 2002 (соответствие по участку 523 п.н.). «AO», «AP», «AR», «AS», «AT», «AU», «AV», «AX» – варианты, не представленные в указанной работе. Минимальное расстояние между двумя соседними кружками соответствует одной нуклеотидной замене. «W'» («W-штрих») отличается от варианта «W» заменой в последовательности tRNA-Pro. Гаплотипы «B» и «E» отличаются по 15 позициям. Знаком "*" отмечены гаплотипы, встреченные у китов у о. Сахалин и/или преобладающие (более 20%) в выборке, собранной у побережья Камчатки.

Fig. 1. Median-Joining Network of tRNA-Pro+dloop (620 bp) haplotypes named accordingly to 523 bp fragment in LeDuc et al., 2002. "AO", "AP", "AR", "AS", "AT", "AU", "AV", "AX"– variants not presented in the cited article. Minimal distance between two nearest circles corresponds to one nucleotide substitution. W'" ("W-dash") differs from "W" by substitution in tRNA-Pro sequence. Haplotypes "B" and "E" differ by 15 sequence positions. Haplotypes found in whales near Sakhalin Isl. and/or predominate (>20%) in sample collected near Kamchatka coast are marked by "*".

Preprint

Медианная сеть двух объединенных белок-кодирующих участков (рис. 2) демонстрирует наличие в выборке только двух выраженных групп, одна из которых объединяет 14 из 15 отмеченных вариантов, дистанцированных друг от друга в среднем на 0,14% (3 мутационных события). Вторая группа представлена единственным вариантом, отличающимся от остальных в среднем на 0,63% и соответствующим особям с гаплотипом контрольного региона «B».

Из полученных данных следует, что проводимый до настоящего времени анализ только участка контрольного региона недостаточен для оценки пространственного распределения митохондриальных линий. Одни и те же гаплотипы этого участка, в частности доминирующие как у китов в историческом ареале охотско-корейской популяции, так и в обобщенных выборках («A», «C», «D»), могут в действительности принадлежать к различным вариантам митохондриального генома.

В то же время полученные данные не добавляют определенности в оценке принадлежности особей, встречаемых ныне у о. Сахалин и побережья Камчатки

The median joining haplotype network for two joined protein coding regions (Fig. 2) showed the division of samples only into two distinct groups. One of them included 14 out of 15 recorded variants that were separated by an average distance of 0.14% (3 mutations). The second group was represented by a single variant that differed from the others by an average of 0.63% and corresponded to the individuals with control region B haplotype.

Drawing the conclusion from the data obtained, we want to say that it is not sufficient to analyse the control region only (as is currently the case) in order to assess the spatial distribution of mitochondrial lines. The self-same haplotypes of this region (for example the haplotypes that are dominant in whales both from the historical range of the Okhotsk-Korean population and in generalized samplings – A, C, D) in reality can belong to different mitochondrial DNA variants.

At the same time, the findings did not add clarity to the issue whether the whales currently encountered off Sakhalin Island and off the Kamchatka's coast belong to one or different stocks. In our case, the whales en-

к одной или разным популяциям. В нашем случае киты, встреченные у берегов Сахалина и обладающие гаплотипами контрольного региона «А» и «С», принадлежат к тем же митохондриальным линиям, что и киты, доминирующие в составе выборки из окрестностей Чукотского п-ова (Табл.).

countered off Sakhalin's shores and having control region A and C haplotypes belong to the same mitochondrial lines as the whales whose samples represented the largest proportion among the whales encountered in the seas adjacent to the Chukotka Peninsula (Table).

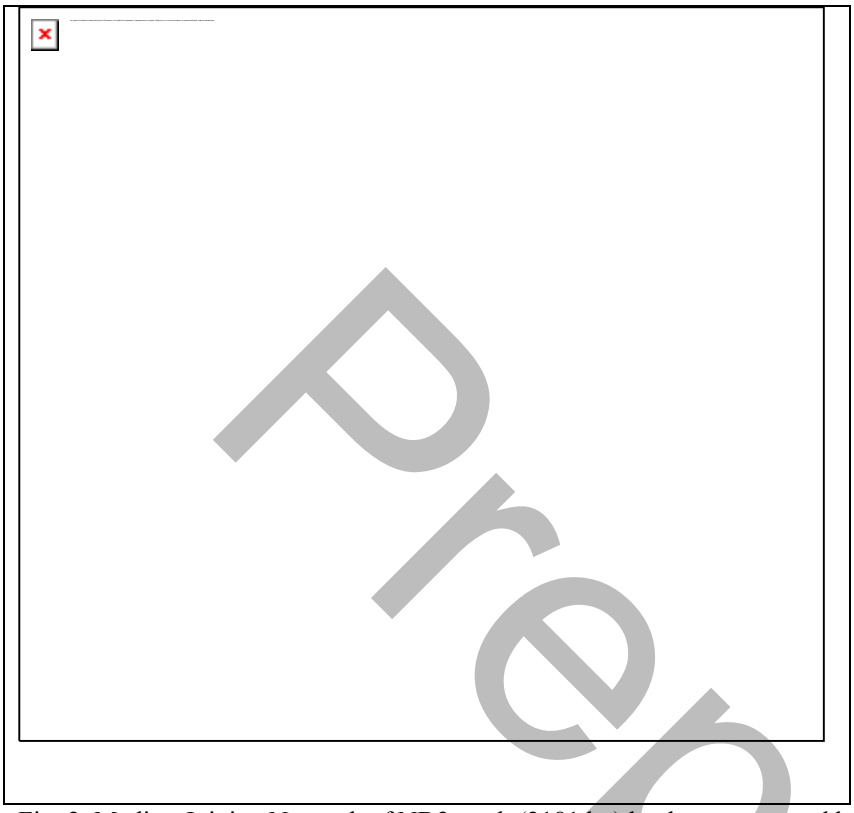

Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов ND2+cytb (2181 п.н., обозначены цифрами через дробь). Диаметр кружка пропорционален встречаемости гаплотипа в общей выборке. Мин. расстояние между двумя соседними кружками соответствует одной нуклеотидной замене. Гаплотип «2/2» отличается от «5/6» 12-ю заменами. Буквами обозначены гаплотипы tRNA-Pro+dloop (рис.1), встреченные в одном мт-геноме с соответствующим вариантом последовательности ND2+cytb. Знак "*" (здесь для объединенных последовательностей всех трех участков, 2802 пн) – варианты, встреченные у о. Сахалин и/или преобладающие у берегов Камчатки (рис. 1). Знак «*?» соответствует случаям неидентифицированных последовательностей участка tRNA-Pro+dloop у 4 особей из окрестностей о. Сахалин.

Fig. 2. Median-Joining Network of ND2+cytb (2181 bp) haplotypes, named by broken numbers. The circle diameter corresponds to number of haplotypes in a total sample. Minimal distance between two nearest circles corresponds to one nucleotide substitution. Haplotype "2/2" differs from "5/6" by 12 substitutions. tRNA-Pro+dloop haplotypes found in one mt-genome with the corresponding ND2+cytb sequence in are named by letters (see fig. 1). Variants (here – for combined sequences of all the three fragments, 2802 bp) found in whales near Sakhalin Isl. and/or predominate near Kamchatka coast (see fig. 1) are marked by "*". Unidentified sequences of tRNA-Pro+dloop fragment in four whales from Sakhalin Isl. are marked by "*?".

Индикатором принадлежности к иной (истинно охотско-корейской) популяции мог бы быть гаплотип, соответствующий варианту контрольного региона «В» (2/2_B), доминирующий у китов в водах Сахалина и Камчатки и редко встречающийся к северу от этих районов (Табл.). Однако и этот вариант может быть подвержен сомнению. Дистанцированность данной митохондриальной линии указывает на ее древнее, по самым скромным оценкам доголоценовое, происхождение – т.е. во времена, предшествовавшие разделению тихоокеанских серых китов на американскую и азиатскую популяции. Дальнейшие различия в частоте встречаемости этой линии по разные стороны океана могли определяться случайными причинами

A haplotype corresponding to the control region B variant (2/2_B) that is dominant in the whales encountered in the waters near Sakhalin and Kamchatka and rare north of these areas (Table) could be an indicator of belonging to a different (truly Okhotsk-Korean) population. However, this is also open to question. Remoteness of this mitochondrial line indicates its ancient origin – pre-Holocene, at the least estimate – i.e. the time period that preceded the separation of the Pacific gray whales into the American and Asian populations. Further differences in the frequency of occurrence of this line on both sides of ocean could have been due to chance

Preprint

(генетический дрейф). Установить эти различия уже вряд ли когда-либо удастся: образцов от китов, добытых в прошлом веке, не сохранилось, а обнаружение фоссильного материала в необходимом количестве представляется маловероятным.

causes (genetic drift). It is unlikely that these differences will ever be established: there are no samples from the whales harvested in the past century, and finding the adequate quantities of fossil material is hardly possible.

Табл. Гаплотипический (ND2+cytb + tRNA-Pro+dloop, 2802 п.н.) состав выборок серого кита из четырех регионов. n – число особей, H – индекс гаплотипического разнообразия, h – общее число гаплотипов, 2/2_B, 5/6_A, 7/6_C, 1/6_C, 8/6_C, 7/6_A – доля особей с данным гаплотипом в выборке.

Table. Haplotypic (ND2+cytb + tRNA-Pro+dloop, 2802 п.н.) composition of grawhale samples in four regions. n – sample size, H – haplotypic diversity, h – number of haplotypes, 2/2_B, 5/6_A, 7/6_C, 1/6_C, 8/6_C, 7/6_A – fraction of this haplotype in a sample.

Регион / *Region*	n	H	h	2/2_B	5/6_A	7/6_C	7/6_A	1/6_C and 8/6_C
Чукотка / *Chukotka*	84	0,971	41	2,4%	10,7%	3,6%	2,4%	4,8%
Корякия / *Koryak coast*	16	0,950	11	0	0	6,3%	0	6,3%
Камчатка / *Kamchatka*	17	0,875	9	29,4%	23,5%	5,9%	0	0
о. Сахалин / *Sakhalin Isl.*	10	0,511	3	70,0%	20,0%	10,0%	0	0

Кроме того, судя по совпадению коротких, около 300 п.н., участков контрольного региона (Goerlitz et al. 2003 – GenBank AY514484, AY514457), не исключено присутствие особей линии с гаплотипом «B» не только в водах Чукотского полуострова, но и непосредственно в местах размножения серых китов чукотско-калифорнийской популяции (лагуны Калифорнийского п-ова). Наконец, данные спутниковой телеметрии показали, что по крайней мере часть китов, встречаемых у побережья о. Сахалин, зимует в Калифорнии (Rozhnov et al. 2011). Таким образом, определение соотношения аборигенных особей и мигрантов в историческом ареале охотско-корейской популяции методами генетического анализа не дает оснований для однозначного заключения и не может быть определяющим при решении вопроса.

Besides, as judged by the overlap of the short fragments (about 300 bp) of control region (Goerlitz et al. 2003 – GenBank AY514484, AY514457), it is not excluded that haplotype B individuals are present not only in the waters off the Chukotka Peninsula, but also directly in breeding areas of the California-Chukotka gray whale population (lagoons of the California Peninsula). Finally, satellite telemetry data showed that at least some of the whales encountered off the Sakhalin's coast spend winter in California (Rozhnov et al. 2011). Thus, use of genetic analysis to determine the correlation between the indigenous whales and migrant whales that are present in the historical range of the Okhotsk-Korean population does not permit to draw an unambiguous conclusion and cannot be a determinant factor in solving this problem.

Авторы выражают благодарность А.М. Бурдину и В.В. Вертянкину за ряд предоставленных для анализа проб биопсии. Работа выполнена при финансовой поддержке Русского географического общества, сбор образцов – также при поддержке Национальной службы морского рыболовства США и гранта Международной китобойной комиссии.

Authors wish to express their gratitude to A.M. Burdin and V.V. Vertyankin who provided a number of biopsy samples. The research was supported by the Russian Geographical Society. The collection of samples was supported by the National Marine Fisheries Service and by the grant provided by the International Whaling Commission.

Draft

Список использованных источников / References

Берзин А.А., Кузмин А.А. 1975. Серые и гладкие киты Охотского моря. Сб. «Морские млекопитающие», Изд-во «Наукова думка», Киев, ч. 1: 30-32 [Berzin A.A., Kuzmin A.A. 1975. Gray and right whales of the Sea of Okhotsk. Pp. 30-32 in Marine mammals. Part. 2. Naukova Dumka, Kiev]

Берзин А.А. 1995. Серые киты охотско-корейской (западной) популяции. Тез докл. Международной конф. по изуч. и охране морских млекопит. Голицино, 11-12 окт., 1995, с. 12-13 [Berzin A.A. 1995. Gray whales of the western population. Pp. 12-13 in Abstracts of reports of the International conference on marine mammals

study and conservation. Golitsyno, Oct. 11-12, 1995]

Томилин А.Г. 1957. Звери СССР и прилегающих стран. Китообразные. М.: АН СССР, т. 9: 1-756 [Tomilin A.G. 1957. Mammals of the USSR and adjacent countries. Cetaceans. Moscow, AS USSR, vol. 9. 756 p.]

Goerlitz D.S., Urban,J. Rojas-Bracho L., Belson M., Schaeff C.M. 2003. Mitochondrial DNA variation among Eastern North Pacific gray whales (Eschrichtius robustus) on winter breeding grounds in Baja California. Can. J. Zool., 81(12): 1965-1972.

Ilyashenko V.Yu. 2011. Gray Whale re-inhabits former species area. Paper SC/63/BRG 24 presented to the International Whaling Commission Scientific Committee. P. 1-10.

LeDuc R.G., Weller D.W., Hyde J., Burdin A.M., Rosel P.E., Brownell (Jr) R.L., Würsig B., Dizon A.E. 2002. Genetic differences between western and eastern gray whales (Eschrichtius robustus). J. Cetacean Res. Manage. 4(1): 1-5.

Rozhnov V., Mate B., Bradford A., Vertyankin V., Tsidulko G., Irvine L., Hayslip C., Poltev Yu., Ilyashenko V., Tyurneva O. 2011. Preliminary results Research Program of the Okhotsk-Korean Gray Whale (Eschrichtius robustus) Population Habitat Using Satellite Telemetry. Paper SC/63/BRG26 presented to the International Whaling Commission Scientific Committee. P. 1-13.

Scammon C. 1869. The cetaceans of the western coast of North America. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 21: 40-49.

Мещерский И.Г.[1], Шпак О.В.[1], Глазов Д.М.[1], Литовка Д.И.[2], Борисова Е.А.[3], Языкова М.Г.[4], Рожнов В.В.[1]

Белуха (*Delphinapterus leucas*) в морях Дальнего Востока: состав и распределение митохондриальных линий

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

Meschersky I.G.[1], Shpak O.V.[1], Glazov D.M.[1], Litovka D.I.[2], Borisova E.A.[3], Yazykova M.G.[4], Rozhnov V.V.[1]

Beluga whale (Delphinapterus leucas) in Far Eastern seas: mtDNA lines assortment and distribution

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

Материалом для генетического исследования населения белух российского Дальнего Востока послужили образцы кожи, собранные методом биопсии, у мертвых животных или при живоотловах для научно-просветительских целей в Охотском море: в Сахалинском заливе («сахалино-амурское летнее скопление», 2004-2011 гг., n=136); в заливах Николая, Ульбанский, Тугурский и Удская губа («шантарское летнее скопление», 2008-2011 гг., n=189); у западного побережья Камчатки (устье р. Харюзово, 2010-2011, 35 особей) в Охотском море и в Анадырском лимане Берингова моря (2010-2011 гг., n=77). Для всех животных были определены нуклеотидные последовательности участка митохондриальной ДНК (мтДНК) общей длиной 559 п.н. (ген тРНК-пролина – 62 п.н. и контрольный

To conduct a genetic research of beluga whale population inhabiting Russian Far East, we took skin biopsy samples from Sea of Okhotsk beluga whales. The samples were taken from dead animals and from live animals, during live animal capture for educational and scientific purposes, in the following regions: the Sakhalin Gulf (Sakhalin-Amur summer aggregation, 2004-2011, n=136); gulfs of Nikolai, Ul'ban, Tugur, and Uda Bay (Shantar summer aggregation, 2008-2011, n=189); off the west coast of Kamchatka (the mouth of the Kharyuzovo River, 2010-2011, 35 individuals) in the Sea of Okhotsk, and in the Bering Sea (the Anadyr Liman, 2010-2011, n=77). Nucleotide sequences of the mitochondrial DNA (mtDNA), with a total length of 559 bp (proline tRNA gene – 62 bp, and

Preprint