

СТАТЬЯ ПО УПРАВЛЕНИЮ РЕСУРСОМ И ЕГО ОХРАНЕ

Определение репродуктивной истории особи по цементному веществу зубов у северных каланов

ВАНЕССА Р. ФОН БИЛА, *Факультет биологических наук, Анкориджского отделения Университета штата Аляска. Адрес: Department of Biological Sciences, University of Alaska Anchorage, 3211 Providence Drive, Anchorage, AK 99508, USA*

ДЖ. УОРД ТЕСТА, *Национальная лаборатория по изучению морских млекопитающих, Аляскинский центр рыбохозяйственных исследований, Факультет Биологических наук Университета штата Аляска. Адрес: University of Alaska Anchorage, 3211 Providence Drive, Anchorage, AK 99508, USA*

ВЕРЕНА А. ДЖИЛЛ, *Отделение морских млекопитающих Американской национальной службы охраны ресурсов рыб и дикой природы. Адрес: United States Fish and Wildlife Service, 1011 E Tudor Road, Anchorage, AK 99503, USA*

ДЖЕННИФЕР М. БЕРНС, *Факультет Биологических наук Университета штата Аляска. Адрес: University of Alaska Anchorage, 3211 Providence Drive, Anchorage, AK 99508, USA*

Перевод с английского МАРИНЫ БЭЛЛ, *г. Анкоридж, штат Аляска. Тел.: 1 (907) 562-6922. Адрес электронной почты: marina@ak.net*

АННОТАЦИЯ

Возраст первого репродуктивного цикла у млекопитающих плохо поддается определению, поскольку большинство наиболее распространенных методов требуют проведения либо прямых наблюдений, либо анализа репродуктивного тракта. Однако исследования ряда видов крупных млекопитающих дают основания предположить, что начало репродуктивной активности у самок сопровождается сокращением ширины светлых полос цемента зубов, а значит, что зубы могут использоваться в качестве средства определения возраста первого репродуктивного цикла (ВПРЦ). Для выяснения того, можно ли по ширине светлой полосы цемента рассчитать ВПРЦ у северных каланов (*Enhydra lutris kenyoni*), мы проводили замеры ширины светлой полосы цемента на срезах малых коренных зубов и сравнивали результаты с данными исследования репродуктивных трактов. Самки каланов классифицировались как рожавшие, если ширина хотя бы одной из полос светлого цемента их зубов была меньше пороговой величины. В качестве пороговой выбиралась величина, при которой вероятность ошибки была минимальной. При пороговой величине равной 0,32, мы верно классифицировали 83% анализируемых самок ($n = 92$) в сравнении с результатами оценки по анализу репродуктивных трактов, а определенный по зубам ВПРЦ ($3,52 \pm 0,032$ года) не отличался от результата, полученного путем анализа репродуктивных трактов ($3,45 \pm 0,031$ года; t -тест, $P > 0,05$). Полученные данные говорят в пользу использования цемента как индикатора наличия прошлых репродуктивных циклов в самок каланов, которые можно далее использовать для расчета среднего возраста первого репродуктивного цикла. Поскольку сокращение ширины полос цемента описываются также у других видов млекопитающих, к ним также можно применить данный количественный метод исследования. (ЖУРНАЛ ОХРАНЫ И УПРАВЛЕНИЯ РЕСУРСАМИ ДИКОЙ ПРИРОДЫ 72(3):618–624; 2008 г.)

Индивидуальная приспособленность животного формируется под прямым воздействием факторов окружающей среды, таких как: плотность расселения, наличие хищников и питание – оказывающих воздействие на накопление организмом животного нетто-энергии (Стирнс, 1976). Согласно теории жизненных циклов, для оптимизации индивидуальной приспособленности и выживаемости организма, животные должны регулировать количество энергии, выделяемой на воспроизводство. Например, в популяциях с высокой плотностью и ограниченным количеством ресурсов оптимизация индивидуальной приспособленности может достигаться за счет повышения индивидуального возраста первого репродуктивного цикла (и-ВПРЦ) животного, если это значительно повышает его выживаемость (Бенгтсон и Лос, 1985; Скогланд, 1985; Шокно, 1991; Феста-Бианчет и др., 1995). Точно также, когда происходит сокращение популяции, вызванное процессами идущими «снизу-вверх», например ограниченностью пищевых ресурсов, среднее значение ВПРЦ (с-ВПРЦ – среднее значение всех и-ВПРЦ данной популяции) для конкретной популяции возрастает, даже если не у всех особей изменяется индивидуальный ВПРЦ (Стирнс, 1976; МакМагон, и др., 2003). И наоборот, если сокращение численности популяции обусловлено факторами, действующими «сверху-вниз», например, обилием хищников при изобилии прочих ресурсов, то значение с-ВПРЦ будет иметь тенденцию к уменьшению, поскольку большее количество самок начнет приносить потомство в более раннем возрасте (Дзиковский и др., 2004). Следовательно, изменения в значениях как и-ВПРЦ, так и с-ВПРЦ могут помочь нам понять причины снижения численности популяции (Эберхарт и Синифф, 1977; Бенгтсон и Лос, 1985). К сожалению, поскольку для определения среднего ВПРЦ для той или иной популяции необходимо знать и-ВПРЦ самок определенного возраста, этот показатель определяется весьма редко (Бонес и Джеймс, 1979; Клаттон-Брок, 1988; Теста и др., 1990; Ле Беф и Рейтер, 1991). У крупных млекопитающих и-ВПРЦ определяется при помощи долгосрочных программ мечения и повторного отлова, или мониторинга, которые требуют больших затрат времени и денег, а также являются организационно сложными в связи с долговременным характером их осуществления (Теста и др., 1990; Синифф и Ролс, 1991; Монсон и др., 2000; Писториус и др., 2001). Особую сложность представляет проведение таких исследований на видах или популяциях, характеризующихся большим расходом меток, значительной мобильностью, либо низкой привязанностью к району обитания. Альтернативным методом оценки и-ВПРЦ является исследование репродуктивных трактов, в которых присутствуют индикаторы текущей и прошлых беременностей: желтые (ЖТ) и беловатые (БТ) тела (Бодкин и др., 1993; Стирлинг, 2005). Если известно минимальное время, в течение которого БТ продолжают сохраняться в яичнике и минимальный возраст возможного наступления первой овуляции, то можно рассчитать и-ВПРЦ, используя значение возраста особи и количества индикаторов прошлых репродуктивных циклов путем обратного расчета. При таком методе общее количество ЖТ и БТ вычитается из возраста особи для получения значения и-ВПРЦ при условии, что возраст самки меньше или равен сумме минимального возраста и-ВПРЦ и минимального срока сохранения БТ в яичнике (Бенгтсон и Синифф, 1981). Однако этот метод не может быть использован для расчета и-ВПРЦ, если один из показателей неизвестен или подвержен значительным колебаниям.

Однако если использовать яйчники только с целью выявления наличия у животного прошлых беременностей на момент взятия пробы (о чем свидетельствует присутствие БТ), то условия становятся не столь строгими. Тогда можно определить пропорцию рожавших самок в каждом возрастном классе и подсчитать с-ВПРЦ популяции по методу ДеМастера (1978). Однако, для использования такой методики необходим значительный размер выборки в различных возрастных классах, примерно не менее 25 самок каждого класса, начиная с самого молодого возраста, когда самка может быть способна к воспроизводству до возраста, когда все самки начинают рожать (ДеМастер, 1978). Несмотря на то, что анализ половых органов достаточно дешев и быстр в применении, он ведет к уничтожению животного, а, следовательно, делает сбор данных сложным или просто невозможным в связи с соображениями охраны ресурса.

При использовании репродуктивного тракта для определения и-ВПРЦ или с-ВПРЦ исследователю необходимо знать возраст особи. У млекопитающих возраст легко определяется по годовым слоям цементного вещества зубов, так как чередующиеся темные и светлые слои легко различимы в проходящем свете (при условии, что зуб не подвергался чрезмерным механическим нагрузкам). Каждый год корень зуба под десной обрастает по периметру светлым и темным годовыми слоями цемента. У животных средних широт светлая полоса формируется в период с конца весны до начала осени, то есть, период наиболее интенсивного роста, а темная полоса – с поздней осени до ранней весны, когда рост замедляется (Клевезаль и Клайнбергер, 1969). Светлые и темные годовые слои цемента не подлежат резорбции в отличие от костной ткани, а их размеры не ограничиваются объемом пульповой полости зуба в отличие от дентина. Кроме того в научной практике уже широко распространен сбор проб зубов у отлавливаемых животных (Клевезаль, Клайнбергер, 1969; Клевезаль, 1996; Стюарт и др., 1996; Бодкин и др., 1997). Таким образом, количество годовых слоев может служить показателем возраста животного, а ширина светлых слоев отражать внутренние и внешние факторы, которые оказывали воздействие на сезонную скорость их роста. Еще одной общей характеристикой зубов многих млекопитающих является сокращение ширины светлой полосы годового слоя цемента по мере увеличения возраста животного (Клевезаль и Клайнбергер, 1969; Крейгхед и др., 1970; Бенгтсон и Синифф, 1981; Клевезаль и Стюарт, 1994), что ученые обычно связывают либо с половым созреванием (и-ВПС, возраст, в котором самка может забеременеть) либо с началом репродуктивной активности самок (и-ВПРЦ; Кой и Гаршеллис, 1992; Клевезаль, 1996). А это означает, что изменения в ширине светлой полосы могут дать нам альтернативный метод определения репродуктивного статуса особи. Более того, ученые уже продемонстрировали, связь возраста, при котором происходит сокращение ширины светлой полосы (определяемое визуально) с и-ВПРЦ или и-ВПС (определявшегося при помощи анализа половых путей или посредством метода мечения и повторного отлова) у таких видов, как колчатая нерпа (*Phoca hispida*), серый тюлень (*Halichoerus grypus*), тюлень-крабод (Lobodon carcinophagus) и северный морской слон (*Mirounga angustirostris*) (Содерберг, 1978; Бенгстон и Синифф, 1981; Клевезаль и Стюарт, 1994). Кроме того, Кой и Гаршеллис

(1992) отследили формирование узких светлых полос цемента в период вынашивания и выкармливания детенышей у черных медведей (*Ursus americanus*). Правда, Бейкеру и Бовенгу (1997) не удалось выявить наличия четкой связи между и-ВПРЦ и уменьшением ширины светлой полосы зубного цемента у обыкновенных тюленей (*Phoca vitulina*). Аналогичные сокращения ширины светлой полосы зубного цемента, возможно, наблюдаются и у самцов, но этот вопрос учеными не изучался, так как динамика развития популяции гораздо больше зависит от репродуктивных параметров самок, нежели самцов.

Несмотря на то, что показатели ширины цементных полос не являются надежным средством определения и-ВПРЦ для всех животных, изменение ширины светлой полосы можно использовать для определения того, рожала данная самка или нет. А если это так, то при помощи анализа цемента можно получить данные, необходимые для оценки с-ВПРЦ популяции, по описанной выше расчетной модели ДеМастера (1978). В связи с недавним падением численности популяций северных каланов (*Enhydra lutris kenyoni*) в юго-восточных районах Аляски, ученые активизировали поиски новых методов оценки параметров биологических циклов, оказывающих влияние на динамику популяции. Поскольку каланы могут приносить потомство более одного раза в год, а также, поскольку ученым не известен минимальный срок, в течение которого в яйцниках просматриваются овариальные структуры, у нас не было возможности использовать метод обратного отсчета для получения значения и-ВПРЦ по репродуктивным трактам для сравнения этих данных с данными исследования цемента (Бодкин и др., 1993). Вместо этого мы проверили возможность использования анализа светлой полосы цемента у северных каланов в качестве индикатора прошлого участия обследуемой особи в размножении.

РАЙОН ИССЛЕДОВАНИЙ

Были собраны образцы репродуктивных трактов и малых коренных зубов, взятых у 92 самок северного калана в возрасте от 2 до 14 лет в период с 1989 по 2005 год. Северный калан представляет собой подвид калана, распространенный по территории от Алеутских островов (юго-восточная Аляска) до штата Орегон, США (Вилсон и др., 1991). Образцы собирались из трех источников, каковыми служили: трупы, собранные после разлива нефти в связи с катастрофой танкера «Эксон-Валдиз» в 1989 году (Американская геологическая служба [USGS] и Служба охраны ресурсов рыб и дикой природы США [USFWS] n=42); выброшенные на берег трупы погибших животных, собранные в период с 1994 по 2005 годы на Аляске (n=17) и в России (n=4; USFWS), а также каланы, добытые коренными жителями Аляски в рамках традиционного природопользования (Аляскинская комиссия по калану и сивучу и USFWS; n=29). Все образцы собирались с соблюдением всех правил, установленных USFWS.

МЕТОДИКА

Анализ возраста и ширины цемента

По каждой самке калана анализировалось два продольных срединно-сагиттальных среза декальцинированного премоляра. Во всех анализах использовался первый из присутствующих малых коренных зубов (в данном случае, второй премоляр, поскольку у данного вида первый премоляр отсутствует), но позиция зуба (верхний или нижний) не указывалась. Все слайды готовились в Лабораториях Мэтсона (Миллтаун, штат Монтана, США), а возраст особей, у которых брались пробы, определялся в соответствии с методикой, описанной у Бодкина и др. (1977). Мы приняли полученные лабораториями данные по возрасту, не пытаясь их перепроверить, так во всех перечисленных выше предыдущих исследованиях возраст каланов определялся указанными лабораториями, и для обеспечения единообразия данных, все анализы по определению возраста проводились лично Г. Мэтсоном (Г. Мэтсон, устное сообщение). Для сокращения количества возможных ошибок в определении возраста, мы использовали только данные с кодом достоверности возраста А или Б (значение потенциальной погрешности соответственно ± 0 год и ± 1 год для каланов в возрасте от 0 до 7 лет (Г. Мэтсон, устное сообщение). После окраски и определения возраста мы рассмотрели срезы зубов под микроскопом со стократным увеличением «Nikon Eclipse E400» и сделали снимки при помощи цифровой фотокамеры «MicroPublisher 3.3» (производства «QImaging», Британская Колумбия, Канада). Ширина светлой полосы измерялась от центра до центра прилегающих темных слоев на цифровых снимках (Рис. 1) при помощи компьютерной программы «MetaVue- 6.1» (производства фирмы «Molecular Devices», г. Саннивейл, штат Калифорния). По каждому калану мы измеряли светлую полосу цемента в 3х различных точках, которые выбирались в зависимости от четкости изображения цемента, на обоих срезах зуба, то есть всего делалось шесть замеров светлой полосы. Измерялись только полностью сформировавшиеся светлые полосы (широкие светлые полосы, ограниченные с обеих сторон узкими темными слоями), поскольку считалось, что ширина последней «незавершенной» светлой полосы, вероятно, будет неточной в связи со смертью животного.

Рисунок 1. Годовые слои цемента малого коренного зуба девятилетней самки калана (образец № 480001), добытой на Аляске, США в 2005 г. Мы провели замеры в трех местах на каждом из двух срезов зуба.

Ширина конкретных светлых полос стандартизировалась ($a_{i,n}$, где i = место замера, а n = номер светлой полосы) по самой широкой полоске в каждом месте замера ($a_{i,n}/a_{i,L}$ где L = самой широкой светлой полосе), поскольку наросты светлого цемента обычно толще ближе к концу корня, а также поскольку общая толщина с возрастом увеличивается, тогда как толщина светлого слоя с возрастом сокращается (Крейгхед и др., 1970). Было проведено сравнение стандартизированных замеров цемента для каждой светлой полосы по срезам зубов и по местам замера с использованием вариационного анализа повторных изменений для того, чтобы убедиться в отсутствии значительных расхождений

между замерами в зависимости от места замера или выбранного среза. Поскольку никаких значительных расхождений обнаружено не было ($P > 0.05$), мы рассчитали среднее значение стандартизированных замеров для каждой светлой полосы, получив по одной последовательности средних стандартизированных замеров ширины светлых полос для каждой самки калана. Затем мы выбрали самую узкую светлую полосу (\bar{a}_{\min}) по каждому калану для использования в последующих анализах, при условии, что эта полоса не была первой по счету ($n=3$). Если самая узкая полоса оказывалась первой, мы использовали для анализов в качестве \bar{a}_{\min} следующую наиболее узкую полосу, поскольку каланы не размножаются на первом году жизни (Кеньон, 1969; Бодкин и др., 1993). У небольшого количества особей первая светлая полоса оказывалась самой узкой, скорее всего, потому, что данные особи поздно вывелись, и у них было недостаточно времени на рост светлого цемента до наступления зимы, когда началось нарастание более темного цемента.

Рисунок 2. Графическое изображение временной последовательности по замерам светлых полос цемента и анализу репродуктивного тракта применительно к каланам собранным на Аляске, США, в 1989 – 2005 годах. Пунктирными линиями обозначены зубы конкретных особей. Черные черточки обозначают темные годовые полосы цемента. Пространство между ними обозначает светлую полосу данного года X_i где i = год жизни. Над пунктирными линиями приведены четыре возможных результата анализа репродуктивного тракта, где беловатые тела (СА) являются индикатором наличия прошлых беременностей, а желтые тела – (CL) указывают на текущую беременность. Многоточие с любой стороны данной строки указывает, что в год роста данного слоя могло сформироваться СА или CL. Справа от пунктирных линий указан репродуктивный статус и возраст особи, который был использован при анализе среднего возраста первого репродуктивного цикла данной возрастной группы (с-ВПРЦ_{репр.тр}).

Анализ репродуктивных трактов

Репродуктивные тракты каланов либо немедленно фиксировались в 10% нейтральном буферном растворе формалина, либо замораживались при температуре -20 градусов Цельсия, с последующим размораживанием и фиксацией по мере получения формалина. Все образцы находились в растворе формалина на протяжении ≥ 1 месяца до начала проведения анализов. Для определения общего количества ЖТ и БТ мы вырезали из репродуктивного тракта яичники, делали срезы толщиной 1-2 мм (вручную) и изучали их невооруженным глазом (Синха и др., 1966; Бодкин и др. 1993). По каждой особи записывался возраст и количество ЖТ и БТ. Если анализ репродуктивного тракта давал неправдоподобные результаты (например: репродуцирующая годовалая самка), мы удаляли эти образцы из всех анализов ($n = 2$). Для сравнения данных исследования репродуктивных трактов с изменениями в ширине цементных полос, необходимо учитывать, что каждая из анализируемых тканей дает картину несколько разных по срокам периодов в жизни конкретной самки калана. Репродуктивный тракт отражает информацию по беременностям самки до момента ее смерти, тогда как замеры цемента зуба отражают информацию только до конца зимы года, в течение которого наступила смерть животного, поскольку замерялись только полностью

сформировавшиеся полосы (Бодкин и др., 1997). Поэтому с целью стандартизации временных сравнений мы использовали только данные о прошлых беременностях, представленные в репродуктивном тракте беловатыми телами (БТ). В результате, полученные сравнения не отражали информации по репродуктивному циклу года, когда проводился сбор образцов. Например, при проведении анализа мы считали пятилетнюю самку, которая была беременной в момент взятия образца (ЖТ в репродуктивном тракте), но не имела признаков прошлых беременностей (нет БТ), нерожавшей четырехлетней самкой (Рис. 2). После принятия таких поправок к данным репродуктивного тракта мы определили процент рожавших самок в каждой возрастной группе (по наличию беловатых тел) от одного до семи лет. Затем мы взяли долю рожавших самок в каждой возрастной категории и рассчитали с-ВПРЦ (с-ВПРЦ_{репр.тр}) по методу ДеМастера (1978). Несмотря на то, что каланы не приносят потомства на первом году жизни, включение годовалых самок в расчеты улучшает качество значения с-ВПРЦ и сокращает расхождение в результатах. Все протоколы анализов утверждены Комиссией по охране и использованию животных Университета штата Аляска (IACUC No. 2006burns8).

Рисунок 3. Процент самок, верно классифицированных как рожавшие или нерожавшие (левая ось ординат), а также процент ложноположительных и ложноотрицательных результатов (правая ось ординат) для каждой возможной пороговой величины \bar{a}_{min} , определявшейся с интервалом 0,01 для образцов собранных у северных каланов Аляски в 1989 – 2005 годах.

Анализ данных

Мы оценили целесообразность использования \bar{a}_{min} в качестве адекватного индикатора репродуктивного статуса (рожавшая или нерожавшая самка) двумя способами. В первом случае мы сравнивали результаты \bar{a}_{min} непосредственно с результатами анализа репродуктивного тракта безотносительно возраста. Целью первого сравнения было определение пороговой величины \bar{a}_{min} , при котором самка калана четко попадала бы в правильную репродуктивную категорию: нерожавшая ($\bar{a}_{min} > \text{пороговой величины}$) или рожавшая ($\bar{a}_{min} \leq \text{пороговой величины}$), в соответствии с результатами анализа репродуктивного тракта. Мы проанализировали все возможные варианты пороговой величины \bar{a}_{min} (от 0.01 до 1.00), при этом оптимальным считалась такая пороговая величина, при которой максимально сокращалось количество как ложноположительных ($\bar{a}_{min} \leq \text{пороговой величины}$, но результаты анализа репродуктивного тракта не подтверждают наличия прошлых беременностей), так и ложноотрицательных ($\bar{a}_{min} > \text{пороговой величины}$, но результаты анализа репродуктивного тракта указывают на наличие в прошлом репродуктивных событий) результатов определения класса принадлежности особей (рожавшие или нерожавшие). Мы максимально сократили количество ошибочных результатов по репродуктивным классам таким образом, чтобы процент рожавших самок в выборке не оказывал влияния на пороговую величину.

Для изучения вариативности оптимальной пороговой величины, которой следовало ожидать при анализе светлых полос зубного цемента, мы применили метод

бутстрепа, получив 1000 реплик оптимального порогового значения выше описанным способом (Эфрон, 1982). Если бутстреп-реплика выдавала множественные значения оптимальной пороговой величины (например, если \bar{a}_{\min} от 0,33 и 0,34 давало одинаковые результаты), мы брали среднее значение реплики ($\bar{a}_{\min} = 0,335$).

Рисунок 4. Распределение оптимальных \bar{a}_{\min} значений, полученное в результате бутстреп-анализа набора данных образцов 92 самок северных каланов, собранных на Аляске, США, в 1989 – 2005 годах. Средняя оптимальная пороговая величина составила $0,32 \pm 0,024$ (средняя величина \pm стандартное отклонение)

После того, как мы выбрали оптимальную пороговую величины \bar{a}_{\min} по среднему значению бутстреп-реплик, мы применили ее для разделения всех анализируемых самок на рожавших и нерожавших. Затем мы взяли процент репродуктивных самок по каждой возрастной группе и с его помощью рассчитали с-ВПРЦ_{зубы} таким же способом, как мы рассчитывали с-ВПРЦ_{репр.тр} (ДеМастер, 1978). Для отчета были взяты средние значения \pm стандартное отклонение. Затем мы сравнили два полученных значения с-ВПРЦ при помощи модифицированного *t*-теста (ДеМастер, 1978). Кроме того, при помощи уравнения №9 в методике ДеМастера мы рассчитали ожидаемую определяемую разницу между с-ВПРЦ_{зубы} и с-ВПРЦ_{репр.тр}.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы определили, что оптимальная пороговая величина \bar{a}_{\min} составляет 0,32 самой широкой светлой полосы (Рис. 3). Используя эту оптимальную пороговую величину, мы верно классифицировали 83% образцов как относящихся к рожавшим или нерожавшим самкам. Количество ложноположительных результатов составило 7,6% (мы ошибочно признали 18% из 39 нерожавших самок рожавшими), а количество ложноотрицательных результатов составило 10% (17% из 53 рожавших самок были признаны нерожавшими). Ни ложноположительные, ни ложноотрицательные результаты не концентрировались вокруг пороговой величины \bar{a}_{\min} , напротив ошибки распределялись по всему спектру возможных значений пороговой величины. Однако по результатам 1000 бутстреп-реплик, мы получили достаточно узкий диапазон значений пороговой величины: $0,32 \pm 0,024$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) (Рис. 4).

Применив значение пороговой величины (среднее значение, рассчитанное в результате бутстреп-анализа реплик) к каждому из образцов, мы рассчитали, что с-ВПРЦ_{зубы} равняется $3,51 \pm 0,032$ ($\bar{x} \pm \text{CO}$) лет, в то время как по результатам анализа репродуктивных трактов значение с-ВПРЦ_{репр.тр} составило $3,45 \pm 0,031$ лет. Таким образом, с-ВПРЦ_{зубы} не отличался от с-ВПРЦ_{репр.тр} ($t_{81} = 1,43$, $P > 0,05$), а расчетная определяемая разница между средними значениями равнялась 0,77 лет. Почти 90% образцов соответствовали критическому возрастному диапазону (то есть диапазону возрастов, начинающемуся с последнего возраста, при котором ни одна из самок не была рожавшей, и кончающемуся первым возрастом, при котором все самки

оказывались рожавшими, в нашем исследовании от 1 до 7 лет) для определения с-ВПРЦ.

ДИСКУССИЯ

Мы избрали количественный подход к оценке светлых полос зубного цемента в качестве индикатора прошлых беременностей и обнаружили, что сокращение ширины светлых полос в годовых слоях зубного цемента может служить индикаторам наличия прошлых репродуктивных событий у самок северных каланов. Выбрав соответствующее пороговое значение ширины светлой полосы зубного цемента, мы смогли правильно определить репродуктивный статус большинства самок, разделив их на рожавших и нерожавших, что позволило нам рассчитать при помощи полученных при анализе зубов данных значение с-ВПРЦ, не отличавшееся от результатов расчета данной величины при помощи анализа репродуктивных трактов. Скорее всего, успех наших расчетов, объясняется применением двух инновационных приемов: использованием количественных, а не качественных статистических измерений цемента, и использованием ширины светлой полосы цемента для определения репродуктивного статуса, а не и-ВПРЦ или половой зрелости.

В предыдущих исследованиях, соотносящих ширину полосы цемента с репродуктивными событиями, возраст животного, при котором наступало сужение светлой полосы цемента, определялся исследователем визуально. Такой метод является субъективным и несет в себе большой потенциал получения ошибочных результатов при исследовании зубов, взятых у животных, приближающихся к возрасту, когда расстояние между годовыми слоями цемента начинает сокращаться (Бенгтсон и Лос, 1985; Бейкер и Бовенг, 1997). В настоящем исследовании мы использовали количественные измерения для определения наличия и степени изменения ширины светлой полосы цемента с переходом самки в активный репродуктивный статус (рожавших самок). Кроме того, поскольку мы не получили значительных расхождений между значениями ширины светлой полосы в зависимости от места замера и среза зуба, мы делали замеры светлой полосы цемента в наиболее четком месте слайда.

Другим преимуществом нашего исследования был тот факт, что мы использовали данные по сокращению ширины светлой полосы зубного цемента для определения только репродуктивного статуса особей (как рожавших или нерожавших), а не для определения индивидуального возраста первого репродуктивного цикла. Такое условие было необходимо потому, что у нас не имеется информации о количестве беременностей в год и продолжительности сохранения в половом тракте яичниковых структур у самок каланов. А следовательно, нам не удалось бы определить необходимую для проведения сравнения величину и-ВПРЦ_{репр.тр.}. Но даже если бы у нас была возможность определения и-ВПРЦ_{репр.тр.}, оценка и-ВПРЦ_{зубы} все равно могла бы привести к возникновению дополнительных источников ошибок, поскольку можно было бы предположить, что самая узкая

светлая полоса отражает и-ВПРЦ_{зубы}, а это не обязательно соответствует действительности.

Одна из сложностей определения и-ВПРЦ по светлым полосам годовых слоев цемента состоит в том, что нам не известны конкретные причины сокращения их ширины. Хотя многие ученые утверждают, что сокращение ширины светлой полосы цементного слоя объясняется перераспределением энергии в организме животного с роста на обеспечение беременности и вскармливания, другие ученые считают, что изменения ширины происходят за счет эндокринных сдвигов, происходящих в период полового созревания, которое наступает раньше первой беременности (Клевезаль и Майрик, 1984; Кой и Гаршеллис, 1992; Клевезаль, 1996). Интересно отметить, что ежегодные увеличения размеров отолитов (ушных косточек) у рыб, сходные с увеличением размеров цементных полос у млекопитающих, часто оказываются прямо пропорциональными соматическому росту (Фрэнсис, 1990). У каланов ширина светлых полос сокращается, скорее всего, из-за перераспределения энергии в конце периода беременности и в период вскармливания, но нельзя исключать и гормональных воздействий. Однако, за счет рассмотрения того, достаточно ли уменьшилась ширина светлой полосы, чтобы указывать на наличие в прошлом репродуктивного события, мы смогли значительно сократить возможность ошибок.

Использование только данных по уменьшению ширины светлой полосы цемента позволило верно классифицировать 83% образцов, равномерно распределить ошибки в классификации между обоими репродуктивными классами и разнести погрешности по возможным пороговым значениям, что указывает на то, что ошибки в классификации возникают не только в связи с выбором \bar{a}_{\min} , но вместо этого могут быть связаны с ошибками в замерах ширины светлой полосы, оценке возраста или в анализе репродуктивного тракта. Погрешности в определении возраста или замерах светлой полосы могут возникать в связи с наличием сложных или нечетких годовых слоев, но проведение нескольких замеров по двум срезам зуба значительно сокращают вероятность возникновения таких погрешностей. Однако нам не удалось ни выделить, ни количественно выразить погрешность за счет определения возраста или репродуктивного статуса. Мы также могли неверно классифицировать отдельных особей, если им удавалось сохранить ширину светлой полосы без изменения во время беременности за счет наличия обильных пищевых ресурсов (ложноотрицательные результаты), или если в связи с недостатком пищи сокращалась ширина светлых полос у нерожавших самок (ложноположительные результаты), но мы не можем оценить распространенность этого источника ошибок. Учитывая широкое разнообразие природных условий обитания использованных в исследовании животных в связи с различием мест и времени сбора образцов, низкий уровень погрешности в наших исследованиях дает нам основание предположить, что изменения в ширине светлой полосы, связанные с беременностью самки, являются более значительными, чем изменения, вызванные только условиями окружающей среды. Кроме того, за счет стандартизации измерений относительно наиболее широкой светлой полосы, мы заложили в наше исследование возможность определения пропорциональных

изменений в ширине светлой полосы для конкретной особи. Таким образом, у нерожавшей самки, у которой в связи с неблагоприятными условиями нарастание светлой полосы цемента было замедленным на протяжении всей ее жизни (что должно выражаться в наличии последовательности узких полос) не появится пропорционального сокращения ширины светлой полосы, необходимого для перевода ее в статус рожавшей. Наконец, если в процессе анализа репродуктивного тракта мы не заметили наличия БТ, мы могли ошибочно классифицировать самку, как нерожавшую, и наоборот, обнаружение БТ, не приведшего к успешному развитию беременности или сокращению в ширине светлой полосы, могло дать ложноотрицательные результаты. Ни один из перечисленных источников ошибок не является присущим только нашему исследованию. Все они характерны для анализов данных репродуктивного тракта.

Еще одним аргументом в поддержку использования наименьшего значения ширины светлой полосы цементного слоя (\bar{a}_{\min}) в качестве надежного индикатора наличия репродуктивного события в жизни особи, является результат бутстреп-анализа. Мы не только получили узкий диапазон оптимальных \bar{a}_{\min} по бутстреп-репликам, при этом среднее значение бутстреп-реплик было идентичным среднему значению определенному нами для изначального образца. Соответствие среднего значения бутстреп-реплик оптимальной пороговой величине, говорит в пользу использования данной пороговой величины при определении репродуктивного статуса самок калана в дальнейших исследованиях. Несмотря на то, что для нашего исследования это не принципиально, поскольку у нас оптимальная пороговая величина и среднее значение, полученное в результате бутстреп-анализа, были одинаковыми, в качестве пороговой величины для будущих исследований необходимо выбирать бутстреп-результат величины, поскольку здесь учитывается серия возможных образцов, которые можно собрать по данному виду, а не только по одной конкретной группе особей.

После того, как было получено оптимальное пороговое значение для классификации всех самок по категориям рожавших или нерожавших, мы рассчитали с-ВПРЦ на основании только данных исследования зубов. Поскольку выбранная пороговая величина была надежной, а ошибки распределялись по всем возрастным группам, не удивительно, что полученное значение с-ВПРЦ_{зубы} не отличалось от величины, рассчитанной по данным анализа репродуктивных трактов (с-ВПРЦ_{репр.тр}). Поскольку при малых объемах выборки расчеты с-ВПРЦ очень чувствительны к небольшим изменениям в количестве рожавших самок в каждой возрастной группе, обнаруженное нами отсутствие разницы в результатах между двумя методами, несмотря на размеры выборки, является еще одним индикатором надежности «цементного» метода. И, тем не менее, перед тем, как применять этот метод, исследователям нужно тщательно определить размеры выборки и распределения по возрастным группам.

ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ РЕСУРСОМ

Ученые уже давно признают ценность мониторинга изменений в с-ВПРЦ у долгоживущих млекопитающих для понимания динамики изменений и здоровья популяций (Эберхарт и Синифф, 1977). Мы продемонстрировали возможность использования анализа светлых полос годовых отложений цемента малых коренных зубов для определения среднего возраста первого репродуктивного цикла у каланов. Анализ цемента является неразрушающим и рентабельным, а поскольку замеры могут проводиться на тех же срезах зубов, которые использовались для анализа возраста, это позволяет ученым определять с-ВПРЦ по архивным образцам. Следовательно, такой подход может обеспечить ученым и природоохранным организациям эффективный метод мониторинга изменений с-ВПРЦ у широкого диапазона видов диких животных. Сегодня измерения цементных слоев дают ученым средство определения с-ВПРЦ у каланов и других диких млекопитающих, когда использование исследования репродуктивных трактов или других методов не представляется возможным. Применение данного метода в изучении фенотипической пластичности с-ВПРЦ у северных каланов из сокращающихся и стабильных популяций, будет описано в отдельной статье (см. также Фон Била, 2007).

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проводилось при поддержке Национальной администрации по исследованиям океана и атмосферы и Северотихоокеанского университетского консорциума по исследованиям морских млекопитающих. Наши исследования были бы невозможными без использования образцов, собранных Геологической службой США, Национальной службой охраны ресурсов рыб и дикой природы, Аляскинской сетью по сбору выброшенных на берег животных и традиционными охотниками из числа коренного населения, участвующими в работе Аляскинской комиссии по северным каланам и сивучам. Мы также хотели бы поблагодарить таких ученых как: Дж. Бодкин, Д. Хэддикс, Дж. Хаас, Д. Пфайфер и Дж. Пруитт – за помощь в сборе образцов и обзоре монографии. Большую работу по редактированию текста провели Г. Мэтсон и редактор, не назвавший своего имени.

Evaluating Cementum to Determine Past Reproduction in Northern Sea Otters

VANESSA R. VON BIELA,¹ Department of Biological Sciences, University of Alaska Anchorage, 3211 Providence Drive, Anchorage, AK 99508, USA

J. WARD TESTA, National Marine Mammal Laboratory, Alaska Fisheries Science Center, c/o Department of Biological Sciences, University of Alaska Anchorage, 3211 Providence Drive, Anchorage, AK 99508, USA

VERENA A. GILL, Marine Mammals Management, United States Fish and Wildlife Service, 1011 E Tudor Road, Anchorage, AK 99503, USA

JENNIFER M. BURNS, Department of Biological Sciences, University of Alaska Anchorage, 3211 Providence Drive, Anchorage, AK 99508, USA

ABSTRACT Age at first reproduction (AFR) has been difficult to quantify in mammals, as the most commonly used methods require reproductive tracts or direct observations. However, work in several large mammal species suggests that the width of cementum light bands in teeth decline once females begin to reproduce, suggesting that teeth structures might provide a new tool to examine AFR. To determine if changes in cementum light band width could be used to calculate AFR for the northern sea otter (*Enhydra lutris kenyoni*), we measured cementum light band widths on sectioned premolar teeth and compared them to reproductive tracts. We classified otters as parous if any single light band was narrower than a threshold value, selected as the value that minimized error rates. At a threshold value of 0.32, we correctly identified otters as parous or nulliparous in 83% of cases ($n = 92$) as compared to reproductive tracts, and the AFR estimated from teeth samples (3.52 ± 0.032 yr) was not different from that determined by reproductive tract analysis (3.45 ± 0.031 yr; t -test, $P > 0.05$). These data support the use of cementum as an indicator of past reproduction in individual female otters, which can then be used to estimate average AFR. Given that declines in cementum width have been described for other mammal species, the same quantitative approach used here could be applied to other species. (JOURNAL OF WILDLIFE MANAGEMENT 72(3):618–624; 2008)

DOI: 10.2193/2007-218

KEY WORDS age at first reproduction, Alaska, cementum width method, demography, *Enhydra lutris*, population biology, reproduction, sea otter.

Environmental factors such as density, predation, and nutrition directly impact individual fitness by influencing the net energy gain of an individual (Stearns 1976). Life-history theory predicts that individuals should adjust the energy allocated to reproduction to maximize fitness. For example in dense, resource-limited populations, individual fitness may be maximized by delaying the individual's age of first reproduction (iAFR) if it sufficiently increases survival (Bengtson and Laws 1985, Skogland 1985, Choquenot 1991, Festa-Bianchet et al. 1995). Similarly, when population declines are driven by bottom-up causes, such as resource limitation, the average AFR (aAFR, the population-wide average of iAFRs) for the population will increase, even if some individuals do not delay iAFR (Stearns 1976, McMahon et al. 2003). In contrast, when population declines are driven by top-down forces, such as predation, resources are usually abundant and aAFR tends to decrease as more females begin reproducing at younger ages (Dzikowski et al. 2004). Therefore, changes in both iAFR and aAFR may provide insight to underlying causes of population declines (Eberhardt and Siniff 1977, Bengtson and Laws 1985).

Unfortunately, because estimating aAFR for a population entails determining the iAFR for a large number of known-age females, it is rarely measured (Boness and James 1979, Clutton-Brock 1988, Testa et al. 1990, Le Boeuf and Reiter 1991). In large mammals iAFR is often determined through long-term mark-recapture or monitoring studies that are time-intensive, expensive, and logistically difficult due to the

long time period over which they must be carried out (Testa et al. 1990, Siniff and Ralls 1991, Monson et al. 2000, Pistorius et al. 2001). These studies become particularly problematic for species or populations where there is high tag loss, high mobility, or low site fidelity.

An alternate method for estimating iAFR is the use of reproductive tracts, which contain indicators of current and past pregnancy (corpora lutea [CLs] and corpora albicantia [CAs], respectively; Bodkin et al. 1993, Stirling 2005). If the minimum time a CA persists in the ovary and the youngest possible age of first ovulation is known, then the iAFR can be back-calculated using the individual's age and exact number of past reproduction indicators. In this method, total number of CLs and CAs are subtracted from the individual's age to arrive at iAFR, provided that the female is younger than or equal to the minimum iAFR plus the minimum number of years CAs persist in the ovary (Bengtson and Siniff 1981). However, this technique cannot be used to calculate iAFR if either the minimum iAFR or the minimum CA persistence is unknown or highly variable.

However, assumptions of the back-calculation method are relaxed if ovarian structures are used only to determine whether an individual has reproduced by the time of sampling, as indicated by the presence of a CA. Then, the proportion of females that have reproduced in each age class can be used to calculate an aAFR for the population following methods outlined by DeMaster (1978). However, utilizing this technique requires an appropriate sample size and age distribution, preferably ≥ 25 females per age class from the youngest age at which any female can begin reproducing until the age that all females become repro-

¹ E-mail: vvonbiela@usgs.gov

ductive (DeMaster 1978). Although analyzing reproductive tracts is neither expensive nor time-intensive, it is destructive, making collection of such a large stratified sample difficult or prohibited due to management concerns.

Whether using reproductive tract analysis to estimate iAFR or aAFR, the individual's age must be known. In mammals, dental cementum annuli are widely used in age estimation because the alternating pattern of light bands and dark annuli is easily distinguishable using transmitted light (provided the tooth was not subject to excessive mechanical stress). Each year a wide transparent layer, the light band, and a narrow dark layer, the annuli, are laid down around the outside of the tooth within the gums. In many temperate species the light band is formed from late spring to early autumn, the part of the year associated with higher growth, and the dark annulus is formed from late autumn to early spring, a time associated with lower growth (Klevezal and Kleinenberg 1969). Light bands and annuli are not reabsorbed like bone, or restricted by pulp cavity volume like dentin, and researchers regularly collect teeth from captured animals (Klevezal and Kleinenberg 1969, Klevezal 1996, Stewart et al. 1996, Bodkin et al. 1997). Thus, the number of annuli provides an index of animal age, and the width of the light bands is thought to be related to intrinsic and extrinsic factors that influence seasonal growth rates. An additional common feature in many mammalian teeth is the decline in cementum light band width with age (Klevezal and Kleinenberg 1969, Craighead et al. 1970, Bengtson and Siniff 1981, Klevezal and Stewart 1994), which has been attributed to sexual maturation (iASM, age when pregnancy becomes possible) or initiation of reproductive activity in females (iAFR; Coy and Garshelis 1992, Klevezal 1996), which suggests that changes in light band width may provide an alternative method for identifying reproductive status. Indeed, researchers have shown that the age at which cementum light band width declines (determined visually) is correlated with iAFR or iASM as determined from reproductive tracts or mark-recapture analyses in ringed (*Phoca hispida*), gray (*Halichoerus grypus*), crabeater (*Lobodon carcinophagus*), and northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*; Soderberg 1978, Bengtson and Siniff 1981, Klevezal and Stewart 1994). In addition, Coy and Garshelis (1992) found that narrow light bands were laid down during cub-rearing events in black bears (*Ursus americanus*). In contrast Baker and Boveng (1997) failed to find a strong correlation between iAFR and light band width decline in harbor seals (*Phoca vitulina*). Similar declines in light band widths also might occur in males, but these patterns have not been studied because female reproductive parameters limit population dynamics more often than do male reproductive parameters.

Although cementum measurements may not reliably pinpoint iAFR for all species, it might be possible to use changes in light band width to determine if a female is parous (having given birth) or nulliparous (not yet reproductive). If so, then cementum analyses could provide the data necessary to estimate aAFR for a population

following the DeMaster (1978) calculations discussed above. Recent declines in northern sea otter populations (*Enhydra lutris kenyoni*) in southwest Alaska have focused interest on development of new methods for estimating life-history parameters that influence population trajectories. Because sea otters may reproduce more than once per year, and the minimum time that an ovarian structure remains visible in the ovary is unknown, we could not use the back calculation method to obtain iAFR from reproductive tracts for comparison to cementum measurements (Bodkin et al. 1993). Instead, we tested whether cementum light band measurements could be used as an indicator of past reproduction in northern sea otters.

STUDY AREA

We collected reproductive tracts and premolar teeth from 92 female northern sea otters between the ages of 2 years and 14 years old from 1989 to 2005. Northern sea otters are a subspecies of sea otter distributed along the Aleutian Islands (southwest AK) to Oregon, USA (Wilson et al. 1991). Samples were available from 3 sources: carcasses collected as a result of the 1989 *Exxon Valdez* Oil Spill (United States Geological Survey [USGS] and United States Fish and Wildlife Service [USFWS]; $n = 42$), stranded otters that likely died from acute causes collected between 1994 and 2005 in Alaska ($n = 17$) and Russia ($n = 4$; USFWS), and subsistence-hunted otters collected across Alaska (The Alaska Sea Otter and Steller Sea Lion Commission and USFWS; $n = 29$). We performed all sample collection in accordance with USFWS regulations.

METHODS

Cementum Age and Width Analysis

From each female otter, 2 decalcified mid-sagittal longitudinal sections from one premolar tooth were available. We used the first premolar present (PM2, because PM1 is absent in the species) for all analyses, but we did not standardize tooth position (upper or lower). All slides were prepared and aged by Matson's Laboratories (Milltown, MT, USA) as described by Bodkin et al. (1997). We accepted ages determined at Matson's Laboratory and did not attempt to assign independent ages because the Laboratory has been used for sea otter age analysis in all recent studies cited here and G. Matson personally ages all sea otter teeth to maintain consistency (G. Matson, personal communication). To limit possible errors associated with age assignment, we used only results with an age certainty code of A or B (possible error judged to be ± 0 yr and ± 1 yr, respectively, for otters 0–7 yr; G. Matson, personal communication). Following staining and age determination, we examined teeth sections at 100 \times magnification and photographed them using a Nikon Eclipse E400 microscope outfitted with a MicroPublisher 3.3 digital camera (QImaging, Burnaby, BC, Canada). We measured width of each light band between the centers of adjacent dark annuli on digital images (Fig. 1) using MetaVue 6.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). For each otter, we measured

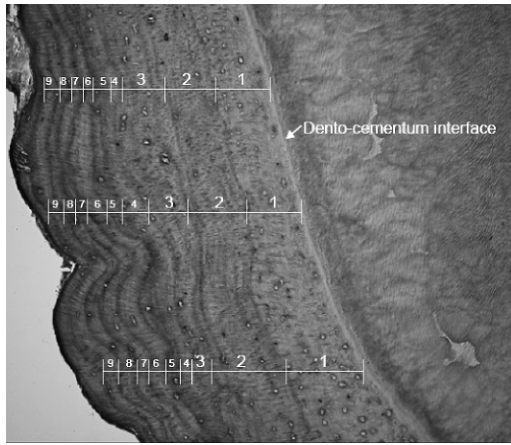


Figure 1. Premolar cementum annuli of an adult 9-year-old female sea otter (specimen 480001) from Alaska, USA, in 2005. We took measurements at 3 sites on each of 2 premolar sections.

cementum light band width at 3 variable locations, which we chose based on cementum clarity, on each of the 2 tooth sections for a total of 6 measurements per light band. We measured only completed light bands (large light area bounded by narrow dark annuli), because width of the last incomplete light band would likely be affected by date of death.

We standardized individual light band widths ($a_{i,n}$, where i = measurement site and n = light band no.) to the widest light band width at each measurement site (or $a_{i,n} / a_{i,L}$ where L = largest light band) because cementum light band width is generally thicker closer to the root tip, and that total thickness increases with age, whereas light band thickness decreases with age (Craighead et al. 1970). We compared standardized cementum measurements for each light band by tooth section and measurement site using a repeated measures 2-way analysis of variance to verify that measurements did not vary significantly between measurement site or slide section. Because we detected no significant differences by site or section ($P > 0.05$) we calculated the average of the standardized measurements for each light band, which resulted in one series of average standardized light band width measurements for each otter. We then used the thinnest average light band (\bar{a}_{\min}) for each otter in subsequent analyses, provided that the thinnest average band was not the first light band ($n = 3$). If the thinnest light band was the first, we used the next thinnest light band as \bar{a}_{\min} . We did not use the first light band as \bar{a}_{\min} because otters do not reproduce in their first year of life (Kenyon 1969, Bodkin et al. 1993). The first light band was the narrowest in these few otters likely because these otters were born late in the season and had little time to growth before the winter season when the dark band was deposited.

Reproductive Tract Analysis

We either immediately fixed reproductive tracts from each otter in 10% neutral buffered formalin or froze them at -20°C , in which case we thawed and fixed them once formalin was available. All samples remained in formalin for

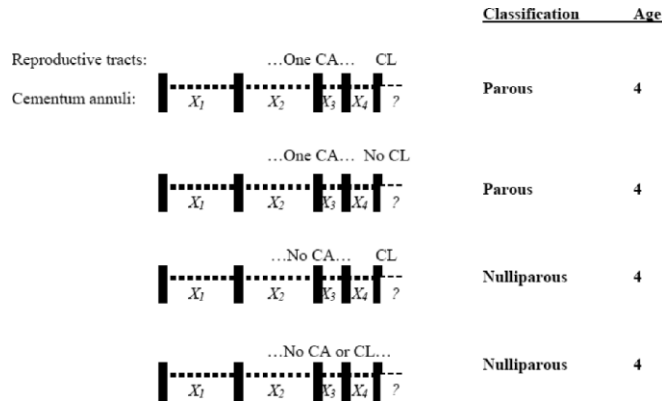


Figure 2. Diagrammatic representation of light band measurement and reproductive tract analysis timelines used for sea otters collected in Alaska, USA, 1989–2005. Each dashed black line represents a tooth from an individual otter. Solid black lines represent the dark cementum annuli bands or years. The space between each solid black line represents the light band width for a given year, X_i , where i = year of life. The 4 possible results from reproductive tract analysis are displayed above each dashed line with corpora albicantia (CA) representing the marker of past pregnancy and corpora luteum (CL), the marker of current pregnancy. Ellipses on either side of reproductive tract information indicate that the CL or CA could have formed during any of the light bands listed below. To the right of each dashed line, the resulting reproductive classification and age (yr) we used in the analysis of average age of first reproduction by age class (AFR_{tract}) is listed.

≥ 1 month prior to analysis. To determine total number of CLs and CAs, we excised fixed ovaries from the reproductive tract, sectioned them by hand at 1–2-mm intervals, and examined them macroscopically (Sinha et al. 1966, Bodkin et al. 1993). For each otter we recorded age and number of CAs and CLs. If reproductive tract analysis returned biologically implausible samples (e.g., reproductive 1-yr-olds) we removed samples from all analyses ($n = 2$).

To compare data from reproductive tracts to changes in cementum widths, this analysis had to account for the fact that each tissue represents a slightly different timeframe in the life of an individual otter. Reproductive tracts contain information on pregnancies up to time of death, whereas cementum measurements capture information only up to the end of winter prior to death, because measurements can only be made on complete light bands (Bodkin et al. 1997). Therefore, to standardize temporal comparisons, we used only data on past pregnancies, as indicated in reproductive tracts by CAs. As a result, these comparisons do not include information on reproductive history in the year of collection. For example, we would treat a 5-year-old otter that was pregnant at time of collection (CL in reproductive tract), but had no signs of past pregnancies (no CAs), as a nulliparous 4-year-old for analyses (Fig. 2). After making these adjustments to reproductive tract data, we determined the proportion of females in each age category that had signs of past reproduction (CAs) for otters ranging in age from 1 year to 7 years. We then used the proportion of parous females in each age class to calculate an aAFR (aAFR_{tract}) following DeMaster (1978). Although otters do not reproduce during their first year of life, their inclusion in the calculation improves aAFR estimate and reduces

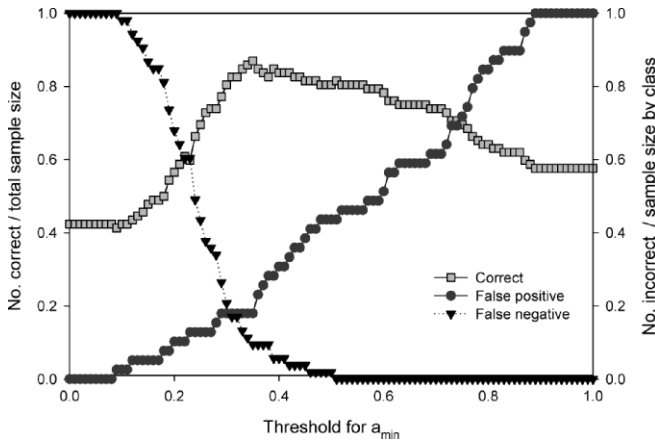


Figure 3. Proportion of females correctly classified as parous or nulliparous (left axis) as well as proportion of false positive and false negative results (right axis) for each possible threshold value of \bar{a}_{\min} , as determined at 0.01 intervals for sea otters collected in Alaska, USA, 1989–2005.

variance. All protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Alaska Anchorage (IACUC No. 2006burns8).

Data Analysis

We evaluated use of \bar{a}_{\min} as an accurate indicator of reproductive status (parous or nulliparous) in 2 ways. In the first analysis we directly compared results from \bar{a}_{\min} with reproductive tract analysis without regard to age. The objective of this first comparison was to determine a threshold value of \bar{a}_{\min} that would accurately place otters into the correct reproductive category, nulliparous ($\bar{a}_{\min} > \text{threshold}$) or parous ($\bar{a}_{\min} \leq \text{threshold}$), as determined from reproductive tract analysis. We evaluated all possible threshold values of \bar{a}_{\min} (0.01 to 1.00), with optimal threshold value being that which minimized proportion of false positive ($\bar{a}_{\min} \leq \text{threshold}$ but no indication of prior reproductive events in the tract) and false negative ($\bar{a}_{\min} > \text{threshold}$ but indication of a prior reproductive event in tract) errors by class (parous or nulliparous). We minimized errors by reproductive class to ensure that proportion of otters that were parous in the sample set did not influence the threshold.

To examine variability in the optimal threshold that we would expect in future analysis of sea otter cementum light band measurements, we attained 1,000 bootstrap replicates of the optimal threshold value in the same manner as above (Efron 1982). If a bootstrap replicate returned multiple values for the optimal threshold (e.g., an \bar{a}_{\min} of 0.33 and 0.34 produced the same results), we used the mean value for the replicate ($\bar{a}_{\min} = 0.335$).

Once we selected the optimal threshold value of \bar{a}_{\min} from the median of the bootstrap replicates, we used it to classify all otters as parous or nulliparous. We then used the proportion of females in each age that were reproductive to calculate the $\text{aAFR}_{\text{teeth}}$, the same way we calculated $\text{aAFR}_{\text{tract}}$ (DeMaster 1978). We report means as \pm standard error. We compared the 2 resulting estimates of aAFR using a modified t -test (DeMaster 1978). In addition, we

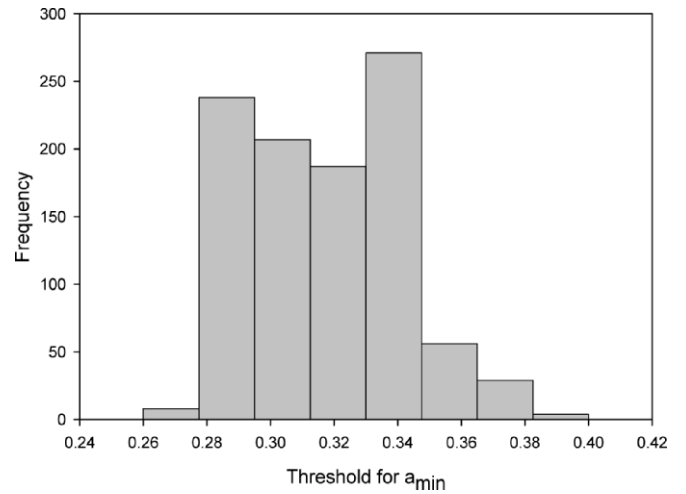


Figure 4. Distribution of the optimal \bar{a}_{\min} determined from 1,000 bootstrap replicates of a dataset of 92 female sea otters collected in Alaska, USA, 1989–2005. The median optimal threshold value was 0.32 ± 0.024 (median \pm SD).

calculated expected detectable difference between $\text{aAFR}_{\text{teeth}}$ and $\text{aAFR}_{\text{tract}}$, from equation 9 in DeMaster (1978).

RESULTS

We determined the optimal threshold value for \bar{a}_{\min} to be 0.32 of the largest light band width (Fig. 3). At this optimal threshold value, we correctly classified 83% of samples as parous or nulliparous, the false positive rate was 7.6% (we misclassified 18% of 39 nulliparous samples as parous), and the false negative rate was 10% (we misclassified 17% of 53 parous samples as nulliparous). Neither the false negative nor the false positive error rates were centered around the threshold value; instead, errors were distributed along the entire continuum of possible threshold values. However, results of 1,000 bootstrap replicates gave a narrow estimate of the threshold value: 0.32 ± 0.024 (median \pm SD; Fig. 4).

After applying the threshold obtained from the median of the bootstrap replicates to each sample, we calculated $\text{aAFR}_{\text{teeth}}$ to be 3.51 ± 0.032 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) years whereas reproductive tract analyses produced an $\text{aAFR}_{\text{tract}}$ of 3.45 ± 0.031 years. The $\text{aAFR}_{\text{teeth}}$ did not differ from $\text{aAFR}_{\text{tract}}$ ($t_{81} = 1.43$, $P > 0.05$) and the calculated detectable difference between means was 0.77 years. Approximately 90% of samples fell in the critical age range (or the range of ages beginning at the last age where no otter were parous to the first age where all otter were parous, 1–7 yr old in our study) for determining aAFR.

DISCUSSION

We took a quantitative approach to evaluating cementum light bands as an indicator of past reproduction and found that we could use decreases in cementum width of the light bands between annuli as an indicator of past reproduction in northern sea otters. By selecting an appropriate threshold of cementum light band width, we could correctly identify

most otters as parous or nulliparous, which allowed us to calculate from teeth measurements an aAFR that did not differ from that estimated from reproductive tracts. Our success likely comes from 2 innovations: use of quantitative, not qualitative, measures of cementum and use of cementum light band width to estimate parous status and not iAFR or sexual maturity.

Previous studies linking cementum band width and reproductive events have relied upon an observer's ability to visually identify the age when light cementum bands narrow. Such a method is subjective and particularly prone to errors when examining teeth from animals near the age when the width between cementum annuli decreases (Bengtson and Laws 1985, Baker and Boveng 1997). Here, we used quantitative measurements to determine whether and to what degree light band width changed with parous status. In addition, because there were no significant differences in light band width due to measurement site or slide section, we made light band width measurements at the clearest area of the tooth slides.

A second strength of our study was that we only used the decline in cementum light band width to estimate parous status and not to identify iAFR, which was necessary because annual pregnancy rates and multiyear persistence of ovarian structures are not known for sea otters, making it impossible to determine the iAFR_{tracts} needed for comparative purposes. Even if it were possible to determine iAFR_{tracts}, estimating iAFR_{teeth} likely would have introduced additional sources of error because one might have assumed that the narrowest light band represented iAFR_{teeth}, which may or may not have been the case.

One of the difficulties in assigning iAFR based on light bands between annuli is that the exact cause of the decline in width is not known. Although many researchers attribute the decline in cementum light band width to diversion of energy away from growth for support of pregnancy and lactation, others postulate that it is due to endocrine shifts that occur at the onset of sexual maturity, which will occur earlier than the first reproductive event (Klevezel and Myrick 1984, Coy and Garshelis 1992, Klevezel 1996). It is interesting that annual growth increments in fish otoliths (ear stones), similar to cementum in mammals, are often found to be directly proportional to somatic growth (Francis 1990). In sea otters, bands likely narrow because of energetic constraints late in pregnancy and during lactation, but hormonal influences cannot be ruled out. However, by focusing only on whether the light band had narrowed sufficiently to indicate a prior reproductive event, error from this source was less likely.

Solely using decreases in light band width properly classified otters as parous or nulliparous in 83% of cases, evenly distributed misclassifications across both reproductive classes, and spread errors along the possible threshold values, which suggests that misclassifications are not due solely to the selection of \bar{a}_{\min} but instead may be due to errors in light band measurements, age estimation, or reproductive tract analysis. Errors in age determination or

light band width measurements could have been due to presence of compound or indistinct annuli, but multiple measurements of 2 separate tooth sections likely minimized these errors. However, we could not separate or quantify errors due to age assignment and parous status. We could also have misclassified individual otters if they were able to maintain thick cementum light band widths during pregnancy due to abundant food resources (false negative) or if resource limitations produced narrow bands in nonreproductive individuals (false positives), but we cannot assess prevalence of this source of error. Given the wide variety of environmental conditions likely experienced by otters in our study due to diversity of sampling sites and time periods, the low error rate in our study suggests that changes in light band width associated with parous status are larger than those associated with changing environmental conditions alone. Additionally, by standardizing measurements to the widest light band we designed our analysis to detect a proportional change in light band width for a given individual so that a nulliparous otter experiencing slow growth due to environmental stressors throughout its life, presumably represented as a series of narrow bands, would not have shown a proportional decline in light band width necessary to be classified as parous. Finally, if we overlooked a CA during reproductive tract analysis, we might have falsely classified the otter as nulliparous; alternatively, a detected CA that did not result in a successful pregnancy or a reduction in light band width might result in a false negative. None of these possible sources of error are unique to our study but instead exist in all analyses of reproductive tract data.

Additional support for the use of a minimum cementum light band width measurement (\bar{a}_{\min}) as a robust indicator of parous status comes from analysis of the bootstrap results. Not only was the range of optimal \bar{a}_{\min} produced by the bootstrap replicates narrow, but the median of the bootstrap replicates was identical to that we determined for the original sample. The agreement between the bootstrap median and the optimal threshold value supports the use of this point threshold in future studies of sea otter parous classification. Although a moot point for our study because the optimal threshold and the median of the bootstrap thresholds were equal, the bootstrap median value should be selected as the threshold value for future studies as it is based on a series of possible samples that could be obtained from the same species and not just one static group of individuals.

Once we selected and used the optimal threshold value to classify all otters as parous or nulliparous, we calculated aAFR from data contained in the teeth alone. Because the selected threshold was robust and errors spread across the age classes, it was not surprising that the resulting aAFR_{teeth} did not differ from that calculated from reproductive tracts (aAFR_{tracts}). Because the aAFR calculation is sensitive to small changes in the number of parous females in each age class when sample sizes are small, our finding of no difference between techniques despite sample size concerns is another indication that the cementum technique is robust.

Still, researchers should carefully consider sample size and age distributions before applying this technique.

MANAGEMENT IMPLICATIONS

The value of monitoring changes in aAFR in long-lived mammals as a tool to understand population dynamics and health has long been recognized (Eberhardt and Siniff 1977). We demonstrated that premolar cementum light bands can be used to estimate aAFR in sea otters. Cementum analysis is nondestructive and cost-effective, and because measurements can be made on the same slide section that is used for age analysis, it allows researchers to determine aAFR from archived samples. Therefore, this approach may provide researchers and wildlife managers with an effective tool to monitor changes in aAFR in a wide variety of wildlife species. Cementum measurements may now provide researchers with the means to do so in sea otters and other wild mammals where reproductive tracts or other methods are unavailable. Application of this technique to study the phenotypic plasticity in the aAFR of northern sea otters from declining and stable populations will be presented in a separate article (also see von Biela 2007).

ACKNOWLEDGMENTS

Our research was supported by the National Oceanic and Atmospheric Administration and North Pacific Universities Marine Mammal Research Consortium. Our study would not have been possible without samples collected by USGS, USFWS, the Alaska Stranding Network, or subsistence hunters working with The Alaska Sea Otter and Steller Sea Lion Commission. We would also like to thank J. Bodkin, J. Haddix, D. Jenski, J. Haas, D. Pfeiffer, and J. Prewitt for assistance with sample collection and manuscript review. G. Matson and an anonymous reviewer greatly improved this manuscript.

LITERATURE CITED

- Baker, J., and P. Boveng. 1997. Survey of growth layers in harbor seal teeth. Pages 107–111 in J. Baker, P. R. Becker, P. Boveng, K. Frost, S. Iverson, L. A. Jemison, B. Kelly, J. P. Lewis, L. F. Lowry, E. A. Mathews, G. O'Corry-Crowe, R. Papa, G. W. Pendleton, K. W. Pitcher, G. Sheffield, R. Small, U. Swain, R. L. Westlake, K. Wynne, and R. Zarnke. Harbor seal investigations in Alaska annual report. NOAA grant NA57FX0367. Alaska Department of Fish and Game, Division of Wildlife Conservation, Anchorage, USA.
- Bengtson, J. L., and R. M. Laws. 1985. Trends in crabeater seal age at maturity: an insight into Antarctic marine interactions. Pages 669–675 in W. R. Siegfried, P. R. Condy, and R. M. Laws, editors. Antarctic nutrient cycles and food webs. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Bengtson, J. L., and D. B. Siniff. 1981. Reproductive aspects of female crabeater seals (*Lobodon carcinophagus*) along the Antarctic Peninsula. Canadian Journal of Zoology 59:92–102.
- Bodkin, J. L., J. Ames, R. J. Jameson, A. M. Johnson, and G. M. Matson. 1997. Estimating age of sea otters with cementum layers in the first premolar. Journal of Wildlife Management 61:967–973.
- Bodkin, J. L., D. M. Mulcahy, and C. J. Lensink. 1993. Age specific reproduction in female sea otters (*Enhydra lutris*) from south-central Alaska: analysis of reproductive tracts. Canadian Journal of Zoology 71: 1811–1815.
- Boness, D. J., and H. James. 1979. Reproductive behaviour of the grey seal (*Halichoerus grypus*) on Sable Island, Nova Scotia. Journal of Zoology London 188:477–500.
- Choquenot, D. 1991. Density-dependent growth, body condition and demography in feral donkeys: testing the food hypothesis. Ecology 72: 805–813.
- Clutton-Brock, T. H., editor. 1988. Reproductive success: studies of individual variations in contrasting breeding systems. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Coy, P. L., and D. L. Garshelis. 1992. Reconstructing reproductive histories of black bears from the incremental layering in dental cementum. Canadian Journal of Zoology 70:2150–2160.
- Craighead, J. J., F. C. Craighead, and H. E. McCutchen. 1970. Age determination of grizzly bears from fourth premolar tooth sections. Journal of Wildlife Management 34:353–363.
- DeMaster, D. P. 1978. Calculation of the average age of sexual maturity in marine mammals. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 35: 912–915.
- Dzikowski, R., G. Hulata, S. Harpaz, and I. Karplus. 2004. Inducible reproductive plasticity of the guppy *Poecilia reticulata* in response to predation cues. Journal of Experimental Zoology 301A:776–782.
- Eberhardt, L. L., and D. B. Siniff. 1977. Population dynamics and marine mammal management policies. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34:183–190.
- Efron, B. 1982. The jackknife, the bootstrap and other resampling plans. The Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Festa-Bianchet, M., J. T. Jorgenson, M. Lucherini, and W. D. Wishart. 1995. Life history consequences of variation in age of primiparity in bighorn ewes. Ecology 76:871–881.
- Francis, R. I. C. C. 1990. Back-calculation of fish length: a critical review. Journal of Fish Biology 36:883–902.
- Kenyon, K. W. 1969. The sea otter in the eastern Pacific Ocean. Dover, New York, New York, USA.
- Klevezel, G. A. 1996. Recording structures of mammals: determination of age and reconstruction of life history. A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands.
- Klevezel, G. A., and S. E. Kleinenberg. 1969. Age determination of mammals from annual layers in teeth and bones. IPST Press, Jerusalem, Israel.
- Klevezel, G. A., and A. C. J. Myrick. 1984. Marks in tooth dentine of female dolphins (genus *Stenella*) as indicators of parturition. Journal of Mammalogy 65:103–110.
- Klevezel, G. A., and B. S. Stewart. 1994. Patterns and calibration of layering in tooth of cementum of female northern elephant seals, *Mirounga angustirostris*. Journal of Mammalogy 75:483–487.
- Le Boeuf, B. J., and J. Reiter. 1991. Biological effects associated with El Niño, southern oscillation 1982–1983, on northern elephant seals breeding at Ano Nuevo, California. Pages 206–218 in F. Trillmich and K. A. Ono, editors. Pinnipeds and El Niño. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- McMahon, C. R., H. R. Burton, and M. N. Bester. 2003. A demographic comparison of two southern elephant seal populations. Journal of Animal Ecology 72:61–74.
- Monson, D. H., J. A. Estes, J. L. Bodkin, and D. B. Siniff. 2000. Life history plasticity and population regulation in sea otters. Oikos 90:457–468.
- Pistorius, P. A., M. N. Bester, S. P. Kirkman, and F. E. Taylor. 2001. Temporal changes in fecundity and age at sexual maturity of southern elephant seals at Marion Island. Polar Biology 24:343–348.
- Sinha, A. A., C. H. Conaway, and K. W. Kenyon. 1966. Reproduction in the female sea otter. Journal of Wildlife Management 30:121–130.
- Siniff, D. B., and K. Ralls. 1991. Reproduction, survival and tag loss in California sea otters. Marine Mammal Science 7:211–229.
- Skogland, T. 1985. The effects of density-dependent resource limitation on the demography of wild reindeer. Journal of Animal Ecology 54:359–374.
- Soderberg, S. 1978. Falling age at sexual maturity in the Baltic seals. Finnish Game and Fish Research Institute 37:27–31.
- Stearns, S. C. 1976. Life-history tactics: a review of the ideas. Quarterly Review of Biology 51:3–47.
- Stewart, R. E. A., B. E. Stewart, I. Stirling, and E. Street. 1996. Counts of growth layers groups in cementum and dentine in ringed seals (*Phoca hispida*). Marine Mammal Science 12:383–401.

- Stirling, I. 2005. Reproductive rate of ringed seals and survival of pups in Northwestern Hudson Bay, Canada, 1991–2000. *Polar Biology* 28:381–387.
- Testa, J. W., D. B. Siniff, J. P. Croxall, and H. R. Burton. 1990. A comparison of reproductive parameters among three populations of Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*). *Journal of Animal Ecology* 59: 1165–1175.
- von Biela, V. R. 2007. Evaluating and comparing reproductive parameters of northern sea otters (*Enhydra lutris kenyoni*) in Alaska. Thesis, University of Alaska Anchorage, Anchorage, USA.
- Wilson, D. E., M. A. Bogan, R. L. Brownell, Jr., A. M. Burdin, and M. K. Maminov. 1991. Geographic variation in sea otters, *Enhydra lutris*. *Journal of Mammalogy* 72:22–36.

Associate Editor: Green.