

На правах рукописи



Титов Сергей Федорович

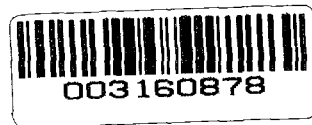
ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR L* ИЗ РЕК РОССИИ

03 00.10 – ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук



Санкт-Петербург — 2007

Работа выполнена в лаборатории мониторинга популяций лососевых рыб
Федерального Государственного Научного Учреждения «Государственный
научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства»
(ФГНУ «ГосНИОРХ»)

Научный руководитель

доктор биологических наук, профессор
Кудерский Леонид Александрович

Официальные оппоненты.

доктор биологических наук
Дорофеева Евгения Алексеевна

доктор биологических наук, профессор
Лукин Анатолий Александрович

Ведущая организация. Северный научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства, г. Петрозаводск

Защита диссертации состоится « 30 » октября 2007 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета К.220 013 01 при ФГНУ «Государственный научно-
исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства» по адресу:
199053, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГНУ «ГосНИОРХ»

Автореферат разослан 29 сентября 2007 г

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

М А Дементьева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы Атлантический лосось широко распространен на Европейском и Североамериканском континентах, где является одним из наиболее ценных объектов как промышленного, так и спортивного лова. Однако за последние десятилетия, в связи с чрезмерно интенсивным выловом, в том числе нелегальным, и разрушением среды обитания, многие популяции лосося оказались утраченными, а практически все сохранившиеся до наших дней резко сократились в численности. Исчезновение многих природных популяций и резкое сокращение численности сохранившихся не могло не привести к безвозвратной утрате части генофонда вида.

С целью охраны и восстановления численности атлантического лосося во всех странах, располагающих его запасами, проводятся рыбохозяйственные мероприятия, в числе которых регулирование промысла, создание водоохранных зон, восстановление нерестилищ, мест нагула молоди и т.д. На пополнение запасов атлантического лосося работают сотни рыбоводных заводов, и некоторые из них функционируют уже около века.

Однако при проведении охранных и рыбоводных мероприятий, а тем более при осуществлении промысла атлантического лосося, как правило, не учитывается сложная популяционная структура этого вида. Между тем высокая пластичность вида и наличие значительной репродуктивной изоляции между группировками рыб, населяющих различные водоемы, привели в ходе эволюции к возникновению множества уникальных популяций, адаптированных к локальным условиям среды обитания. Эти популяции существенно отличаются друг от друга биологическими характеристиками, в том числе особенностями генетической структуры.

С целью изучения генетических особенностей сохранившихся природных популяций лосося во многих зарубежных странах на протяжении почти 40 лет ведутся систематические генетические исследования этого вида, в первую очередь, с применением методов анализа белкового полиморфизма.

Несмотря на широкое распространение атлантического лосося на Севере Европы, исследование популяционной структуры этого вида с привлечением генетических методов на российской части ареала проводилось ранее только эпизодически и охватывало, как правило, отдельные локальные популяции (Слынько и др., 1980, 1981; Никоноров и др., 1987; Офицеров и др., 1989; Makrhov et al., 2005). Применение методов биохимической генетики позволяет описать и количественно измерить параметры генетического полиморфизма в конкретных природных популяциях, определить степень внутривидовой и внутрипопуляционной дифференциации, выделить наиболее значимые генетические линии вида. Результаты подобных работ могут в дальнейшем использоваться как база данных при проведении мониторинга природных и заводских популяций атлантического лосося, разработке мер по охране генофонда этого ценного вида рыб и восстановлению его численности.

Цель и задачи исследования Цель настоящей работы — с использованием метода аллозимного анализа изучить популяционно-генетическую структуру

атлантического лосося, обитающего в водоемах России и определить вероятные пути реколонизации этим видом российской части ареала в послеледниковый период. Поставленная цель определила решение следующих задач

1. Изучить мономорфные и полиморфные ферментные локусы в популяциях атлантического лосося, установить локусы, пригодные для последующих внутривидовых и внутрипопуляционных сравнений

2. Оценить степень генетической дифференциации популяций атлантического лосося из рек бассейнов Баренцева, Белого, Балтийского морей, Ладожского, Онежского и других озер. Определить основные параметры генетической изменчивости для изученных популяций

3. Исследовать внутрипопуляционную генетическую структуру атлантического лосося в пределах единой речной системы на примере бассейнов рек Печора и Северная Двина

4. Описать популяционно-генетическую структуру атлантического лосося в водоемах России, определить вероятные рефугиумы (позднечетвертичные убежища вида) и установить возможные пути реколонизации лососем российской части ареала в послеледниковое время

Научная новизна Дано подробное описание наследственной изменчивости по белковым локусам атлантического лосося, обитающего в российской части ареала (бассейны Баренцева, Белого, Балтийского морей, озер Ладожского, Онежского, Куйто, Каменного, Сегозера). Впервые для атлантического лосося описан полиморфизм по локусу *LDH-A2**. Для локусов *sMDH-A1** и *IDDH-2** выявлены аллели, ранее не отмеченные в литературе. Для популяций из исследованных регионов определены основные параметры генетической изменчивости: количество аллелей на локус, уровень полиморфизма и средняя гетерозиготность. Получены оценки межпопуляционных генетических расстояний (D_N) по 32-м локусам. Выделены основные генетические линии популяций, привносящих основной вклад в генетическое разнообразие вида в водоемах России. Проведена оценка уровня внутрипопуляционной подразделенности лосося в больших речных системах Печоры и Северной Двины. Дано описание популяционно-генетической структуры атлантического лосося в водоемах России, определены вероятные рефугиумы (приледниковые убежища) вида и проанализированы возможные пути реколонизации лососем российской части ареала в послеледниковое время.

Практическая значимость Выявленные генетические маркеры, их частоты, а также величины параметров наследственной изменчивости изученных популяций могут быть использованы в качестве первичных данных при проведении генетического мониторинга природных и заводских популяций атлантического лосося. Выделение основных, наиболее важных, генетических линий лосося, обитающего в российской части ареала, позволяет эффективно и научно обоснованно осуществлять поиск и выбор оптимальных доноров при восстановлении утраченных популяций.

Выявленные диагностические (уникальные для той или иной популяции) аллели и локусы могут быть использованы в качестве генетических маркеров

для оптимизации промышленного лова смешанных стад лосося в реках и морской части акватории

Апробация работы. Основные результаты настоящего исследования представлялись на 3 Всесоюзном совещании по генетике, селекции и гибридизации рыб (Тарту, 1986), 3 Всесоюзном совещании по лососевидным рыбам (Тольятти, 1988), симпозиуме по атлантическому лосою (Сыктывкар, 1990), Международном Семинаре по вопросам заводского разведения лосося и кумжи в Балтийском регионе (Элвкарлебо, Швеция, 1998), Международной конференции «Атлантический лосось биология, охрана и воспроизводство» (Петрозаводск, 2000), Международной Конференции «Биоразнообразие Европейского Севера» (Петрозаводск, 2001), Международном совещании по генетике лосося (Абердин, Шотландия, 2002), III Международной Конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера» (Сыктывкар, 2003), Рабочей группе по балтийскому лосою и кумже ICES, а также на научных семинарах ГосНИОРХ и лаборатории мониторинга популяций лососевых рыб.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 45 работ

Структура и объем диссертации Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов и списка литературы Работа изложена на 107 страницах, содержит 27 таблиц и 23 рисунка Список цитированной литературы содержит 158 источника, из них 118 на иностранных языках

Благодарности. Выражаю свою глубокую признательность моему первому научному руководителю Р В Казакову, без которого данная работа не состоялась бы Глубоко признателен настоящему руководителю Л А Кудерскому за постоянную помощь, ценные советы и консультации по теме диссертации, а также редакцию данной работы Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории мониторинга популяций лососевых рыб ГосНИОРХ, а также Сев-ПИПРО и Института Биологии КНЦ РАН за помощь в сборе материала и подготовке диссертации

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В разделе «**Введение**» обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава посвящена литературному обзору современного состояния генетических исследований атлантического лосося, в основном по данным зарубежных исследователей. Рассмотрены основные исторические этапы развития работ с применением метода аллозимного анализа за последние 40 лет Приводится детальный обзор публикаций, посвященных изучению популяционно-генетической структуры вида как в Европейской, так и Североамериканской частях его ареала

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы выборки из природных и заводских популяций атлантического лосося из рек, представляющих весь ареал вида на территории России (бассейны Баренцева, Белого и Балтийского морей, озер Ладожского, Онежского, Куйто, Каменного, Сегозера) (рисунок 1) Данные о географической локализации выборок, их объемах и времени сбора представлены в таблице 1

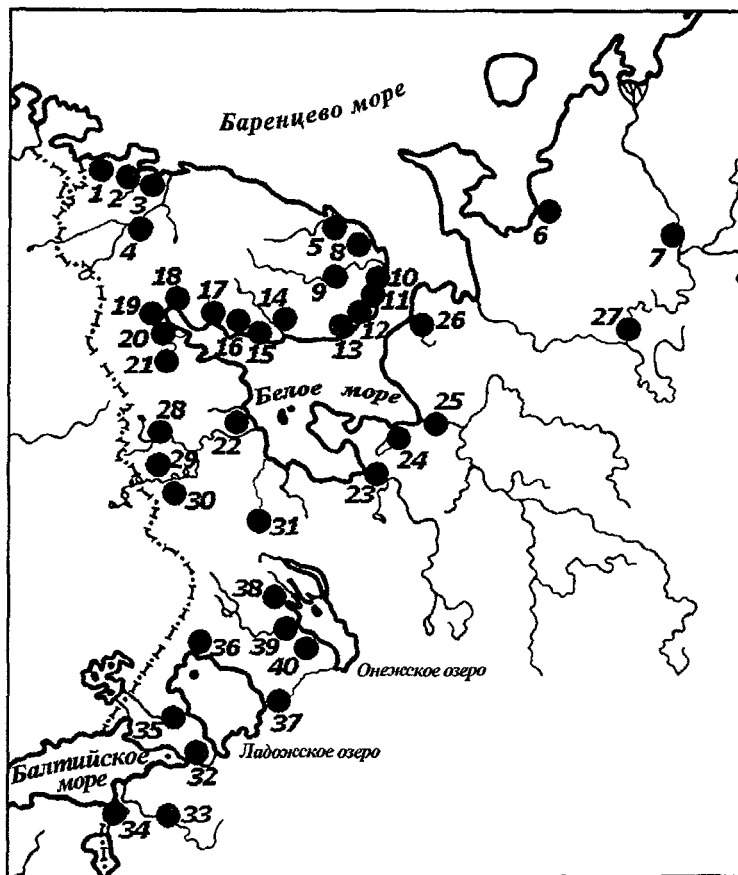


Рисунок 1. Места сбора материала Реки

- 1 Титовка, 2 Западная Лица, 3 Ура, 4 Кола, 5 Йоканьга, 6 Волонга,
- 7 Печора, 8 Качковка, 9 Поной, 10. Даниловка, 11 Бабья, 12 Лиходеевка,
13. Чапома, 14 Варзуга, 15 Оленица, 16 Умба, 17 Пила, 18. Колвица,
- 19 Нильма, 20. Пулоньга, 21 Кереть, 22 Поньгома, 23 Солза, 24 Онега,
25. Мегра, 26. Северная Двина, 27 Мезень, 28 Каменная, 29 Писта,
- 30 Куржма, 31. Лужма, 32 Нева, 33. Луга, 34 Нарова, 35 Бурная,
- 36 Сюскуанйоки, 37 Свирь, 38 Лижма, 39. Шуя, 40. Кумса

Таблица 1

Характеристика исследованных популяций атлантического лосося

Бассейн	Популяция	Объем, экз	Год(ы) сбора	Возрастной класс
Баренцево море	Титовка	17	2000	пестрятки
	Западная Лица	87	1991, 2000	пестрятки
	Ура	34	2000	пестрятки
	Кола	89	1990	пестрятки
	Йоканьга	90	1989	пестрятки
	Волонга	43	2002	пестрятки
Белое море	Печора	570	2000	производители
	Качковка	50	2001	пестрятки
	Поной	51	1987	пестрятки
	Даниловка	50	2001	пестрятки
	Бабья	51	2001	пестрятки
	Лиходеевка	48	2001	пестрятки
	Чапома	50	2001	пестрятки
	Варзуга	88	1999	пестрятки
	Оленица	44	2000	пестрятки
	Умба	49	2001	пестрятки
	Пила	41	2000	пестрятки
	Колвица	42	2000	пестрятки
	Нильма	43	1999	пестрятки
	Пулоньга	112	1991, 1999	пестрятки
	Кереть	46	1991	пестрятки
	Поньгома	51	1999	пестрятки
	Онега	100	2003, 2004	смолты
	Солза	150	1987	смолты
	Северная Двина	150	2004	производители
	Мегра	60	1994	смолты
Мезень	100	1999, 2000	пестрятки	
Каменное озеро	Каменная	111	1996, 1999	пестрятки
Куйто озеро	Писта	110	1996, 1999	пестрятки
	Куржма	18	1999	пестрятки
Сегозеро	Лужма	36	2000	пестрятки
Балтийское море	Нева ^К	266	1987, 1998-2000	пестрятки
	Луга	157	2002, 2003	смолты
	Нарова ^К	150	1991, 1998, 2000	пестрятки
Ладожское озеро	Бурная	39	1990	пестрятки
	Сюскуанйоки	42	1999	пестрятки
	Свирь ^К	300	1987, 1988, 1998, 2000	пестрятки
Онежское озеро	Лижма	85	1986, 1997	пестрятки
	Шуя	34	1997	пестрятки
	Кумса	41	1997	пестрятки

Примечание К — заводские выборки

Для анализа внутривидовой изменчивости атлантического лосося также были собраны выборки молоди из различных нерестовых притоков двух больших речных систем – Печоры и Северной Двины. Всего за время проведе-

ния исследований было проанализировано более 6400 экземпляров атлантического лосося

После проведения биологического анализа (измерение, взвешивание, определение пола) от каждой рыбы были взяты образцы тканей печени, белых скелетных мышц и глаза. Образцы тканей замораживали в жидком азоте и транспортировали в лабораторию. До проведения анализа пробы хранили не более 1 месяца при температуре -20°C . Образцы тканей, сохраняемые в микропробирках, заливали 20% раствором сахарозы, гомогенизировали при помощи стеклянной палочки и затем центрифугировали в течение 20 мин при $8000g$. Содержащую смесь белков выжимку (супернатант) при помощи пипетки помещали на планшет, а потом при проведении электрофореза переносили в лунки на гелевой пластине.

Электрофорез белков проводился в полиакриламидном геле в камерах конструкции Пospelова (Кирпичников, 1979) и в крахмальном геле с использованием стандартных методик (Davis, 1964, Peacock et al, 1965, Cross, Ward, 1980).

При проведении электрофоретических разгонок были использованы 4 буферные системы (A) — трис-ЭДТА-боратный буфер, pH 8,3 (Peacock et al, 1965), (B) — трис-цитратный гелевый буфер, pH 8,0/трис-боратный электродный буфер, pH 9,0 (Cross, Ward, 1980); (C) — трис-цитратный буфер, pH 7,1 (Shaw, Prasad, 1970), (D) — Трис-HCl гелевый буфер, pH 8,9 /трис-глициновый электродный буфер, pH 8,3 (Davis, 1964). Плотность геля задавалась в зависимости от используемой буферной системы и исследуемых белков и локусов (6,5–7,0%) Всего было проанализировано 12 ферментных систем, кодируемых 32 генными локусами. В таблице 2 приведен список исследованных локусов, их тканевая экспрессия и использованные для электрофореза буферные системы.

При проведении гистохимического окрашивания гелей использовались стандартные методики (Корочкин, 1977, Aebersold et al, 1987). При обозначении ферментов и локусов использована номенклатура Шекли с соавторами (Shaklee et al, 1990). Используемые в аббревиатурных обозначениях локусов префиксы *m* и *s* указывают на внутриклеточную митохондриальную и цитоплазматическую локализацию, соответственно. Буквенные суффиксы A и B использованы для обозначения мультилокусных изоформ. Для энзимов, имеющих, кроме NAD^+ -, также и NADP^+ -зависимые формы, использован суффикс P для последних (например, *MEP*, *IDHP*). Обозначения генов выделялись курсивом и маркировались звездочкой.

Интерпретация выявленной генетической изменчивости по большинству локусов выполнялась по известным для атлантического лосося схемам (Cross, Payne, 1977, Payne, Cross, 1977; Cross et al, 1979, Cross, Ward, 1980). Для полиморфных генетических локусов *sMDH-A1,2** и *LDH-A2**, а также дублированных локусов *IDDH-1,2**, характеризующихся сложной схемой наследования представлена собственная интерпретация генетической изменчивости.

Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета программ "BIOSYS-1" (Swofford, Selander, 1989) и его модифицированной версии "BIOSYS-2" (Black, 1997). Определены частоты аллелей полиморфных локусов.

Таблица 2

Проанализированные ферменты, число исследованных локусов, их тканевая экспрессия и использованные буферные системы

Фермент	Е С No	Локус	Ткань	Буфер
Аспаратаминотрансферраза	2 6 1 1	<i>sAAТ-1,2*</i>	М, Е	А
		<i>sAAТ-3*</i>	Л	А
		<i>sAAТ-4*</i>	Л	А
Алкогольдегидрогеназа	1 1 1 1	<i>ADH*</i>	Л	А
Креатинкиназа	2 7 3 2	<i>CK-1,2*</i>	М	А
Эстераза-D	3 1 - -	<i>ESTD*</i>	М, Л	А
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	1 1 1 8	<i>G3PDH-1*</i>	М	А
		<i>G3PDH-2*</i>	М	А
L-идитолдегидрогеназа	1 1 1 14	<i>IDDH-1,2*</i>	Л	В
Изоцитратдегидрогеназа	1 1 1 42	<i>IDHP-1*</i>	М	С
		<i>IDHP-2*</i>	Л	С
		<i>IDHP-3*</i>	Л	С
Лактатдегидрогеназа	1 1 1 27	<i>LDH-A1,2*</i>	М	В
		<i>LDH-B1*</i>	Е	В
		<i>LDH-B2*</i>	Л, Е	В
		<i>LDH-C*</i>	Е	В
Малатдегидрогеназа	1 1 1 37	<i>sMDH-A1,2*</i>	Л, Е	А, D
		<i>sMDH-B1,2*</i>	М	А, D
НАДФ ⁺ -зависимый маликэнзим	1 1 1 40	<i>mMEP-1*</i>	М	А
		<i>mMEP-2*</i>	М	А
		<i>sMEP-1,2*</i>	М	А
Фосфоглюкомутаза	5 4 2 2	<i>PGM-1*</i>	М	А
		<i>PGM-2*</i>	М	А
Супероксиддисмутаза	1 15 1 1	<i>mSOD-1*</i>	М, Л	А
		<i>sSOD-2*</i>	М, Л	А

и проверено соответствие распределения генотипов соотношению Харди-Вайнберга-Кастла с применением критерия χ^2 с поправкой на малую численность ряда проанализированных выборок (Levene, 1949) Для оценки распределения генетического разнообразия по межпопуляционному и внутривидовому уровням был проведен иерархический анализ (Chakraborty, 1980) UPGMA дендрограмма была построена по несмещенным оценкам стандартных генетических дистанций (Nei, 1978).

ГЛАВА 3. ОПИСАНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПОЛИМОРФИЗМА В ИССЛЕДОВАННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ

Во всех проанализированных выборках лосося мономорфными (инвариантными) оказались следующие локусы *sAAТ-1,2**, *sAAТ-3**, *ADH**, *CK-1,2**, *G3PDH-1**, *G3PDH-2**, *IDHP-1**, *IDHP-2**, *LDH-A1**, *LDH-B1**, *LDH-B2**, *LDH-C**, *sMDH-A2**, *sMDH-B2**, *mMEP-1**, *sMEP-1,2**, *PGM-1**, *PGM-2**, *mSOD-1**, *sSOD-2**.

Полиморфизм хотя бы в одной из исследованных популяций обнаружен нами по 9 ферментным локусам: *SAAT-4**, *ESTD**, *IDDH-1**, *IDDH-2**, *IDHP-3**, *LDH-A2**, *sMDH-A1**, *sMDH-B1**

В главе приводится описание генетической изменчивости по каждому из выявленных полиморфных ферментных локусов. Учитывая разницу в проявлении полиморфных локусов при электрофорезе в акриламидном геле, использованном в настоящей работе, и электрофорезе в крахмале, традиционно использовавшемся зарубежными авторами, мы посчитали уместным привести сравнительные данные по электрофоретическим подвижностям различных аллелей в этих двух средах. Для каждого полиморфного локуса приведены оригинальные фотографии выявленных электрофоретических спектров (фенотипов). В качестве примера ниже приведено описание генетической изменчивости локуса мышечной лактатдегидрогеназы — маркера, вариабельность по которому впервые описана в данной диссертации.

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА *LDH-A2**

По структуре данный белок относится к классу тетрамеров. У атлантического лосося, как и у других лососевых рыб (Сачко, 1973, Bailey et al, 1976, Ермоленко и др., 1987), этот фермент кодируется 5 тканеспецифичными локусами. Два дуплицированных локуса проявляются в мышцах — *LDH-A1,2**. Сведения о полиморфизме этих локусов у атлантического лосося отсутствуют. В данном исследовании впервые обнаружена вариабельность по одному из мышечных локусов, а именно *LDH-A2**. Кроме обычного аллеля *LDH-A2*100* обнаружен альтернативный аллель *LDH-A2*68* (рисунок 2), подвижность которого совпадает с подвижностью аллеля *LDH-A1*100*. Этим объясняется тот факт, что двойная гомозигота *LDH-A1*100*/100/LDH-A2*68*/68* прокрашивается в виде 1 фракции. Гетерозигота *LDH-A2*100*/68* и гомозигота *LDH-A2*100*/100* имеют по 5 фракций, отличия между генотипами заключаются только в интенсивности окрашивания полос.

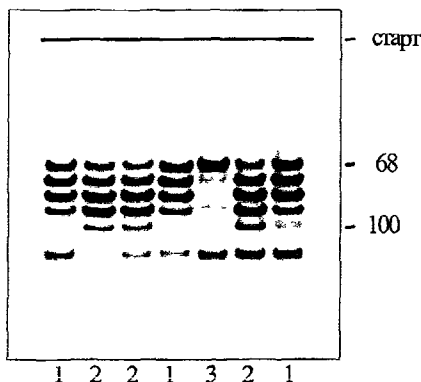


Рисунок 2 Электрофоретические варианты локуса *LDH-A2**.
100/100 (2), 100/68 (1), 68/68 (3)

Полиморфизм по локусу мышечной лактатдегидрогеназы обнаружен нами в популяции озерного лосося из реки Свирь (бассейн Ладожского озера) В значительных количествах (частота 0,02) альтернативный аллель *68 обнаружен также в популяции лосося из реки Нева, что, вероятно, объясняется обменом мигрантами между невским и свирским лососями, имевшем место в недалеком прошлом

ГЛАВА 4. МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ

Показатели генетического разнообразия оказались наибольшими в выборках лосося из рек Кольского полуострова, рек Карелии бассейна Белого моря и малых рек Архангельского берега. Так, показатель гетерозиготности для этих популяций имеет среднее значение $H=0,064$ при интервале $H=0,046-0,077$. У лосося из больших речных систем Архангельского побережья и рек бассейна Балтики (Финский залив Балтийского моря, Ладожское и Онежское озера) уровень гетерозиготности оказался почти в 1,5 раза меньше ($H=0,047$ и $H=0,045$, соответственно) Наименьшими значениями индекса (в среднем $H=0,024$) характеризуются популяции пресноводного лосося Беломорского бассейна (озера Куйто, Каменное и Сегозеро).

Проанализированные выборки атлантического лосося по особенностям распределения частот генетических маркеров разделились на 2 основных кластера (рисунок 3) Один из них объединил популяции из рек Балтики, включая как Финский залив Балтийского моря, так и озера Ладожское и Онежское, второй – из рек Белого и Баренцева морей Значения генетических дистанций между популяциями этих кластеров составили в среднем $D_N=0,030$ Максимальные оценки генетической дивергенции получены при сопоставлении популяций из Балтийского региона и популяций из беломорских рек Карелии и больших рек Архангельского побережья (средние значения $D_N=0,040$ и $D_N=0,037$ соответственно)

Популяции из первого – «балтийского» – кластера, в свою очередь, также подразделяются на более мелкие группировки

- популяции Финского залива и Ладожского озера,
- популяции пресноводного лосося из бассейна Онежского озера

Среднее значение генетических различий при попарных сравнениях популяций составило $D_N=0,012$, а максимальный уровень генетической дивергенции, полученный при сопоставлении популяции из реки Свирь (бассейн Ладожского озера) и рек Онежского озера, достигает значения $D_N=0,034$

Выявленная существенная генетическая дифференциация в пределах «балтийского» кластера, свидетельствует о некоторой искусственности объединения в единую группировку популяций Финского залива Балтийского моря, Ладожского и Онежского озер Несмотря на очевидную географическую связь данных водоемов и единство происхождения населяющих их лососей, за прошедшее в послеледниковый период времени популяции лососей Ладожского и Онежского озер, вероятно, успели значительно дивергировать генетически от исходной «балтийской» группировки.

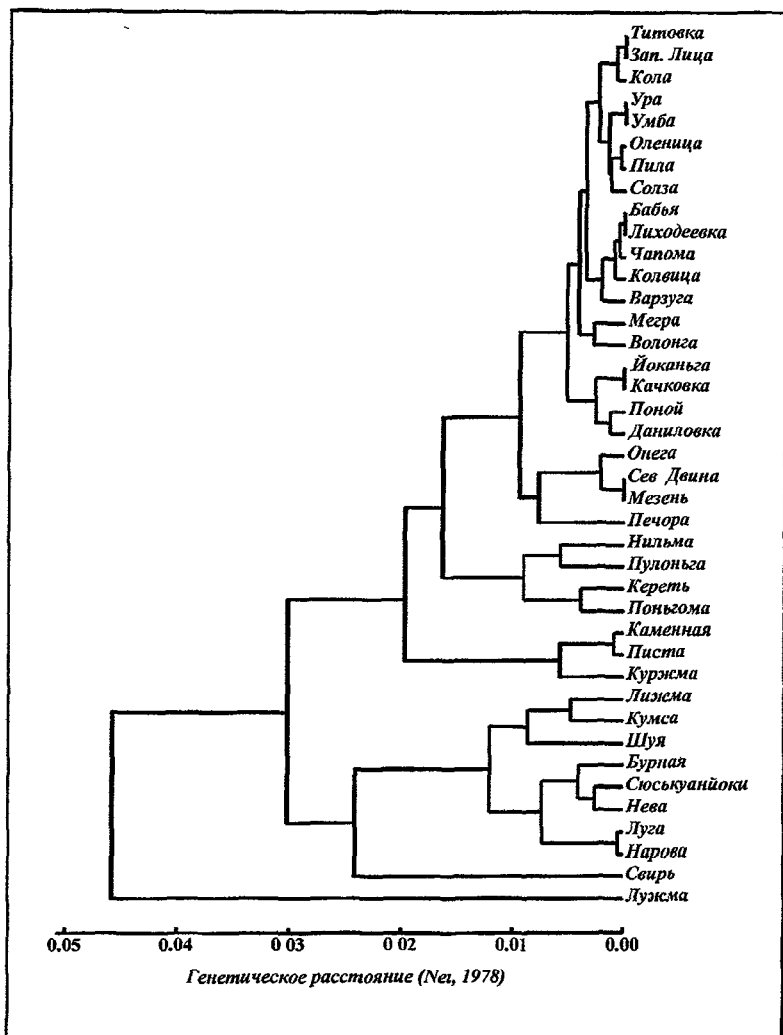


Рисунок 3 Дендрограмма генетических расстояний между популяциями атлантического лосося.

В пределах второго кластера также не наблюдается генетической однородности, здесь популяции лосося подразделяются на 3 дискретные группы (рисунок 3)

Генетически наиболее дифференцированной от других оказалась группа популяций из беломорских рек Карелии. Обращает на себя внимание то, что “карельские” популяции в значительной степени дифференцированы от попу-

ляций из расположенных в непосредственной географической близости рек Кольского полуострова и рек Архангельского побережья (средние значения $D_N=0,019$ и $D_N=0,024$, соответственно)

Попарное сравнение популяций в пределах собственно “карельского” кластера показывает, что составляющие его выборки не формируют однородную генетическую группировку. Средний уровень генетических расстояний между популяциями внутри кластера составляет $D_N=0,024$ (пределы варьирования $D_N=0,001-0,048$). Объясняется это, вероятно, тем, что в группу “карельских” популяций вошли также популяции пресноводного лосося из малых озер Куйто, Каменное (бассейн реки Кемь) и Сегозеро, которые вследствие своей продолжительной изоляции, значительно дивергировали генетически не только от проходных популяций вида, но и друг от друга.

Еще одну генетически дифференцированную группу составили популяции из больших речных систем Архангельского берега (рр. Онега, С Двина, Мезень и Печора). Популяции этого кластера существенно отличаются от популяций из рек Балтийского моря и Карелии ($D_N=0,026$ и $D_N=0,019$, соответственно).

Третья и самая большая группа объединяет популяции лосося из рек Кольского полуострова. В этот же кластер попали выборки лосося из малых рек Архангельского побережья (рр. Солза, Мегра и Волонга). Популяции данного кластера формируют весьма однородную генетическую группировку. Средний уровень генетических дистанций $D_N=0,004$, а максимальные значения этого индекса при попарных сравнениях не превышают значения $D_N=0,012$.

ГЛАВА 5. ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА ЛОСОСЯ ИЗ РЕК ПЕЧОРА И СЕВЕРНАЯ ДВИНА

До настоящего времени внутривидовая генетическая дифференциация атлантического лосося была описана, в основном, для популяций малых и средних рек. Практически отсутствуют данные о степени генетической подразделенности вида в крупных реках, хотя эти данные чрезвычайно важны для правильной организации промысла и природоохранной деятельности. Так, на реках Печора и Северная Двина, где до сих пор обитают одни из самых многочисленных популяций атлантического лосося, охрана и эксплуатация запасов этого вида ведутся без учета особенностей популяционно-генетической структуры. Река Печора представляет собой мощную, широко разветвленную гидрографическую сеть с множеством притоков, пригодных для обитания лосося и существенно отличающихся друг от друга по гидрологическим и климатическим условиям. Имеется 11 крупных притоков 1-го порядка, а также более 40 притоков 2-го и 3-го порядков, в которые производители лосося мигрируют для размножения, зачастую преодолевая расстояния до 1500–2000 км от устья. Река Северная Двина по количеству известных нерестовых притоков значительно превосходит даже реку Печора.

5.1. Популяционная структура лосося реки Печора.

В работе исследованы выборки лосося из 10 локальностей реки Печора, относящихся к бассейнам 8 основных притоков 1-го порядка. В большинстве исследованных нами локальностей материал для генетического анализа собирался в течение двух – пяти лет.

Показатели генетического разнообразия — количество аллелей на локус, доля полиморфных локусов и средний уровень гетерозиготности — оказались близки во всех изученных нерестовых притоках. Наиболее низкий уровень средней гетерозиготности отмечен для локальностей из верхнего течения р. Печоры — рек Илыч, Унья, Верхняя Печора.

Полиморфными в выборках лосося из р. Печоры оказались 5 локусов. Сравнительный анализ лосося из 10 нерестовых притоков выявил наличие статистически значимых различий по всем полиморфным локусам.

Величины генетических расстояний, полученные при сравнении локальностей р. Печоры, оказались невелики и лежат в пределах $D_N=0,000-0,002$. При этом максимальные оценки генетического расстояния получены при сопоставлении выборок лосося из географически удаленных районов — верховой Печоры (рр. Унья, Илыч, В. Печора) и Усинского бассейна (рр. Косью, Кожим).

Не меньший интерес представляют особенности распределения в изученных локальностях редких аллелей тех или иных полиморфных локусов. Так, аллель *AAT-57* обнаружен только у лосося, обитающего в нерестовом притоке Пижма. Аллель *IDDH-2*115*, встречающийся с относительно высокой частотой у лосося из реки Подчерем, отмечен также в единичных количествах в реках Пижма и Унья, однако отсутствует в остальных нерестовых притоках. Необходимо отметить, что данный аллель не был обнаружен в популяциях лосося из других регионов, то есть является уникальным маркером семги р. Печоры. По локусу изоцитратдегидрогеназы *IDHP-3** быстрый аллель **116* отсутствует у лосося из рек Пижма, Кедва, Кожим и Унья, в то время как в остальных нерестовых притоках этот маркер обнаружен во всех исследованных выборках. Данные факты — отсутствие или наличие (даже при относительно невысоких значениях частоты) одного из аллелей перечисленных локусов — важны в связи с тем, что эти закономерности проявились во все годы исследования.

Перечисленные особенности нашли свое отражение в дендрограмме генетического сходства изученных выборок, которые сгруппировались в кластеры в соответствии с географическим принципом (рисунок 4).

Самостоятельные, генетически отличные группы составили популяции из рек нижнего течения р. Печоры (бассейны нерестовых притоков Пижма и Ижма), среднего течения (бассейны рек Уса, Щугор, Подчерем) и верховой (бассейны рек Илыч, Унья, В. Печора). Последние оказались наиболее дивергировавшими от остальных.

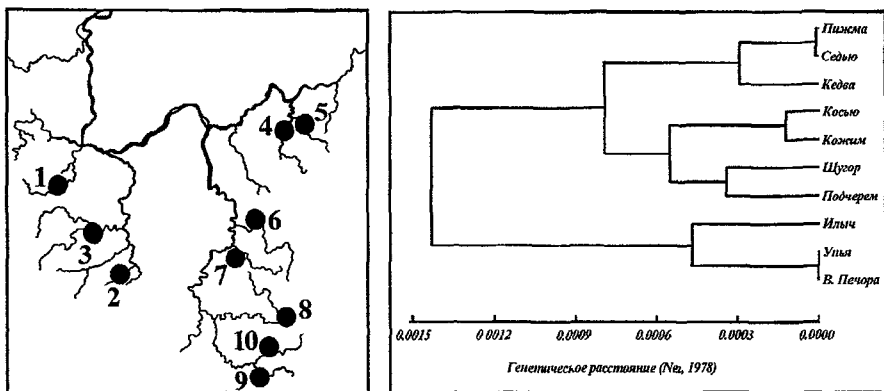


Рисунок 4 Карта-схема р Печоры и дендрограмма генетических расстояний между выборками атлантического лосося из нерестовых притоков:
 1 – Пижма, 2 – Седью, 3 – Кедва, 4 – Косью, 5 – Кожим, 6 – Щугор,
 7 – Подчерем, 8 – Илыч, 9 – Унья, 10 – Верхняя Печора

5.2. Популяционная структура лосося реки Северная Двина.

В работе исследованы выборки лосося из 6 локальностей реки Северная Двина, относящихся к бассейнам 3 притоков 1-го порядка. Во всех локальностях материал для генетического анализа был собран в течение двух-трех лет.

Уровень генетического разнообразия оказался выше в выборках из нерестовых притоков 1-го порядка рр Ваеньги и Емцы. Наиболее низкими значениями уровня гетерозиготности характеризуется лосось из рек Ледь и Падома (бассейн р. Ваги).

Сравнительный анализ лосося из исследованных 6 нерестовых притоков выявил наличие статистически значимых различий по частотам 7 из 8 проанализированных полиморфным белковых локусов. Наибольший вклад в общее генетическое разнообразие приносят 3 локуса – *AAT-4**, *sMDH-A1** и *IDDH-2**.

В Северной Двине не наблюдается генетической однородности выборок, относящихся к единому бассейну нерестовых притоков 1-го порядка. Так, при сравнении лососей, обитающих в нерестовых притоках бассейна реки Вага, выявлены статистически значимые отличия по всем 6 полиморфным локусам. Более того, в некоторой степени генетически дифференцированы оказались даже лосося из нерестовых притоков 3-го порядка рр Падомы и Волюги, впадающие в реку Устья в нескольких километрах друг от друга.

Величины генетических расстояний, полученные при сравнении локальностей р Северной Двины, лежат в пределах $D_N=0,000-0,003$. Максимальные оценки генетического расстояния получены при сопоставлении выборок лосося из рек Ледь, с одной стороны, и Волюга и Сулонда, с другой. Необходимо отметить, что эти, наиболее генетически дифференцированные локальности расположены в едином бассейне р Ваги (приток 1-го порядка р Северной Двины).

Особенности распределения редких аллелей некоторых полиморфных локу-

сов в изученных выборках также свидетельствуют об их генетической неоднородности. Аллели *ESTD-2*89* и *sMDH-B1*118* систематически встречаются в выборках лосося из бассейнов рек Емца и Ваеньга, однако отсутствуют у лосося из третьего изученного бассейна – реки Вага.

На дендрограмме генетического сходства изученные выборки распределились в соответствии с географическим принципом (рисунок 5). Лососи из нерестовых притоков реки Вага образовали единый кластер. Наиболее генетически дифференцированными от остальных оказались лососи из рек Емца и Ваеньга.

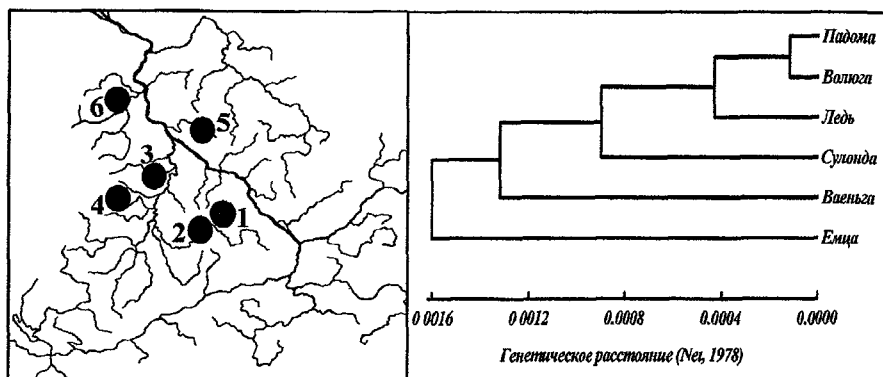


Рисунок 5 Карта-схема реки Северная Двина и дендрограмма генетических расстояний между выборками атлантического лосося из нерестовых притоков 1.– Падома, 2 – Волюга, 3 – Ледь, 4.– Сулонда, 5.– Ваеньга, 6 – Емца

Таким образом, полученные данные достаточно убедительно свидетельствуют в пользу предположения о сложной генетической структуре популяций лосося в бассейнах таких больших речных систем как Печора и Северная Двина. Это позволяет рассматривать лосося рек Печора и Северная Двина как совокупность популяций, репродуктивно изолированных, приуроченных к отдельным нерестовым притокам и адаптированных к локальным условиям обитания. Генетически дифференцированные популяции могут существовать даже в нерестовых притоках 2–3-го порядков, географически очень близких друг к другу (реки Падома и Волюга, бассейн С Двины). В связи с этим должны меняться подходы к эксплуатации, воспроизводству, охране лосося этих водоемов.

ГЛАВА 6. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ЛОСОСЯ В РОССИЙСКОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА

Анализ данных по биохимической генетике лосося из популяций, представляющих разные точки обширного ареала, свидетельствует о том, что атланти-

ческий лосось характеризуется сложной популяционно-генетической структурой, которую можно представить в обобщенном виде (рисунок 6)

Вид *Salmo salar* L. имеет несколько уровней популяционно-генетической организации. Каждый из этих уровней вносит определенный вклад в общую генетическую изменчивость вида (таблица 3). На межпопуляционную изменчивость приходится более 25% общего генетического разнообразия. Около половины «межпопуляционной» вариабельности обусловлено различиями между популяциями из разных регионов (Кольский полуостров, Архангельское побережье, Карельский берег Белого моря, бассейн Балтики). Еще около 11% приходится на гетерогенность между популяциями в пределах каждого из регионов, на различия между выборками в пределах единой речной системы – 2,3%

Причины формирования сложившейся у атлантического лосося популяционно-генетической иерархии следует искать в особенностях эволюции этого вида в связи с изменениями среды обитания. Прежде всего, они связаны с геологическим прошлым той части Земного шара, где находится ареал атлантического лосося. Длительная изоляция акваторий, в которых сохранились внутривидовые группировки атлантического лосося, при последующем возобновлении стабильных гидрологических связей между водоемами приводит к переносу генетического материала вместе с расселением рыб по новым местам обитания.

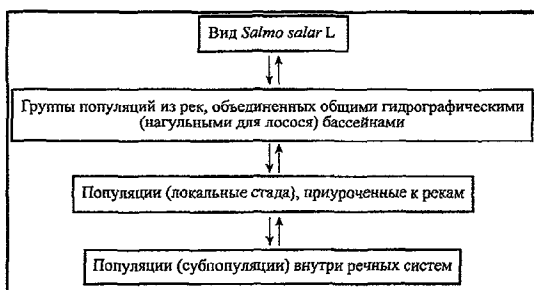


Рисунок 6. Схема иерархической подразделенности вида *Salmo salar* L.

Таблица 3

Распределение генетического разнообразия по иерархическим уровням в изученных популяциях лосося

Уровень иерархии		Относительное генное разнообразие (%)
межпопуляционный	между регионами	12,1
	между реками в пределах регионов	11,3
	между притоками в пределах речной системы	2,3
внутрипопуляционный	в пределах выборок	74,3

Наибольшие генетические различия наблюдаются между пулами популяций, обитающих по обе стороны Атлантики, — в реках Европы и Северной Америки, что свидетельствует в пользу предположения о дивергенции вида на эти две группировки в период Плейстоцена. По данным разных авторов временные промежутки дивергенции североамериканских и европейских популяций датируются от 200 тысяч до 1 миллиона лет (Verspoor et al, 2005). В ходе дальнейшей эволюции каждая из двух группировок формировалась самостоятельно, поскольку на этом уровне иерархической соподчиненности вида их репродуктивная изоляция менее всего могла подвергаться регулярным нарушениям.

Несомненно, в пределах каждого из континентов основным фактором, повлиявшим на последующее становление современной популяционно-генетической структуры атлантического лосося (как и многих других видов), явились периоды оледенения и последующего отступления ледников. Наступающий ледник вызывал гибель всего живого, либо оттеснял водную флору и фауну в приледниковые водоемы. В период последнего оледенения, эти водоемы, сыгравшие роль рефугиумов, окаймляли южную кромку ледникового щита. В них, наряду с другими видами рыб, входящими в состав современной ихтиофауны северных водоемов, сохранился и лосось.

В данном исследовании мы проанализировали и представили наиболее вероятные пути заселения лососем водоемов российской части ареала — Баренцева, Белого и Балтийского морей. Вопрос о реколонизации атлантическим лососем бассейна Балтийского моря обсуждался неоднократно (Koljonen et al, 1999; Nilsson et al., 2001, Saisa et al, 2005). По нашему мнению, реки российской части Балтийского моря были заселены лососем из одного или нескольких приледниковых водоемов, располагавшихся к югу от современной береговой линии Балтики. Балтийский лосось прошел сложную историю последовательных адаптаций к условиям обитания, поскольку водоемы-убежища, располагавшиеся на месте современного Балтийского моря, характеризовались чередованием пресноводных, морских и солоноватоводных фаз.

В результате длительного периода изоляции в опресненных приледниковых водоемах у балтийского лосося произошла потеря части генофонда вида *Salmo salar*, что, в общем, характерно именно для пресноводных (озерных) популяций вида. Уровень генетического разнообразия по индексу гетерозиготности в популяциях балтийского лосося почти в 1,5 раза ниже, чем в популяциях Кольского полуострова ($H=0,042$ и $H=0,065$, соответственно).

Существует предположение о том, что часть рек Балтийского моря была реколонизована из Восточной Атлантики. Об этом свидетельствует тот факт, что в популяциях Ботнического залива присутствуют генетические маркеры, типичные для «атлантической» линии лосося. Однако в юго-восточной части Балтийского моря, к которой относятся реки России, эти маркеры не обнаружены. Факт реколонизации рек южной части Балтийского моря из единого рефугиума подтверждается данными ДНК-анализа во всех популяциях данного региона: встречается единственный гаплотип митохондриальной ДНК, являющийся, по мнению ряда авторов, маркером «балтийской» линии лосося (Nilsson et al, 2001).

Реколонизация лососем Ладожского и Онежского озер, по нашему мнению, могла произойти из самостоятельных, не связанных с Балтийским морем, приледниковых водоемов. Уровень полиморфизма локусов у лосося Ладожского и Онежского озер оказался существенно ниже, чем в популяциях Балтийского моря ($P=8,9$, $P=13,3$ и $P=18,9$, соответственно). На дендрограмме популяции озерного лосося группируются в отдельные кластеры (рисунок 3). Полученные нами данные хорошо согласуются с существующей гипотезой о том, что Ладожское и Онежское озера были заселены лососевыми рыбами из самостоятельных приледниковых водоемов (Кудерский, 1990).

Вопрос о реколонизации лососем бассейнов Белого и Баренцева морей до сих пор остается наиболее сложным и дискутируемым. Особенности распределения частот генетических маркеров неоспоримо свидетельствуют о заселении лососем этой части региона, как минимум из 3-х независимых рефугиумов.

Один из них – «атлантический» – располагался в водах Северной Испании (Consuegra et al, 2002). По мнению других авторов, эта область распространялась до южной Британии (Verspoor et al, 2005). Именно из этого рефугиума, практически по единому мнению всех исследователей, произошла экспансия вида вдоль Восточноатлантического побережья. В процессе отступления ледникового покрова рыбы заселяли освобождающиеся ото льда акватории. Атлантический лосось, перемещаясь к северу, освоил нерестовые реки Ирландии, Британии, Норвегии, а также водоемы Кольского полуострова и часть рек Карельского и Архангельского побережий Белого моря. В реках Кольского полуострова и, в меньшей степени, Карелии и Архангельской области, встречается аллель локуса малатдегидрогеназы *sMDH-B2*118*, широко распространенный в популяциях Атлантики. Дополнительное подтверждение данной гипотезы получено при изучении митохондриальной ДНК в реках Кольского полуострова и некоторых малых реках Архангельского побережья встречается гаплотип ВВВА, являющийся маркером «атлантической» линии (Nilsson et al., 2001, Asplund et al, 2004).

Вторым убежищем, явившимся источником для заселения рек Белого и Баренцева морей, оказались приледниковые водоемы, размещавшиеся у южного края ледникового щита, покрывавшего северо-западную часть современной России. Известно, что приледниковые водоемы от Центральной Европы до Урала не были объединены водным стоком в единую систему, а распадались на ряд изолированных озер, соединявшихся кратковременными гидрологическими связями в период дегляциации (Квасов, 1975). Благодаря такой особенности еще в ледниковый период формировались различия между популяциями лосося из отдельных групп приледниковых водоемов, что в настоящее время находит отражение при изучении генетической структуры вида. Лососи из южных приледниковых водоемов перемещались к северу и заселяли реки Белого и Баренцева морей, в первую очередь такие большие речные системы как Печора, Мезень, Северная Двина и Онега (Kudersky, Тітов, 2003). О давней обособленности этих популяций свидетельствует отсутствие в них гаплотипов ВВВА, характерных для «атлантической» линии вида. Лосось из южных приледниковых водо-

емов, вероятно, заселял и другие реки, впадающие в Баренцево и Белое моря по Архангельскому и Карельскому побережьям

Наконец, третьим источником заселения лососем водоемов северной части Российской территории явился Североамериканский континент. Для популяций Кольского полуострова, а также некоторых популяций Карельского и Архангельского побережья Белого моря обычен аллель локуса *ESTD** (Kazakov, Titov, 1991, 1993, Skaala et al., 1998, Tonten et al., 2005), который является маркером североамериканских популяций и практически фиксирован на этом континенте (Bourke et al., 1997; Skaala et al., 1998). Аллель отсутствует в остальных европейских популяциях, что исключает его попадание в реки Беломорско-Баренцево-морского бассейна из «атлантического» рефугиума. Кроме того, при изучении митохондриальной ДНК, в популяциях Кольского полуострова были обнаружены гаплотипы NFLD, типичные для североамериканского лосося (Asplund et al., 2004).

ВЫВОДЫ

1. По результатам электрофоретического исследования популяций атлантического лосося по 32-м ферментным локусам выявлены не описывавшиеся ранее в других работах аллели локусов *IDDH-1,2**, *LDH-A2**, *sMDH-A1**

2. Анализ параметров генетической изменчивости показал значительную гетерогенность популяций лосося из разных частей ареала по величинам уровня полиморфизма ($P=6,7-23,3$) и относительной гетерозиготности ($H=0,019-0,077$). Минимальные значения этих индексов характерны для пресноводных популяций Карелии, максимальные – для популяций Кольского полуострова.

3. Наиболее высокие значения генетической дивергенции выявлены между популяциями Балтийского и Беломорско-Баренцево-морского бассейнов ($D_N=0,030$). В пределах Балтийского бассейна наиболее дивергировавшимися от остальных оказались популяции Онежского озера. Лососи Беломорско-Баренцево-морского бассейна группируются в 3 дифференцированных кластера – популяции Кольского полуострова, Карелии и больших речных систем Архангельского побережья (рр. Онега, Северная Двина, Мезень, Печора).

4. Полученные данные свидетельствуют о существовании значительной внутривидовой подразделенности лосося в больших речных системах (рр. Печора и Северная Двина). Лососей этих водоемов можно рассматривать как совокупность репродуктивно изолированных и приуроченных к отдельным нерестовым притокам популяций.

5. Сложная популяционно-генетическая структура атлантического лосося, в значительной степени, сформировалась в процессе реколонизации этим видом нерестовых рек российской части ареала. Бассейн Балтийского моря был заселен лососем из «балтийского» приледникового водоема, а в бассейны Онежского и Ладожского озер лосось проник из других, изолированных приледниковых убежищ. Реки Белого и Баренцева морей были реколонизованы лососем, как минимум, из трех самостоятельных рефугиумов, располагавшихся на Североамериканском континенте, в Атлантике (Западная Европа) и на территории Северо-запада России.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Титов С.Ф.** 1984 Электрофоретический анализ молоди природной и заводской семги бассейна Белого моря//Тез докл науч-практич конф. "Проблемы рыбоводно-хозяйственных исследований внутренних водоемов Северо-Запада Европейской части СССР" Петрозаводск С 73–74

2. **Титов С.Ф.** 1988. Особенности генетического мониторинга заводских популяций атлантического лосося (*Salmo salar* L.)//Тез докл 3 Всесоюз совещ по лососевидным рыбам Тольятти С 331–333

3. **Титов С.Ф.**, Казаков Р В 1989. Генетический анализ атлантического лосося *Salmo salar* L. в связи с задачами искусственного формирования популяций//В кн. Генетика в аквакультуре Л С 179–186

4 Kazakov R V, **Titov S.F.** 1991 Geographical patterns in the population genetics of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. on U S S R territory, as evidence for colonization routes//J Fish Biol Vol 39 N 1 P 1–6

5 Казаков Р В., **Титов С.Ф.** 1992. Популяционно-генетический аспект рыбоводной работы в лососеводстве Европейского Севера СССР//Сб научн трудов ГосНИОРХ. Вып 304 С 109–124

6 **Титов С.Ф.**, Казаков Р В, Антонова В П 1992 Внутрипопуляционная дифференциация атлантического лосося реки Печоры I Особенности генетического полиморфизма в Верхней Печоре и Пижме//Сб научн Трудов ГосНИОРХ Вып.304 С 146–155

7. **Титов С.Ф.** 1992 Особенности мониторинга генетической структуры заводских популяций атлантического лосося *Salmo salar* L.//Сб научн трудов ГосНИОРХ Вып 304 С 156–163

8 Кудерский, Л А, Казаков Р В, **Титов С.Ф.** 1992 Пути формирования Европейской части ареала атлантического лосося *Salmo salar* L.//Материалы VI Совещания «Вид и его продуктивность в ареале» С-Пб Гидрометеиздат С 180–182

9 Kazakov R V., **Titov S.F.** 1993 Population genetics of salmon, *Salmo salar* L, in northern Russia//Aquacult Fish Mngmt Vol 24 P. 495–506

10 Казаков Р В, **Титов С.Ф.** 1995 Популяционно-генетическая структура атлантического лосося//Научные тетради ГосНИОРХ N 1 45 с

11 Казаков Р В., **Титов С.Ф.** 1998 Популяционно-генетическая организация вида *Salmo salar* L //В кн. Атлантический лосось С –Пб Наука С 43–72

12 Студенов И И, **Титов С.Ф.**, Семенова О В 2000 Состояние естественного воспроизводства и популяционная структура атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в притоках р Ваги и реке Ваеньге (бассейн р Северной Двины) //Вопросы ихтиологии Т 41 N 2 С 210–219

13 Nilsson J., Gross R, Asplund T, Dove O, Jansson H, Kellanem J, Kohlmann K., Löytynoja A, Neelsen E E, Paaver T, Primmer C R., **Titov S.**, Vasemagi A, Veselov A, Öst T, Lumme J 2001 Matrilinear phylogeography of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Europe and postglacial colonization of the Baltic Sea area//Molecular Ecology Vol 10 P. 89–102

14 Kudersky L A , Titov S F 2003 The lines of range evolution in the European subspecies of Atlantic salmon//Atlantic salmon biology, conservation and restoration. Petrozavodsk P 69–76.

15 Asplund T , Veselov A , Primmer C R., Bakhmet I., Potutkin A., Titov S , Zubchenko A., Studenov I , Kaluzchin S., Lumme J. 2004 Geographical structure and postglacial history of mtDNA haplotype variation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) among rivers of the White and Barents Sea basins//Annales Zoologica Fennica Vol. 41. P. 465–475

16 Titov S. 2004. Protection of valuable and vulnerable fish//Sustainable Use, Management and Monitoring of Fish Resources in Lake Ladoga (ed M Viljanen) Reports of Karelian Institute, University of Joensuu N 4 P 81–86

17 Tonteri A , Titov S , Veselov A , Zubchenko A , Koskinen M T , Lesbarreres D , Kaluzchin S , Bakhmet I , Lumme J , Primmer C.R 2005 Phylogeography of anadromous and non-anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar* L) from northern Europe based on multiple classes of molecular markers//Annales Zoologica Fennica Vol. 42 P 1–22

18 Verspoor E , Beardmore J A., Consuegra S , Garcia de Leaniz C , Hindar K , Jordan W C , Koljonen M -L , Makhrov A A , Paaver T., Sanchez J A., Skaala Ø., Titov S. and Cross T F 2005 Population structure in the Atlantic salmon: insights from 40 years of research into genetic protein variation//J Fish Biol Vol 67 (Suppl A) P. 3–54

Подписано в печать 28.09.2007
Формат 60x84 1/16 Бумага офсетная. Печать офсетная.
Тираж 100 экз. Усл. п. л. 1,3.
Заказ № 634.

Отпечатано в ООО «Издательство "ЛЕМА"»
199004, Россия, Санкт-Петербург,
В О., Средний пр., д.24, тел./факс: 323-67-74
e-mail: izd_lemma@mail.ru