

А.В. КАРЕЛОВ^{1,2}, Л.А. ПИЛИПЕНКО¹, Н.А. КОЗУБ^{1,2}, Р.А. БОНДУС³,
А.И. БОРЗЫХ¹, И.А. СОЗИНОВ¹, Я.Б. БЛЮМ², А.А. СОЗИНОВ^{1,2}

¹ Институт защиты растений НААН Украины, Киев

E-mail: hromogen-black@ukr.net

² ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины, Киев

³ Устимовская исследовательская станция растениеводства

АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К ЗОЛОТИСТОЙ НЕМАТОДЕ (*GLOBODERA ROSTOCHIENSIS*) H1 СРЕДИ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* SSP. *TUBEROSUM*) УКРАИНСКОЙ И МИРОВОЙ СЕЛЕКЦИИ

Проведено исследование аллельного состояния молекулярного маркера TG689 гена устойчивости H1 к патотипам Ro1 и Ro4 золотистой картофельной цистообразующей нематоды (*Globodera rostochiensis*) среди сортов картофеля (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) украинской и мировой селекции. Аллельное состояние маркера TG689 определено при помощи ПЦР с образцами ДНК, выделенными из клубней картофеля, и праймерами, одна пара которых фланкировала аллель-специфический участок, а другая служила для контроля качества ДНК. Среди проанализированных 77 сортов картофеля украинской и мировой селекции у 74 % украинских и 90 % зарубежных найден аллель маркера, ассоциированный с устойчивостью по H1-типу, хотя для некоторых сортов при этом характерна полевая чувствительность к золотистой картофельной нематоды. Полученные данные свидетельствуют о наличии устойчивости по H1-типу к патотипам Ro1 и Ro4 золотистой нематоды среди сортов картофеля украинской селекции и эффективности использованного маркера в рамках точности, заявленной его разработчиками.

Ключевые слова: золотистая нематода, *Globodera rostochiensis*, картофель, *Solanum tuberosum*, молекулярные маркеры, гены устойчивости, карантинный объект.

Введение. золотистая картофельная цистообразующая нематода *Globodera rostochiensis* Woll. является опасным паразитом картофеля (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) и карантинным объектом [1]. Этот многоклеточный облигатный паразит служит причиной регулярных потерь около 12 % урожая картофеля в мире [2], тогда как в отдельных регионах может причинять потери от 10–15 % [3–5] до 50–

60 % и более [6, 7]. Он распространен в почве и наиболее поражает корни растений [5]. Благодаря способности образовывать цисты этот паразит может сохранять жизнеспособность в состоянии покоя на протяжении нескольких лет, что делает севооборот малоэффективным способом борьбы с ним [8]. Вместе с тем комплексная стерилизация почвы требует значительных затрат при увеличении пестицидной нагрузки и общей интоксикации [9]. Поэтому в мире широко используются сорта *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, несущие гены устойчивости против золотистой картофельной нематоды, преимущественно происходящие от диких сородичей картофеля [10]. Эти гены обуславливают устойчивость по различному типу [11–18], однако наличие взаимодействия ген-на-ген доказано лишь для гена H1 [19] (он обуславливает устойчивость к патотипам Ro1 и Ro4 золотистой нематоды [20] по сверхчувствительному типу [21] и сохраняет свои свойства уже достаточно длительное время [9]).

Поскольку на территории Украины *G. rostochiensis* представлена патотипом Ro1, для исследования нами выбран молекулярный маркер, связанный именно с этим геном. Источником устойчивости, связанной с геном H1, считают дикорастущий подвид *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC 1673, сам ген локализован на хромосоме 5 картофеля при помощи RFLP маркеров CP113 и CD78 [22, 23] и широко внедрен в коммерческие сорта картофеля мировой селекции [10]. В дальнейшем различные исследователи локализовали на этой хромосоме еще ряд генов, которые обуславливают устойчивость к раз-

личным патотипам и видам нематод, некоторым вирусам и формируют несколько кластеров [14–17]. Кроме того, был определен ряд генетических маркеров (STS, SCAR и SSR), аллельное состояние которых указывает на полную или же частичную устойчивость картофеля к золотистой нематоду по *HI*-типу [24–29]. Мы выбрали условно-кодминантный SCAR маркер *TG689*. Информация по точному генетическому расстоянию от него к локусу *HI* нами не найдена, однако этот маркер был валидирован другими исследователями с помощью анализа более 100 сортов картофеля российской и мировой селекции [27].

Цель настоящей работы – исследование аллельного состояния молекулярного маркера *TG689* гена устойчивости *HI* к золотистой картофельной цистообразующей нематоду среди сортов картофеля украинской и мировой селекции.

Материалы и методы. Проанализированы 77 сортов картофеля украинской и мировой селекции из коллекций Устимовской исследовательской станции Института им. В.Я. Юрьева НААН Украины и Института картофелеводства НААН Украины (таблица). В качестве положительного контроля (наличие аллеля гена *HI*, соответствующего устойчивости) исполь-

Таблица 1. Устойчивость к золотистой картофельной цистообразующей нематоду по аллельному состоянию молекулярного маркера *TG689* локуса *HI* и по опубликованным результатам полевых исследований

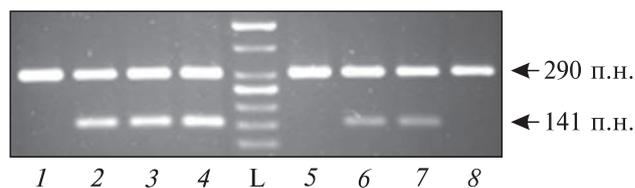
№ п.п	Сорта	Аллельное состояние маркера <i>TG689</i> , связанного с геном устойчивости <i>HI</i>	Полевая устойчивость [30, 31]
<i>Контроль</i>			
1	Sante	+	R
	Скарбныця	–	S
<i>Сорта украинской селекции</i>			
2	Воля, Днипрянка, Доброчын, Забава, Загадка, Ластивка, Левада, Легенда, Лищина, Мандривныця, Мелодия, Молодижна, Обрий, Партнер, Селянська, Словянка, Тетерив, Фазан, Фантазия, Чернигивська рання	+	R
3	Киммерия, Мавка, Обериг, Оваця, Повинь, Пролисок, Случ, Фазан, Щедрык	+	?
4	Вернисаж, Былына, Луговська, Подолянка, Поляна, Червона рута	+	S
5	Бордяньська рожева, Вира, Дубравка, Кобза, Малиньська била, Свальявська, Свитанок киевский, Серпанок, Слава, Тирас, Явир	–	S
6	Экзотик, Петровська	–	?
<i>Сорта зарубежной селекции</i>			
7	Agave, Amarosa, Arrow, Asterix, Bella Rosa, Delikat, Finka, Karatop, Karlana, Kuras, Kuroda, Latona, Marfona, Minevra, Molli, Picasso, Riviera, Saturna, Solara	+	R
8	Laura, Miranda, Roko, Белорусская 3, Roxana	+	?
9	Jaerla, Impala	–	S
10	Melody	–	R
11	Romano, Satina, Невская	+	S

Примечание. R – сорта, устойчивые к патотипу *Ro1* золотистой нематоды согласно опубликованным полевым исследованиям; S – чувствительные сорта; ? – опубликованных данных нам найти не удалось; «+» – наличие ампликонов длиной 141 п.н., что соответствует устойчивости по *HI*-типу; «–» – отсутствие таких ампликонов, что указывает на отсутствие устойчивости.

зовали сорт Sante, в качестве отрицательного (отсутствие аллеля гена *HI*, соответствующего устойчивости) – сорт Скарбныця. ДНК выделяли из клубней картофеля (навеска биомассы – 60–140 мг) при помощи наборов для выделения Diatom™ DNA Prep 100 (торговый представитель в Украине – фирма NEOGENE®) по стандартному протоколу. Для определения алельного состояния маркера *TG689* использовали пару праймеров *TG689-allele-specific* (5'-TAAACTCTTGGTATAGCCTAT-3') и *TG689-indel* 12 (5'-CAATAGAATGTGTTGTTTCACCA-A-3'), с которыми в случае алельного состояния маркера, ассоциируемого с устойчивостью по *HI*-типу, амплифицируются фрагменты длиной 141 п.н. Для контроля качества ДНК в реакцию добавляли пару праймеров *BCH-F2* (5'-CGTTTGGCGCTGCCGTAAGTT-3') и *BCH-R2* (5'-CATGACATAGTTTGAATTTGAGTC-3'), с которыми во всех случаях амплифицировались фрагменты длиной 290 п.н. (рисунок). Условия ПЦР: предварительный отжиг 6 мин при 94 °C, далее 35 циклов (20 с при 94 °C, 20 с при 55 °C и 30 с при 72 °C), после чего финальная элонгация при 72 °C на протяжении 5 мин (в соответствии с [27]). ПЦР проводили при помощи наборов GenPak® PCR Core (торговый представитель в Украине – фирма NEOGENE®) согласно рекомендациям производителя. Результаты ПЦР визуализировали электрофорезом в 2–2,5%-ном агарозном геле с буфером 1 × TBE и красили бромистым этидием.

Результаты исследования и их обсуждение. Из 48 исследованных сортов картофеля украинской селекции у 20 известно наличие полевой устойчивости к золотистой нематодe (таблица, строка 2) [30, 31], статус 9 сортов не выяснен (строка 3). Вместе с тем у 35 сортов картофеля идентифицирован «+»-аллель маркера *TG689* (строки 2–4), ассоциированный с устойчивостью по *HI*-типу, что составляет приблизительно 74 % всех проанализированных украинских сортов.

Среди 30 исследованных зарубежных сортов 20 являются устойчивыми к нематодe в соответствии с опубликованными результатами полевых исследований (строки 7 и 10) [30]; данные по устойчивости 5 сортов нами не найдены (строка 8). В образцах 27 сортов из



Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР с образцами ДНК, выделенной из сортов картофеля украинской селекции, и праймеров, фланкирующих участок *TG689* и *BCH* (агарозный 2%-ный гель, краситель – бромистый этидий); L – маркер молекулярных масс 50 bp ladder; 1 – сорт Скарбныця; 2 – Sante, 3 – Воля; 4 – Случ; 5 – Явир; 6 – Тетерив; 7 – Селяньска; 8 – Свалявська

30 зарубежных найден «+»-аллель маркера *TG689* (строки 7, 8, 11), что составляет приблизительно 90 %.

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии устойчивости к патотипам *Ro1* и *Ro4* золотистой нематоды по *HI*-типу среди сортов картофеля украинской селекции, что предположительно объясняется участием при их создании зарубежных сортов, несущих этот ген [10], и наличием направленного отбора на устойчивость при селекции картофеля в Украине.

Следует отметить достаточно высокую точность маркера. Так, с помощью быстрого и недорогого анализа удалось определить устойчивость к нематодe у 51 сорта из 62 проанализированных, которые имели точные данные по полевой устойчивости, что составляет приблизительно 83 %. Ни один сорт украинской селекции с «-»-аллельным состоянием маркера *TG689* не является устойчивым к патотипу *Ro1* золотистой нематоды согласно проанализированным нами данным литературы, что, однако, не исключает наличия у «чувствительных» сортов устойчивости к другим патотипам нематоды или же частичной устойчивости. Сорта, представленные в строке 6 (таблица), не являются обязательно восприимчивыми к золотистой нематодe, поскольку устойчивость к ней может также быть обусловлена генами частичной или полной устойчивости [11–17]. Такие гены могут присутствовать в сортах украинской селекции: например, у сорта Melody, проявляющего полевую устойчивость к золотистой нематодe, согласно опубликованным полевым исследова-

ниям нами определено аллельное состояние маркера, связанное с чувствительностью к этой нематоды.

По результатам исследований следует рекомендовать проверку девяти сортов, представленных в строке 3, на полевую устойчивость к золотистой цистообразующей нематоды. Что касается сортов, представленных в строках 4 и 11, то наличие отличий между данными по аллельному состоянию маркера и полевым статусом сортов картофеля было отмечено и исследователями, которые проводили валидацию маркера. Так, согласно их результатам у сортов Башкирский, Даренка, Загадка, Малиновка, Памяти Рогачева и Солнечный идентифицирован «+»-аллель маркера, однако эти сорта обладали умеренной устойчивостью к золотистой нематоды [27]. Сорта Подольнка и Кобза по данным полевых исследований устойчивости в условиях Полесья показали достаточно большой процент потерь урожая [31], что можно объяснить или слишком высокими инфекционными фонами, на которых невозможно определить так называемую «умеренную устойчивость» (приписываемую сортам Башкирский и др. [27]), или (что более вероятно) кроссинговером между молекулярным маркером *TG689* и локусом *H1*. Отдельно стоит отметить сорт Impala: он является устойчивым в соответствии с мировыми базами данных, несет «+»-аллель маркера *TG689* [27], однако согласно полевым исследованиям в Украине является чувствительным к золотистой нематоды [30], а согласно нашим исследованиям несет «-»-аллель маркера.

Для опровержения или подтверждения полученных результатов следует проводить более глубокое и масштабное исследование сортов картофеля, выращиваемых в Украине, при помощи молекулярных маркеров генов устойчивости к золотистой нематоды и другим патогенам, охватив весь комплекс разработанных на сегодняшний день молекулярных маркеров генов устойчивости. Молекулярные маркеры предлагается внедрить в селекционный процесс с целью упрощения и ускорения отбора образцов, несущих целевые аллели соответствующих генов. Сорта, у которых определен «+»-аллель маркера *TG689* и которые показали полевую устойчивость к золотистой

нематоды, следует рекомендовать к использованию в селекционном процессе в качестве источников устойчивости по *H1*-типу.

A.V. Karelov, L.A. Pylypenko, N.O. Kozub, R.O. Bondus, O.I. Borzyh, I.O. Sozinov, Ya.B. Blume, O.O. Sozinov

Institute of Plant Protection of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: plant_prot@ukr.net, hromogen-black@ukr.net

ALLELIC STATE OF THE MOLECULAR MARKER FOR THE GOLDEN NEMATODE (*GLOBODERA ROSTOCHIENSIS*) RESISTANCE GENE *H1* AMONG UKRAINIAN AND WORLD CULTIVARS OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* SSP. *TUBEROSUM*)

The purpose of our investigation was determination of allelic state of the *H1* resistance gene against the pathotypes *Ro1* and *Ro4* of golden potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*) among Ukrainian and world potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) cultivars. The allelic condition of the *TG689* marker was determined by PCR with DNA samples isolated from tubers of potato and primers, one pair of which flanks the allele-specific region and the other one was used for the control of DNA quality. Among analyzed 77 potato cultivars the allele of marker associated with the *H1*-type resistance was found in 74 % of Ukrainian and 90 % foreign ones although some of those cultivars proved to be susceptible to the golden potato nematode in field. The obtained data confirm the presence of *H1*-resistance against golden nematode pathotypes *Ro1* and *Ro4* among the Ukrainian potato cultivars and efficiency of the used marker within the accuracy that has been declared by its authors.

A.V. Karelov, L.A. Pylypenko, N.A. Kozub, R.A. Bondus, O.I. Borzyh, I.O. Sozinov, Ya.B. Blum, O.O. Sozinov

АЛЛЕЛЬНИЙ СТАН МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА ГЕНА СТИЙКОСТІ ДО ЗЛОТИСТОЇ НЕМАТОДИ (*GLOBODERA ROSTOCHIENSIS*) *H1* СЕРЕД СОРТІВ КАРТОПЛІ (*SOLANUM TUBEROSUM* SSP. *TUBEROSUM*) УКРАЇНСЬКОЇ ТА СВІТОВОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Досліджували алельний стан молекулярного маркера *TG689* гена стійкості *H1* до патотипів *Ro1* й *Ro4* золотистої картопляної цистоутворюючої нематоди (*Globodera rostochiensis*) серед сортів картоплі (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) української та світової селекції. Алельний стан маркера *TG689* визначали за допомогою мультиплексної ПЛР зі зразками ДНК, виділеними із бульб картоплі, та праймерами, одна пара яких фланкувала алель-специфічну ділянку, інша слугувала для контролю якості ДНК. Серед

проаналізованих 77 сортів картоплі української та світової селекції у 74 % українських і 90 % зарубіжних був знайдений алель маркера, асоційований із стійкістю за *H1*-типом, хоча для декількох з цих сортів при цьому характерна польова чутливість до золотистої картопляної нематоди. Отримані дані свідчать про наявність *H1*-стійкості до патотипів *Ro1* й *Ro4* золотистої нематоди серед сортів картоплі української селекції та ефективність використаного маркера в рамках точності, декларованої його розробниками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *EPPO A2* List of pests recommended for regulation as quarantine pests (version 2012-09) // The Site of the European and Mediterranean Plant Protection Organization [http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm]
2. *Urwin P.E., Green J., Atkinson H.J.* Resistance to *Globodera* spp. in transgenic *Solanum tuberosum* cv. Desiree that express proteinase inhibitors // *Aspects Appl. Biol. (Potato cyst nematode management)*. – 2000. – **59**. – P. 27–32.
3. *Philis I.* Assessment of potato yield loss caused by the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis* // *Nematol. medit.* – 1991. – **19**. – P. 191–194.
4. *Greco N.* Potato cyst nematodes: *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* // *Nematology Circular No. 149*, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, USA, 1988. – 4 p.
5. *Brodie B.B.* Biology and distribution of potato cyst nematodes in North America and their economic impact on potato // *Potato Ass. Amer.* – 2001. – **78**. – P. 445.
6. *Trudgill D.L.* Yield losses caused by potato cyst nematodes: a review of the current position in Britain and prospects for improvements // *Ann. appl. Biol.* – 1986. – **108**. – P. 181–198.
7. *Nicol J.M., Turner S.J., Coyne D.L. et al.* Current nematode threats to world agriculture // *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions* / Eds J. Jones et al.: Springer Science+Business Media B.V., 2011. – P. 21–43.
8. *Franko J.* Potato cyst nematodes; *Globodera* spp. (Technical Information Bulletin 9). – Lima : Int. Potato Center, 1986. – 19 p.
9. *Evans K.* New approaches for potato cyst nematode management // *Nematropica*. – 1993. – **23**. – P. 221–231.
10. *Tomczak A., Koropačka K., Smant G. et al.* Resistant plant responses // *Plant cell monographs* / Eds R.H. Berg, C.G. Taylor. – Berlin : Springer, 2009. – P. 83–113.
11. *Barone A., Ritter E., Schachtschabel U. et al.* Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* // *Mol. Gen. Genet.* – 1990. – **224**. – P. 177–182.
12. *Kreike C.M., de Koning J.R.A., Vinke J.H. et al.* Quantitatively-inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii* // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – **88**. – P. 764–769.
13. *Kreike C.M., Kok-Westeneng A.A., Vinke J.H., Stiekema W.J.* Mapping of QTLs involved in nematode resistance, tuber yield and root development in *Solanum* sp. // *Theor. Appl. Genet.* – 1996. – **92**. – P. 463–470.
14. *Roupe van der Voort J., Lindeman W., Folkertsma R. et al.* A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance to gene cluster in potato // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – **96**. – P. 654–661.
15. *Williamson V.M.* Plant nematode resistance genes // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 1999. – **2**. – P. 327–331.
16. *Van der Vossen E.A.G., Roupe van der Voort J.N.A.M., Kanyuka K. et al.* Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode // *Plant J.* – 2000. – **23**. – P. 567–576.
17. *Gebhardt Ch., Valkonen J.P.T.* Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2001. – **39**. – P. 79–102.
18. *Moloney C., Griffin D., Jones P.W. et al.* Development of diagnostic markers for use in breeding potatoes resistant to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3 using germplasm derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC 2802 // *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – **120**. – P. 679–689.
19. *Janssen R., Bakker J., Gommers F.J.* Mendelian proof for a gene-for-gene relationship between virulence of *Globodera rostochiensis* and the *H1* resistance gene in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC 1673. // *Rev Nematol.* – 1991. – **14**. – P. 207–211.
20. *Kort J., Ross H., Rumpfenhorst H.J., Stone S.R.* An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* // *Nematologica*. – 1977. – **23**. – P. 333–339.
21. *Rice S.L., Leadbeater B.S.C., Stone A.R.* Change in cell structures in roots in resistance potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. 1. Potatoes with resistance gene *H1* derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* // *Physiol. Plant Pathol.* – 1985. – **27**. – P. 219–234.
22. *Gebhardt C., Mugniery D., Ritter E. et al.* Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – **85**. – P. 541–544.

23. Pineda O., Bonierbale M.W., Plaisted R.L. Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* // Genome. — 1993. — **36**. — P. 152–156.
24. Skupinova S., Vejl P., Sedlak P., Domkarova J. Segregation of DNA markers of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) resistance against *Ro1* pathotype *Globodera rostochiensis* in selected F1 progeny // Rostlinna Vyroba. — 2002. — **48**, № 11. — P. 480–485.
25. Bakker E., Achenbach U., Bakker J. et al. A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* // Theor. Appl. Genet. — 2004. — **109**. — P. 146–152.
26. Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H. et al. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato // Theor. Appl. Genet. — 2006. — **112**. — P. 1458–1464.
27. Biryukova V.A., Zhuravlev A.A., Abrosimova S.B. et al. Use of molecular markers of potato golden nematode resistance genes *H1* and *GRO1* // Rus. Agricult. Sci. — 2008. — **34**, № 6. — P. 365–368.
28. Finkers-Tomczak A., Bakker E., de Boer J. et al. Comparative sequence analysis of the potato cyst nematode resistance locus *H1* reveals a major lack of co-linearity between three haplotypes in potato (*Solanum tuberosum* ssp.) // Theor. Appl. Genet. — 2011. — **122**, № 3. — P. 595–608.
29. Galek R., Rurek M., De Jong W.S. et al. Application of DNA markers linked to the potato *H1* gene conferring resistance to pathotype *Ro1* of *Globodera rostochiensis* // J. Appl. Genet. — 2011. — **52**. — P. 407–411.
30. Осипчук А.А. (укладач) Список сортів картоплі, які занесені до державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні // Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні (станом на 01.03.2010) / Ін-т картоплярства НААН України. — К.: 2010. — 8 с.
31. Гурманчук О.В. Продуктивність нематодостійких та сприйнятливих до *Globodera rostochiensis* сортів картоплі в зоні Полісся України // Вісн. Житомир. нац. агрокол. ун-ту. — 2010. — № 2. — С. 191–196.

Поступила 31.01.13