УДК 575.224.4.633

СОЛЕУСТОЙЧИВЫЕ ФОРМЫ ГОРЧИЦЫ BRASSICA JUNCEAE, ИНДУЦИРОВАННЫЕ НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНОЙ[1]

Г. М. Федоренко[2], ***А. В. Усатов***[3], ***Л. Б. Щербакова***[4], ***Е. В. Машкина***[5]

SALT-RESISTANT FORMS OF BRASSICA JUNCEAE MUSTARD, INDUCED BY NITROSOUREA

Fedorenko G. M., Usatov A. V., Scherbakova L. B., Mashkina E. V.

Two salt-resistant SR forms of Brassica junceae mustard have been received with the application of nitrosourea. These forms don't have chlorophyll defects. SR2 and SR3 salt-resistant forms preserve constant parameters of productivity under conditions of NaCl salting compared to the control vegetation conditions as contrast to initial plants of the Donskaya-5 sort.

Results of the comparative ultrastructural analysis show that the salt influences the plastid ultrastructure of SR-2 and SR-3 lines of mustard in lesser degree in comparison with sort plants. On the contrary, the plastids of SR-2, SR-3 salt-resistant lines of mustard are functionally quite active under the conditions of stress factor action.

Повышенная концентрация солей в почве может значительно лимитировать рост и продуктивность растений. Как правило, в условиях солевого стресса происходит изменение всех звеньев метаболизма: снижается интенсивность корневого питания, фиксация углекислого газа и фотосинтетической активности; возможна денатурация белков, ингибирование ферментов биосинтеза, разрушение мембранных структур растительной клетки, что влечет за собой интенсификацию процессов перекисного окисления липидов и активацию антиоксидантных ферментов [1–3]. Гиперосмотический стресс, вызванный засолением, может также привести к повышенной генерации активных форм кислорода и программируемой смерти клеток [4–7].

Одним из основных механизмов защиты от солевого стресса является накопление в растительной клетке низкомолекулярных органических соединений, поддерживающих осмотическое давление в цитоплазме. Показана корреляция между галотолерантностью растений и уровнем накопления пролина [8–10]. Помимо пролина функцию протекторов выполняют бетаины, сахароза и другие осмопротекторы [11–14]. Немаловажную роль в галорезистентности играет поддержание внутриклеточного гомеостаза Na^+, K^+. У Arabidopsis описано семейство sos мутантов с нарушенной регуляцией транспорта Na^+, K^+, что привело к гиперчувствительности мутантов к засолению [15–17]. К компонентам защитной системы от осмотического шока относят ферменты ключевых звеньев биосинтеза осмопротекторов, белки, обеспечивающие стабильность мембран, контролирующие ионный и водный гомеостаз, ловушки активных форм кислорода [6, 18, 19]. Активизация описанных процессов, очевидно, связана с изменениями тонкого строения клеточных органелл, особенно энергообразующих (хлоропла-

[1]Работа выполнена при поддержке РФФИ р2003юг (03-01-96546).

[2]Федоренко Григорий Мефодьевич, д-р биол. наук, заведующий лабораторией ультраструктурного анализа НИИ нейрокибернетики Ростовского государственного университета, профессор.

[3]Усатов Александр Вячеславович, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики НИИ биологии Ростовского государственного университета.

[4]Щербакова Людмила Борисовна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики НИИ биологии Ростовского государственного университета.

[5]Машкина Елена Владимировна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики НИИ биологии Ростовского государственного университета.

сты, митохондрии). В связи с этим цель данной работы — исследование ультраструктуры клеток при действии хлоридного засоления на растения горчицы Brassica junceae L., различающиеся по степени галорезистентности.

1. Материал и методика

Объектом исследования служили растения горчицы сарептской Brassica junceae L. сорта Донская-5, а также солерезистентные формы SR_2 и SR_3, выделенные в M_2 после обработки семян сорта Донская-5 нитрозометилмочевиной (НММ) в концентрации 0,01%.

Для выявления солерезистентных растений был проведен модельный опыт. Семена M_2 горчицы высевали в вегетационные сосуды с засолением NaCl в концентрации 0,8 и 1%. В каждый сосуд высевали по 50 семянок при шестикратной повторности. Почва — приазовский чернозем. Влажность почвы поддерживали на уровне 60% от полной влагоемкости при помощи ежедневного полива сосудов по весу. Засоление почвы проводили дробно по 0,2% от веса сухой почвы в несколько приемов [20]. Формы SR_2 и SR_3 выделены на провокационном фоне NaCl в концентрации 0,8 и 1% соответственно.

Для электронно-микроскопического анализа использовали зрелые листья горчицы. Кусочки мезофилла листа размером 1 мм фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом в 0,1 М фосфатном буфере pH= $7,2$ в течение 4 ч при комнатной температуре с последующей дофиксацией 1% раствором OsO_4 на фосфатном буфере Миллонига pH 7,2 в течение 2 ч. Фиксированные образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне. В 70% этаноле применяли контрастирование 2% раствором уранилацетата. Заливку образцов проводили в три этапа эпоном 812 [21]. Тонкие срезы получали на ультрамикротоме BS-590 A, окрашивали насыщенным водным раствором уранилацетата в течение 5 мин. при 35°C, затем цитратом свинца по Reynolds (1963). Исследовали и фотографировали срезы в электронном микроскопе ПЭМ-100 при увеличении в 3 000, 8 000 и 20 000 раз.

Морфометрическая обработка включала в себя подсчет на единицу площади среза пластид числа гран, числа тилакоидов в гране, пластоглобул, отношение площади мембран к площади органелл [23]. Для оценки исследуемых параметров использовали специально разработанную автоматизированную систему анализа ультраструктуры клеток и соответствующее программное обеспечение [24]. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента [25].

2. Результаты и обсуждение

Известно несколько способов выделения солеустойчивых форм [26]. В качестве критерия солеустойчивости мы использовали всхожесть семян на провокационном фоне в условиях хлоридного засоления (табл. 1).

В контрольных опытах всхожесть семян исследуемых линий горчицы сходна и составляет около 90%. При засолении NaCl число проросших семян снижается, однако у линий SR_2 и SR_3 данный показатель достоверно выше по сравнению с исходным сортом Донская-5.

Одним из интегральных показателей устойчивости растений является их продуктивность в условиях стресса. В связи с этим была определена продуктивность растений горчицы в вегетационном опыте при хлоридном засолении (табл. 2). В контроле растения трех исследуемых линий имеют сходную урожайность, однако необходимо отметить, что форма SR_2 по весу 1 000 семян достоверно превосходят сортовые растения (Донская-5). В условиях 1% засоления NaCl продуктивность растений Донская-5 снижается, а SR_2 и SR_3 достоверно выше по сравнению с таковым показателем в контроле. При 1,2% засолении урожайность растений сорта Донская-5 и линии SR_2 достоверно снижается по сравнению с пресным фоном. В то же время масса семян с одного растения у обеих линий SR достоверно выше по сравнению с растениями сорта Донская-5, выросшими в этих же условиях. Таким образом, в отличие от растений сорта Донская-5, солерезистентные линии горчицы SR_2 и SR_3 в условиях хлоридного засоления сохраняют показатели продуктивности по сравнению с контрольными условиями вегетации.

Ранее было показано, что НММ служит эффективным индуктором пластидных

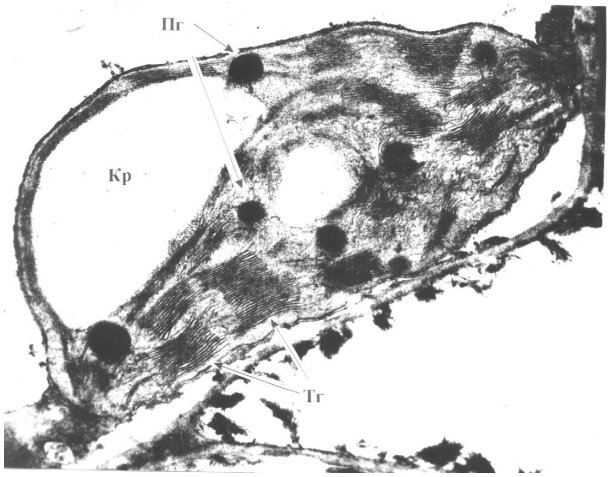

Рис. 1. Микроструктура хлоропласта горчицы Донская-5, выращенной на пресном фоне (контроль), электр. микр. ув. в 35 000 раз

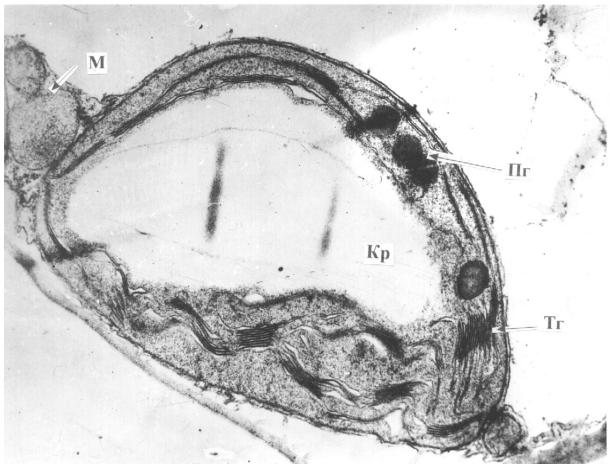

Рис. 2. Микроструктура хлоропласта солерезистентной линии SR_2, выращенной на пресном фоне, электр. микр. ув. в 35 000 раз

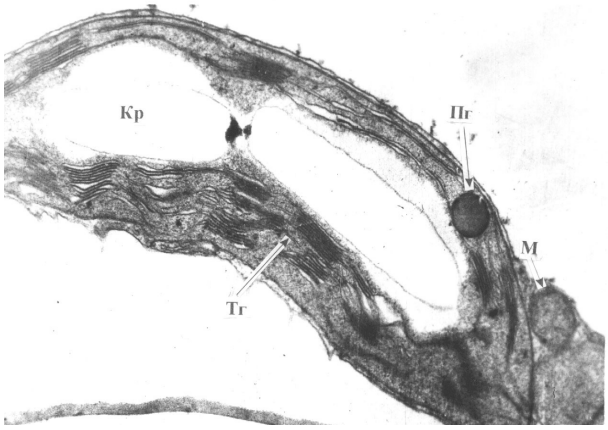

Рис. 3. Микроструктура хлоропласта солерезистентной линии SR_3, выращенной на пресном фоне, электр. микр. ув. в 35 000 раз

Таблица 1

Влияние засоления на прорастание семян горчицы в условиях вегетационного опыта

Вариант	Число семян	Число проросших семян	
		Абсол.	% ± m
Контроль			
Донская-5	300	265	88,3±1,85
SR_2	150	139	92,7±2,13
SR_3	150	137	91,3±2,30
1% NaCl			
Донская-5	400	274	$68{,}5\pm2{,}32^{а}$
SR_2	400	342	$85{,}5\pm1{,}76^{б,г}$
SR_3	400	324	$81{,}0\pm1{,}96^{а,г}$
1,2% NaCl			
Донская-5	400	246	$61{,}5\pm2{,}43^{а}$
SR_2	400	311	$77{,}7\pm2{,}08^{а,г}$
SR_3	400	306	$76{,}5\pm2{,}12^{а,г}$

Примечание: *а*, *б* — достоверно отличаются от значения в контроле ($^{а}P < 0{,}001$, $^{б}P < 0{,}01$), *г* — достоверно отличается от линии Донская-5 при соответствующих условиях роста при $P < 0{,}001$.

хлорофильных мутаций [27]. Высокая избирательность НММ в отношении хлоропластов подсолнечника была выявлена при электронно-микроскопическом анализе первой пары настоящих листьев растений M_1.

В нашем исследовании индуцированные НММ солерезистентные линии горчицы не имели фенотипически заметных хлорофильных аномалий — все растения были зелеными. Ультраструктурный анализ показал, что внутреннее строение хлоропластов зеленых растений горчицы сорта Донская-5 и двух солерезистентных линий SR_2 и SR_3 сходно и типично для хлоропластов высших растений (рис. 1–3). Хлоропласты горчицы сорта Донская-5 имеют овальную форму, хорошо развитую мембранную систему, представленную тилакоидами стромы и тилакоидами гран (Тг), которые занимают все внутреннее пространство хлоропласта. Сорт отличается большим количеством органельных рибосом; встречаются крупные крахмальные зерна (Кр), окруженные удлиненными гранами, состоящими из 4–5 ламелл. По всей строме пластид рассеяны крупные (до 0,5 мкм) осмиофильные пластоглобулы (Пг), имеющие липидную природу и являющиеся неотъемлемой частью структуры хлоропласта [28].

Для ультраструктуры мутантных линий SR_2 и SR_3, выращенных на пресном фоне, характерно наличие крупных крахмальных зерен, занимающих до 80% площади среза пластиды. Многочисленные граны с меньшим числом ламелл по сравнению с исходной линией расположены равномерно. Тилакоиды стромы редки. Пластоглобулы крупные. Митохондрии (М) не набухшие с уплощенными кристами (рис. 2, 3).

Таким образом, индуцированные НММ солерезистентные формы горчицы имеют функционально активные хлоропласты. Некоторое снижение числа тилакоидов в гранах пластид из линий SR_2 и SR_3 не приводит к уменьшению общей площади гран, а суммарное содержание крахмальных зерен и осмиофильных пластоглобул даже превосходит таковые показатели для пластид горчицы сорта Донская-5.

1% засоление NaCl существенно меняет организацию тилакоидной системы в хлоропластах растений сорта Донская-5 (рис. 4). Она представлена в основном гранами, состоящими из 5–6 тилакоидов (в контроле их количество достигало 30). Отмечено набухание межтилакоидного пространства. Крахмальные зерна практически отсутствуют, тогда как в норме они занимают до 50% площади всей стромы пластид, электронно-плотные пластоглобулы имеют незначительные размеры (0,05 мкм), а их общее количество

Таблица 2

Продуктивность растений горчицы в условиях засоления NaCl в вегетационном опыте

Вариант	Масса семян с одного растения, г± m	Масса 1 000 семян, г± m
Контроль		
Донская-5	3,24±0,12	2,37±0,05
SR_2	3,02±0,11	2,65±0,06[г]
SR_3	3,16±0,12	2,43±0,08
1% NaCl		
Донская-5	2,63±0,13	2,61±0,03[а]
SR_2	3,51±0,10[а]	2,50±0,07
SR_3	3,74±0,17[б]	2,68±0,09
1,2% NaCl		
Донская-5	1,91±0,15[а]	2,32±0,07
SR_2	2,49±0,09[а,г]	2,60±0,10
SR_3	3,12±0,11[г]	2,57±0,09

Примечание: *а*, *б* — достоверно отличаются от значения в контроле ([а]$P < 0{,}001$, [б]$P < 0{,}01$), *г* — достоверно отличается от линии Донская-5 при соответствующих условиях роста при $P < 0{,}001$.

на срез пластиды резко снижается. Клеточная мембрана со стороны вакуоли образует значительные впячивания и инвагинации. Электронно-плотные образования на поверхности клеточной стенки представлены редкими фрагментами (в контроле они были идентифицированы как гликокаликс). Эти изменения ультраструктуры хлоропластов указывают на снижение метаболической активности клеток в условиях действия стрессового фактора.

Ультраструктурный анализ солеустойчивой линии SR_2 при 1% засолении показал наличие в пластидах больших крахмальных зерен, занимающих большую часть среза (рис. 5). Тилакоидная система образована гранами с числом ламелл до 5 единиц. Межтилакоидное пространство расширено, особенно значительной величины набухание достигает в тилакоидах стромы. Пластоглобулы довольно крупные (до 0,3 мкм) и имеют неоднородную электронную плотность. Ультраструктурная организация тилакоидной системы солерезистенной линии SR_3 при 1% засолении сходна с таковой для линии SR_2, хотя общее содержание крахмальных зерен и пластоглобул снижается до 76 и 88% соответственно по сравнению с пресным фоном (рис. 6).

При 1,2% засолении NaCl набухание межтилакоидного пространства снижается, уменьшается размер крахмальных зерен, возрастает общая электронная плотность за счет включения в строму пластид значительного числа мелкодисперсных частиц. Несколько увеличивается доля пластид, не содержащих крахмальные зерна, особенно это характерно для линии SR_2. Отмечена вакуолизация цитоплазмы и отсутствие электронно-плотного слоя на клеточной стенке.

Можно заключить, что у линий SR_2 и SR_3 засоление приводит к уменьшению площади крахмальных зерен, однако данный показатель у линий SR_2 и SR_3 значительно превосходит таковой для растений сорта Донская-5. Пластоглобулы крупные, и их размеры от условий выращивания у линий SR_2 и SR_3 не меняются. Число тилакоидов в гранах пластид растений линии SR_2 при засолении не только не уменьшается, но даже увеличивается. Таким образом, в условиях засоления пластиды в клетках растений линий SR_2 и SR_3 функционально активны, о чем свидетельствует наличие большого количества крахмальных зерен и развитая система тилакоидов.

Результаты настоящей работы согласуются с данными других авторов. Так, было показано, что физиологический статус расти-

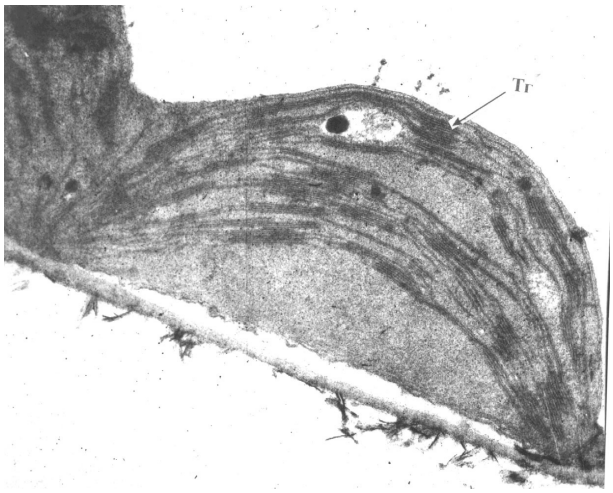

Рис. 4. Микроструктура хлоропласта горчицы Донская-5, выращенной при засолении 1% NaCl, электр. микр. ув. в 30 000 раз

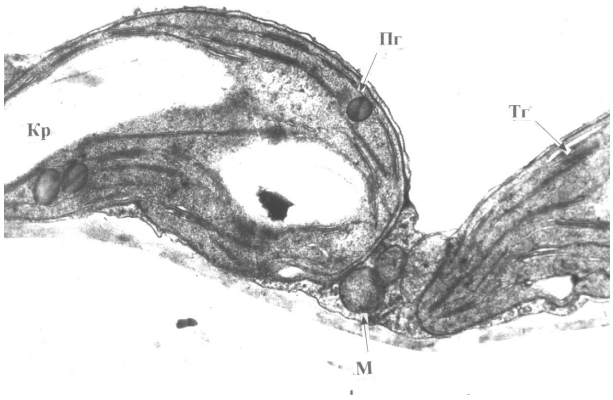

Рис. 5. Микроструктура хлоропласта солерезистентной линии SR_2 при 1% засолении NaCl, электр. микр. ув. в 35 000 раз

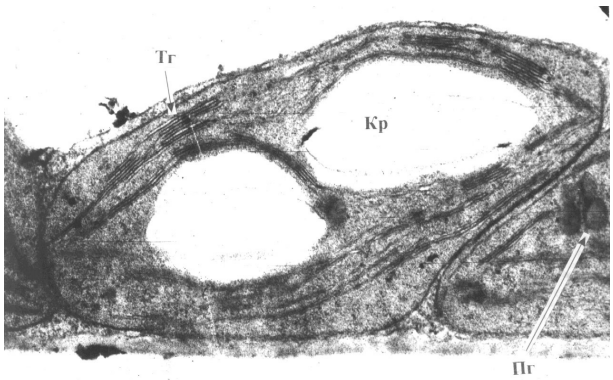

Рис. 6. Микроструктура хлоропласта солерезистентной линии SR3 при 1% засолении NaCl, электр. микр. ув. в 35 000 раз

тельной клетки во многом зависит от состояния внутриклеточных мембран и органоидов, функционирование которых определяет основные метаболические процессы [29]. Установлено, что адаптация растений к стрессу, в том числе и засолению, связана со стабилизацией мембран, функциональным изменением митохондрий, увеличением или, по крайней мере, сохранением мощности функциональных систем органелл, например, тилакоидной системы пластид.

Изменения в структуре органелл при засолении — это в основном результат их набухания, что отражает накопление в клетке и ее органеллах гидрофильных соединений и изменение водно-осмотических свойств клетки. Помимо этого при засолении в растительных клетках наблюдали изменение структуры и конфигурации ядер [30], расширение каналов эндоплазматического ретикулума [31, 32], разбухание митохондрий и крист [32]; дезориентацию гран и ламелл, вакуолизацию хлоропластов [28, 33].

Изменение ультраструктуры, как правило, имеет неспецифический характер. Однако степень изменения ультраструктуры и пороговая величина стрессового фактора, ее вызывающая, зависят от уровня устойчивости организма к стрессу. Устойчивость растений к большинству экстремальных факторов внешней среды в известной мере определяется цитоплазматическими органеллами, прежде всего митохондриями и пластидами, осуществляющими ключевые процессы метаболизма — дыхание, окислительное фосфорилирование, фотосинтез, синтез жирных кислот. Наличие собственной ДНК обусловливает возможность возникновения цитоплазматических мутаций, способных изменить норму реакции организма. Широко известны мутации устойчивости к антибиотикам и гербицидам, обусловленные изменениями в хлоропластной ДНК. У подсолнечника с помощью НММ получен солеустойчивый пластомный мутант chlorina [34].

Предварительные данные, полученные в результате реципрокных скрещиваний SR-форм с сортовыми растениями, позволяют предположить, что признак галорезистентности у этих форм имеет внеядерную природу.

Литература

1. *Tsuganea K., Kobayashia K., Niwaa Y., Ohbab Y., Wadab K., Kobayashia H.* A Recessive *Arabidopsis* Mutant that Grows Photoautotrophically under Salt Stress Shows // Enhanced Active Oxygen Detoxification. Plant Cell. 1999. № 11. P. 1195–1206.
2. *Gomez J., Hernandez Y., Jimenez A., del Rio L., Sevilla F.* Differential Response of Antioxidative Enzymes of Chloroplasts and Mitochondria to Long-Term NaCl Stress of Pea Plants // Free Radic. 1999. Res. 31. Suppl. P. 11–18.
3. *Fukushima E., Arata Y., Endo T., Sonnewald U., Sato F.* Improved Salt Tolerance of Transgenic Tobacco Expressing Apoplastic Yeast-Derived Invertase // Plant Cell Physiol. 2001. № 42(2). P. 245–249.
4. *Niu X., Bressan R., Hasegawa R., Pardo J.* Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments // Plant Physiol. 1995. № 109. P. 735–742.
5. *Zhu J., Hasegawa P., Bressan R.* Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants // Crit. Rev. Plant Sci. 1997. № 16. P. 253–277.
6. *Hasegawa P., Bressan R., Zhu JK., Bohnert H.* Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2000. № 51. P. 436–499.
7. *Huh G., Damsz B., Matsumoto T., Reddy M., Rus A., Ibeas J., Narasimhan M., Bressan R., Hasegawa P.* Salt Causes Ion Disequilibrium-Induced Programmed Cell Death in Yeast and Plants // Plant J. 2002. № 29(5). P. 649–659.
8. *Sumaryati S., Negrutiu I., Jacobs M.* Characterization and Regeneration of Salt- and Water-Stress mutants from Protoplasts Culture of*Nicotiana Plumbaginifolia (Viviana)* // Theor. Appl. Genet. 1992. № 83. P. 613–619.
9. *Igarashi Y., Yoshiba Y., Sanada Y., Yamaguchi-Shikosaki K., Wada K., Shinasaki K.* Characterisation of the Gene for 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase and Correlation Between the Expression of the Gene and Salt Tolerance in *Oryza sativa L.* // Plant Mol. Biol. 1997. № 33. P. 857–865.
10. *Roosens N., Willem Y., Verbruggen I., Biesemans M., Iacobs M.* Proline Metabolism in the Wild-Type and in a Salt-Tolerant Mutant of *Nicotiana plumbaginifolia* Studied by 13C-Nuclear Magnetic Resonance Imaging // Plant Physiol. 1999. № 121. P. 1281–1290.
11. *Schobert A., Tschesche H.* Unusual Solution Properties of Proline and Its Interaction with Proteins // Biochem. Biophys. Acta. 1978. № 541(2). P. 270–277.
12. *Бабурина О. К., Шевякова Н. И.* Влияние экзогенного глицинбетаина на рост и метаболизм люцерны в условиях засоления // Фи-

зиология растений. 1988. № 35(6). С. 1177.
13. *Бабурина О. К., Шевякова Н. И.* Бетаины как доноры метильных групп в побегах люцерны при засолении // Физиология растений. 1995. № 42(6). С. 862–870.
14. *McNeis S., Nuccio M., Hanson A.* Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance // Plant Physiol. 1999. № 120(4). P. 945–950.
15. *Wu S-J., Ding L., Zhu JK.* SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition // Plant Cell. 1996. № 8(4). P. 617–627.
16. *Liu J., Ishitani M., Halffer U., Kim CS., Zhu JK.* The *Arabidopsis thaliana* SOS2 Gene Encodes a Protein Kinase that is Required for Salt Tolerance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97. 2000. Issue 7. P. 3730–3734. Plant Biology.
17. *Shi H., Xiong L., Stevenson B., Lu T., Zhu JK.* The *Arabidopsis* Salt Overly Sensitive 4 Mutants Uncover a Critical Role for Vitamin B_6 in Plant Sat Tolerance // Plant Cell. 2002. № 14(3). P. 575–588.
18. *Ingram J., Bartels D.* The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plant // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. № 47. P. 377–403.
19. *Nelson D., Shen B., Bohnert H.* The Regulation of Cell-Specific Inositol Metabolism and Transport in Plant Salinity Tolerance // Plant Cell. 1998. № 10. P. 753–764.
20. *Строганов Б. П.* Физиологические основы солеустойчивости растений при разнокачественном засолении. М., 1962. 366 с.
21. *Luff N. M.* Improvement in Epoxy Resin Embedding Methods // J. Biophys. Cytolog. 1961. № 9. P. 409–412.
22. *Reynolds E. S.* The Use of Lead Citral at High ph as an Electronopoque Stain in Electron Microscopy // J. Cell Biol. 1963. № 17(1). P. 206–212.
23. *Давыденко О. Г., Палилова А. Н., Щетинина М. И.* Дивергенция структуры митохондрий и хлоропластов у *Aegilops* и *Triticum.* Морфометрический анализ ультраструктуры хлоропластов // Генетика. 1984. № 20(3). С. 448–456.
24. *Федоренко Г. М., Владимирский Б. М.* Система анализа ультраструктурных характеристик функционального состояния клеток растительных и животных организмов // Перспективные информационные технологии в анализе изображений. Ташкент, 1992. С. 22–25.
25. *Бейли Н.* Статистические методы в биологии. М.: Мир, 1973. 271 с.
26. *Удовенко Г. В.* Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Л.: ВИР, 1988. 227 с.
27. *Белецкий Ю. Д.* Искусственные мутации хлоропластов у высших растений. Ростов н/Д: Изд-во РГУ, 1989. 80 с.
28. *Силаева А. М.* Структура хлоропластов и факторы среды. Киев, 1978. 203 с.
29. *Пахомова В. П.* Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология. 1995. № 37(1–2). С. 66–91.
30. *Куркова Е. Б., Калинкина Л. Г., Бабурина О. К., Мясоедов Н. А., Наумова Т. Г.* Ответные реакции *Seidlitzia rosmarinus* на солевой стресс // Известия АН. Сер. биол. 2002. № 3. С. 277–285.
31. *Prevost N., Mchale I.* Ultrastructure of bush bean root tip cells subjected to osmotic stress // Fyton. 1970. № 27(2). P. 185–197.
32. *Бурханова Э. А., Федина А. Б., Хохлова В. А., Самохвалова Н. И., Порфирова С. А., Данилова Н. В., Левин А. В., Кулаева О. Н.* Действие различных стрессов на синтез и ультраструктуру клеток корней проростков тыквы // Физиология растений. 1988. № 35(4). С. 762–772.
33. *Лапина Л. П., Бикмухаметова С. А.* Влияние NaCl и Na_2 SO_4 на функциональную активность фотосинтетического аппарата кукурузы // Физиология растений. 1973. № 20(4). С. 798–805.
34. *Белецкий Ю. Д., Шевякова Н. И., Карнаухова Т. Б.* Пластиды и адаптиция растений к засолению. Ростов н/Д: Изд-во РГУ, 1990. 48 с.

Статья поступила 14 октября 2003 г.
Ростовский государственный университет
© Федоренко Г. М., Усатов А. В., Щербакова Л. Б., Машкина Е. В., 2004