

УДК 582.661.15+577.21

О.М. КИЩЕНКО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ,  
Ю.Ю. ГЛЕБА, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,  
03143, Київ-143, вул. Заболотного, 148

**ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ  
РОСЛИН ЦУКРОВОГО БУРЯКУ  
(*BETA VULGARIS* L.)  
ЛІНІЙ О-ТИПУ ЗА ДОПОМОГОЮ  
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***



*Запропоновано методику генетичної трансформації цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.) за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* з використанням вакуум-інфільтрації. Отримано трансгенні калусні лінії та рослини цукрового буряку української селекції, стійкі до антибіотику канаміцинусульфату та гербіциду глюфозинату амонію. Інтеграцію трансгенів доведено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та гістохімічного тесту на GUS-активність.*

© О.М. КИЩЕНКО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ, Ю.Ю. ГЛЕБА,  
М.В. КУЧУК, 2004

ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. 2004. № 5

**Вступ.** Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.) для країн помірної кліматичної зони є однією з найважливіших сільськогосподарських культур, з якої отримують приблизно третину цукру, що виробляють в світі. Одержання високих та стабільних врожаїв цукрового буряку передбачає застосування гербіцидів для захисту посівів від бур'янів. Використання генетично модифікованих рослин цукрового буряку, стійких до гербіцидів суцільної дії, здатне значно підвищити рентабельність вирощування цієї культури.

На теперішній час опубліковано ряд робіт із генетичної трансформації *B. vulgaris* L. за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* [1–5]. Були також отримані трансгенні рослини цукрового буряку за допомогою біолістичного методу [4]. Значних результатів в галузі біотехнології цукрового буряку досягли Hall et al. [6], які розробили метод ПЕГ-опосередкованої трансформації протопластів, виділених із клітин проростків листків цукрового буряку. Незважаючи на досягнення, поки ще не розроблено універсальної для багатьох генотипів методики трансформації цукрового буряку. Через це для генетичної трансформації використовують лише деякі лінії та сорти, що призводить до певних проблем в подальшій селекційній практиці. Сучасний селекційний процес цукрового буряку ґрунтується на використанні методів гібридної селекції. Уведення генів господарсько цінних ознак в геном одного з компонентів гібриду, наприклад ліній О-типу, дозволить отримати високопродуктивні гібриди цукрових буряків.

Метою роботи було розробити ефективну методику генетичної трансформації цукрового буряку за допомогою *A. tumefaciens* та отримати трансгенні рослини ліній О-типу, закріплювачів стерильності, цукрового буряку української селекції, які мають гени стійкості до антибіотиків аміноглікозидної групи (канаміцинусульфату) та гербіциду глюфозинату амонію.

**Матеріали та методи.** Бактеріальний штамп та плазмиди. Для генетичної трансформації цукрового буряку застосовували бінарні вектори: 1) pICH7878, який містить ген неоміцин-фосфотрансферази (NPTII); 2) pICBV19, який містить гени β-глюкуронідази (GUS) та фосфотрицинацетилтрансферази (PAT). Структурна частина гена GUS знаходиться під контролем 35S промотору з вірусу мозаїки цвітної капусти, гени NPTII та PAT — під контролем

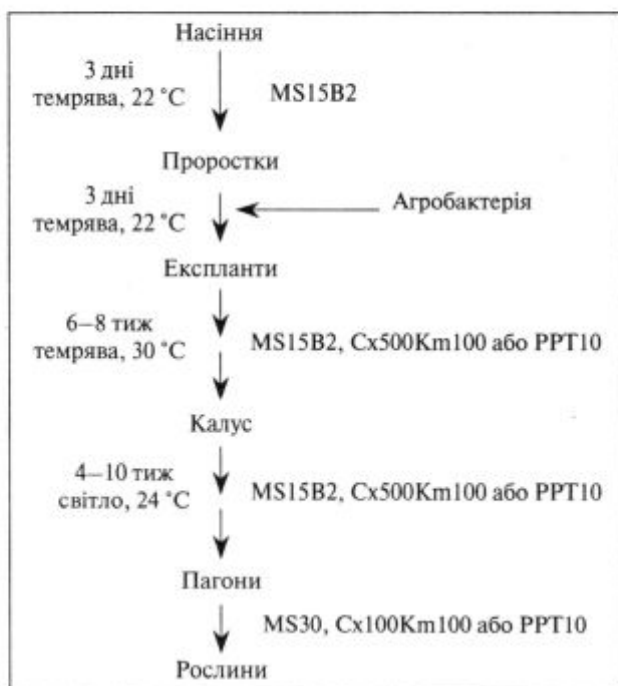


Рис. 1. Схема експериментів з генетичної трансформації цукрового буряку

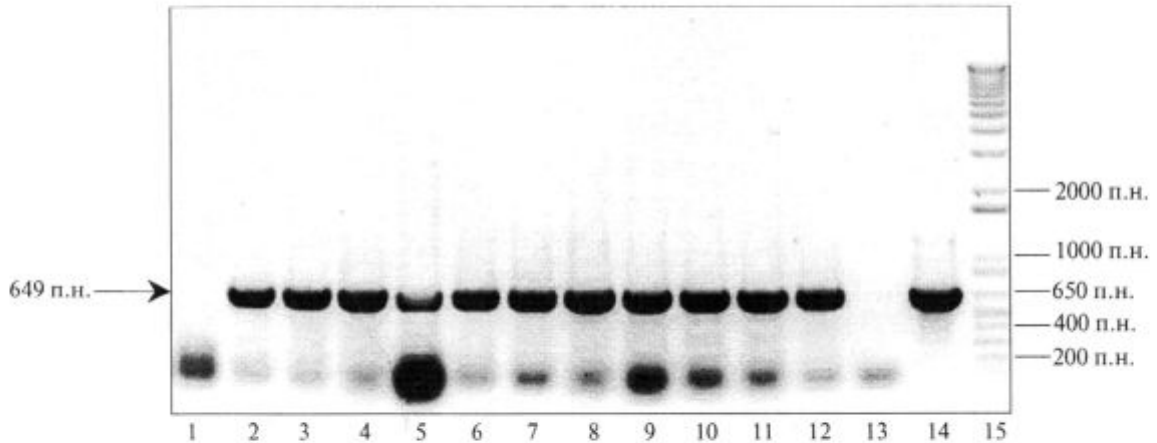
промотору гена нопалінсинтетази з *A. tumefaciens*. Плазмиди pICH7878 та pICBV19 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, Німеччина). Нопаліновий штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, що несе одну з бінарних конструкцій, вирощували в рідкому середовищі LB [7] з додаванням 50 мг/л рифампіцину та 50 мг/л карбеніциліну на ротаційному шейкері (200 об/хв) при температурі 28 °C протягом 48 год, а потім застосовували для трансформації.

**Рослинний матеріал.** В дослідницькій роботі використовували асептичні проростки цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.) запилювачів О-типу: Київський синтетик-3 та Київський синтетик-7 (КС3 та КС7). Насіння цих ліній були люб'язно надані д.б.н. Ф.М. Парієм (Інститут цукрових буряків УААН, Київ). Насіння, стерилізоване згідно з протоколом, запропонованим Банніковою з співавт. [8], пророщували на модифікованому агаризованому поживному середовищі MS [9], яке містило 15 г/л сахарози та 2 мг/л БАП (середовище MS15B2) при температурі 22 °C у темряві.

**Трансформація та регенерація.** Експерименти з генетичної трансформації цукрового буряку

проводили за схемою, наведеною на рис. 1. Для генетичної трансформації використовували тритижневі асептичні проростки цукрового буряку. Агробактеріальну культуру осаджували в стерильних центрифужних пробірках при 4000 г і ресуспендували розчином, який містив макросолі середовища MS, 20 г/л сахарози, 2 г/л глюкози, 2 мг/л БАП та 0,2 мМ ацетосерінгону, рН 5,6. Отриману бактеріальну суспензію культивували ще 2 год на шейкері (200 об/хв), а потім двічі проводили вакуумну інфільтрацію [10] проростків цукрового буряку. Після інфільтрації проростки переносили на стерильний фільтрувальний папір та інкубували при температурі 22–24 °C протягом 3 діб у темряві. Далі інфільтровані проростки нарізали на сегменти довжиною 7–10 мм, робили насічки та переносили на поживне середовище MS15B2, яке містило цефотаксим (Сх 500 мг/л) для елімінації бактерій та селективні агенти — канаміцинсульфат (Км 100 мг/л) або фосфінотрицин (PPT 10 мг/л), при температурі 28–30 °C у темряві. Через 3 тиж експланти переносили на поживне середовище того ж складу зі зниженою концентрацією цефотаксиму (Сх 400 мг/л). Формування білого рихлого калусу відбувалося протягом 6–8 тиж. Отримані калуси відокремлювали від експлантів та переносили на середовище MSR з додаванням 300 мг/л Сх та 100 мг/л Км або 10 мг/л PPT для подальшої регенерації за умов розсіяного світла, температури 24 °C та 16-годинного фотоперіоду. Регенераційне середовище MSR містило солі MS [9], вітаміни Мореля [11], 30 г/л сахарози, 29 мкМ тіосульфата срібла, 0,5 г/л водорозчинного полівінілпіролідону, 1 мг/л 6-бензиламінопурину, 0,3 мг/л індолілоцтової кислоти, 0,4 мг/л гібереллової кислоти, рН 5,8. Період субкультивування калусних клонів складав 3 тиж. Регенерація відбувалася протягом 4–10 тиж. Пагони, що сформувалися на селективному середовищі, для вкорінення переносили на середовище MS, яке містило 30 г/л сахарози (середовище MS30) з додаванням 0,5 мг/л індолілмасляної кислоти, 100 мг/л Сх та 100 мг/л Км або 10 мг/л PPT.

**GUS-аналіз.** Гістохімічний аналіз експресії β-глюкуронідази проводили згідно з [3], враховуючи рекомендації [12]. GUS-аналіз калусних клонів та листків, трансформованих плазмидою pICBV19, проводили в 100 мМ фосфатному



**Рис. 2.** Електрофореграма результатів ПЛР-аналізу сумарної ДНК трансформованих рослин цукрового буряку з використанням праймерів до послідовності гена NPTII: 15 — ДНК-маркер (GibcoBRL); 14 — позитивний контроль, плазмідна ДНК рІСН7878; 13 — негативний контроль, без ДНК-матриці; 2–12 — ДНК трансформованих рослин; 1 — негативний контроль, ДНК вихідної нетрансформованої рослини

буфері рН 7,0, який містив 1 мМ X-Gluc, 10 мМ ЕДТА, 0,1 % Triton X-100, 2,5 мМ  $K_4[Fe(CN)_6]$ , 2,5 мМ  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 2 мМ дитіотрейтолу та 20 % метанолу, при 37 °С протягом ночі. Після фарбування хлорофіл з тканин видаляли 70%-ним етанолом.

**ПЛР-аналіз.** Для доведення інтеграції трансгенів в геном отриманих ліній цукрового буряку проводили ПЛР-аналіз сумарної рослинної ДНК, виділеної згідно з методом Cheung et al. [13], на ампліфікаторі «Терцик ИМО2 ДНК-Технология» (Росія). Для ампліфікації послідовності гена NPTII застосовували праймери 5'-CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA та 3'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG. Продукт ампліфікації складав 649 п.н. Для гена GUS використовували праймери 5'-GGCC CCAATCCAGTCCATTAATGCG та 3'-TGGGT GGACGATATCACCGTGGTGA. Продукт ампліфікації — 423 п.н. Для гена PAT — праймери 5'-ATGAGCCCAGAACGACGCCCGGCC та 3'-GCATGCGCACGGTCGGGTCGTTGG (продукт ампліфікації — 414 п.н.). Для ампліфікації послідовностей трансгенів проводили 30 циклів: денатурація при температурі 94 °С (60 с), реасоціація при 65 °С (60 с), синтез при 72 °С (30 с). При ампліфікації гена *gusA* температура реасоціації складала 56 °С. Продукти ампліфікації фракціонували в 1%-ному агарозному гелі в тріс-ацетатному буфері.

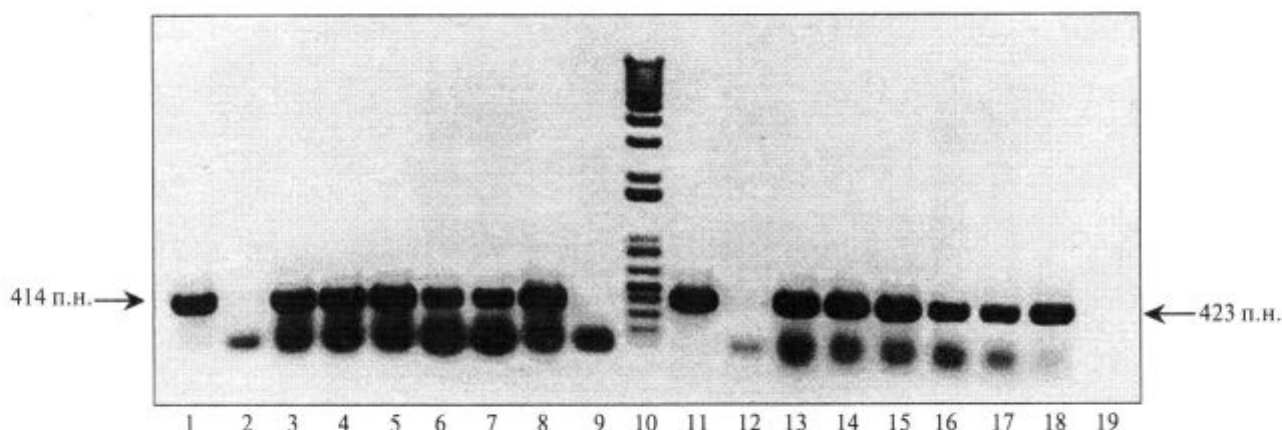
**Результати досліджень.** В результаті генетичної трансформації цукрового буряку конструк-



**Рис. 3.** Регенерація трансгенних рослин цукрового буряку лінії BVK5 на селективному середовищі MSR (100 мг/л Km). Масштабний відрізок 1 см

цією рІСН7878 за схемою, описаною в розділі «Матеріали та методи» (рис. 1), було отримано 16 калусних клонів, стійких до канаміцинсульфату (100 мг/л Km). Всі вони виявилися трансгенними, як доведено за допомогою ПЛР-аналізу сумарної рослинної ДНК з використанням праймерів, специфічних до послідовності гена NPTII (рис. 2).

Різні лінії калусу розрізнялися за своїм морфогенетичним потенціалом: рослини-регенеранти цукрового буряку було отримано для дев'яти з 16 Km-стійких калусних клонів. Крім того, переважна більшість калусних клонів втрачала здатність до регенерації протягом 2–3 міс



**Рис. 4.** Електрофореграма результатів ПЛР-аналізу сумарної ДНК трансформованих рослин цукрового буряку з використанням праймерів до послідовностей генів *bar* (1–9) та *gusA* (11–19); 1, 11 — позитивний контроль, плазмідна ДНК pICBV19; 2, 12 — негативний контроль, без ДНК-матриці; 3–8, 13–18 — ДНК трансформованих рослин; 9, 19 — негативний контроль, ДНК вихідної нетрансформованої рослини; 10 — ДНК-маркер (GibcoBRL)

культивування на середовищі MSR, але для ліній BVK1 та BVK5 цей термін склав 8 міс (рис. 3).

Після трансформації цукрового буряку за допомогою *A. tumefaciens*, яка містила плазмиду pICBV19, на експлантах формувався первинний калус, стійкий до 10 мг/л РРТ. Рослинні тканини більш чутливі до РРТ при культивуванні за умов освітлення [14]. Інкубація експлантів цукрового буряку у темряві, що необхідно для індукції морфогенного калусу, призводить до зниження селекційного тиску і, як наслідок, до появи нетрансформованого первинного калусу. При перенесенні такого калусу на селективне середовище MSR (10 мг/л РРТ) за умов освітлення він відмирав протягом двох пасажів. Внаслідок вторинної селекції кількість РРТ-стійких клонів значно зменшила-

ся (таблиця). ПЛР-аналіз сумарної рослинної ДНК відібраних клонів з використанням праймерів, специфічних до послідовностей генів *bar* та *gusA*, показав, що десять з 11 проаналізованих клонів для лінії KB3 та шість з 7 проаналізованих клонів для лінії KC7 містили трансгени (рис. 4), що вказує на досить високу ефективність обраної системи селекції. Отримані РРТ-стійкі клони перевіряли на активність β-глюкуронідази. Лише частина з проаналізованих клонів виявилися GUS-позитивними (таблиця). Більшість трансгенних клонів не проявляли GUS-активності, що, можливо, пояснюється «мовчанням» гена *gusA*.

Для трьох РРТ-стійких клонів лінії KC3 та шести клонів лінії KC7 отримано рослини-регенеранти. Слід зазначити, що вісім з 9 морфогенних клонів проявляли β-глюкуронідазну активність. Листки рослин-регенерантів, отримані з цих клонів, також характеризувалися позитивною GUS-реакцією.

**Обговорення одержаних даних.** Для переносу генів у рослини за допомогою *Agrobacterium* експланти повинні містити клітини, здатні як до регенерації, так і до трансформування бактеріями. Незважаючи на те, що *B. vulgaris* досить чутлива до зараження *Agrobacterium* spp. дикого типу [15, 16], частота подальшої регенерації низька та залежить від генотипу, або регенерація відбувається з клітин, які розташовані глибоко під поверхнею й недоступні для бактерій [2]. В зв'язку з цим для доставки

**Трансгенні клони цукрового буряку, стійкі до фосфінотрицину, що були отримані після трансформації за допомогою *A. tumefaciens* pICBV19**

Лінія	Кількість клонів		Частота отримання, %	
	первинного калусу, стійкого до 10 мг/л РРТ	РРТ-стійких (вторинна селекція)	трансгенних клонів*	GUS-позитивних клонів
KC3	27	16	90,9	37,5
KC7	31	22	85,7	45,5

\* Частота отримання трансгенних клонів виражена як процентне відношення трансгенних клонів до загальної кількості РРТ-стійких клонів, проаналізованих за допомогою ПЛР з використанням праймерів до *gusA*.

агробактерій ми використовували метод вакуум-інфільтрації рослинних тканин [10].

Технологія отримання трансформованих рослин ґрунтується, перш за все, на використанні високоефективної системи регенерації. Найбільш ефективним шляхом отримання регенерантів для цукрового буряку є пряма регенерація з черешків [8, 17–21]. Але використання черешків як експлантів для агробактеріальної трансформації призводить до утворення щільного трансгенного калусу, не здатного до регенерації, або нетрансформованих пагонів [2, 22]. Застосування вакуум-інфільтрації при трансформації черешків за допомогою агробактерії в наших дослідах також не призвело до позитивних результатів. Можна припустити, що при обраній стратегії (прямій регенерації з черешків) трансформовані клітини не мають однозначних селективних переваг перед нетрансформованими, які також приймають участь в органогенезі, навіть при досить високих концентраціях селективних агентів (150–200 мг/л Км або 15–20 мг/л РРТ).

Верхівкові бруньки, які ми спочатку також використовували в експериментах з генетичної трансформації, на селекційному середовищі MSR формували пагони. За даними ПЛР всі вони виявилися нетрансгенними та згодом гинули через низький рівень стійкості до селективних агентів.

В зв'язку з наведеним ми вирішили використовувати систему непрямої регенерації, яка включає в себе стадію калусоутворення. Для цукрового буряку відомо, що рихлий калус сім'ядольного та гіпокотильного походження характеризується високим регенераційним потенціалом [23–25], але регенерація має обмежений термін та залежить від віку калусу. Щоб скоротити стадію культивування калусу ми використовували асептичні проростки цукрового буряку для агробактеріальної трансформації, а не калус, як в роботах [2, 4]. Стадія формування первинного калусу виявилася дуже чутливою до селективних агентів (Км та РРТ), що дозволило отримати трансгенні калусні клони з частотою 85–100 %.

Відомо, що іони срібла, інгібітора синтезу етилену, сприяють процесу регенерації у багатьох видів як дводольних [26–28], так і однодольних рослин [29, 30]. В наших дослідах до-

давання тіосульфата срібла (29 мкМ) в середовище MSR також підвищувало ефективність регенерації пагонів цукрового буряку з калусу.

Таким чином, нами розроблена схема агробактеріальної трансформації цукрового буряку. Запропонована система була застосована для отримання трансгенних ліній О-типу, закріплювачів стерильності, які можуть бути безпосередньо використані в селекційному процесі.

**SUMMARY.** A method of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by vacuum infiltration has been developed. Transgenic sugarbeet plants of Ukraine breeding were selected for their resistance either to the antibiotic kanamycin or to the herbicide glufosinate ammonium. Integration of transgenes was confirmed by PCR and GUS-assay.

**РЕЗЮМЕ.** Предложена методика генетической трансформации сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* с использованием вакуум-инfiltrации. Получены трансгенные калусные линии и растения сахарной свеклы украинской селекции, устойчивые к антибиотикам канамицину и гербициду глюфосинату аммония. Интеграция трансгенов доказана с помощью ПЦР и гистохимического теста на GUS-активность.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lindsey K., Gallois P. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* // J. Exp. Bot. — 1990. — 226. — P. 529–536.
2. D'Halluin K., Bossut M., Bonne E., Mazur B., Leemans J., Botterman J. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plant // Biotechnology. — 1992. — 10. — P. 309–314.
3. Krens F.A., Trifonova A., Keizer L.C.P., Hall R.D. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Plant Sci. — 1996. — 116. — P. 97–106.
4. Snyder G.W., Ingersoll J.C., Smigocki A.C., Owens L.D. Introduction of pathogen defence genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment // Plant. Cell. Rep. — 1999. — 18. — P. 829–834.
5. Hisano H., Kimoto Y., Takeichi J., Hashimoto Abe J., Asano S., Kanasavva A., Shimamoto Y. High frequency *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima* // Plant Cell Rep. — 2004. — 22. — P. 910–918.
6. Hall R.D., Riksen-Bruinsma T., Weyens G.J., Rosquin I.J., Denis P.N., Evans I.J., Lathouwers J.E., Lefebvre M.P., Dunwell J.M., van Tunen A., Krens F.A. A high efficiency technique for the generation of transgenic

- sugar beets from stomatal guard cell // Nature Biotechnology. — 1996. — 14. — P. 1133–1138.
7. Манниатис Т., Фрич Е. Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 521 с.
  8. Банникова М.А., Головки А.Э., Хведынич О.А., Кучук Н.В. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре in vitro. Гистологическое изучение процессов регенерации // Цитология и генетика. — 1995. — 29, № 6. — С. 14–22.
  9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol Plant. — 1962. — 15. — P. 473–497.
  10. Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves // Plant Sci. — 1997. — 122. — P. 101–108.
  11. Morel G., Wetmore R.H. Fern callus tissue culture // Amer. J. Bot. — 1951. — 38. — P. 141–143.
  12. Wozniak C.A., Owens L.D. Native  $\beta$ -glucuronidase activity in sugarbeet (*Beta vulgaris*) // Physiol. Plant. — 1994. — 90. — P. 763–771.
  13. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analysis // PCR Meths. Appl. — 1993. — 3. — P. 69–70.
  14. D'Halluin K., De Block M., Denecke J., Janssen J., Leeman J., Raynaert A., Botterman J. The bar gene as selectable and screenable marker in plant engineering // Meth. Enzymol. — 1992. — 216. — P. 415–426.
  15. Paul H., Zijstra C., Leeuwangh J.E., Krens F.A., Huijzing H.J. Reproduction of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* Schm. on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. // Plant. Cell. Rep. — 1987. — 6. — P. 379–381.
  16. Krens F.A., Zijlstra C., Molen W., Jamar D., Huijzing H.J. Transformation and regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) induced by «shooter» mutants of *Agrobacterium tumefaciens* // Euphytica. — 1988. — 5. — P. 185–194.
  17. Бормотов И.У., Свирицкая А.М. Получение регенерантов сахарной свеклы в культуре in vitro // Докл АН БССР. — 1989. — 33. — С. 926–927.
  18. Detrez C., Tetu T., Sagwan R.S., Sagwan-Norreel B.S. Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured in vitro // J. Exp. Bot. — 1988. — 39. — P. 917–926.
  19. Freytag A.H., Anand S.S., Rao-Arelli A.P., Owens L.D. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. in vitro // Plant. Cell. Rep. — 1988. — 7. — P. 30–34.
  20. Mikami T., Sudoh R., Nagao E., Kinoshita T. Genotypic variation in the in vitro morphogenesis from leaf explants of *Beta vulgaris* L. and *B. maritima* L. // Euphytica. — 1989. — 40. — P. 271–273.
  21. Ritchie G.A., Short K.C., Davey M.R. In vitro shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // J. Exp. Bot. — 1989. — 211. — P. 277–284.
  22. Головки А.Э., Погребняк Н.Я., Банникова М.А. Особенности культивирования in vitro и трансформации сахарной свеклы // Физиология и биохимия культур растений. — 2002. — 34, № 5. — С. 394–404.
  23. Catlin D.W. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Plant. Cell. Rep. — 1990. — 9. — P. 285–288.
  24. Jacq B., Tetu T., Sangwan R.S., Laati A.D. and Sangwan-Norreel B.S. Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured in vitro and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants // Plant. Cell. Rep. — 1992. — 11. — P. 329–333.
  25. Dovzhenko A. and Koop H.U. Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts // Planta. — 2003. — 217. — P. 374–81.
  26. De Block M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Theor. Appl. Genet. — 1988. — 76. — P. 767–774.
  27. Chraïbi B.K.M., Latche A., Roustan J.P., Fallot J. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt // Plant. Cell. Rep. — 1991. — 10. — P. 204–207.
  28. Santos K.G.B., Mundstock E., Bodanese-Zanettini M.H. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor // Plant. Cell. Rep. — 1997. — 16. — P. 859–864.
  29. Songstad D.D., Petersen W.L., Armstrong C.L. Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae) // Amer. J. Bot. — 1992. — 79. — P. 761–764.
  30. Fernandez S., Michaux-Ferriere N., Coumans M. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO<sub>3</sub> // Plant Growth Regulation. — 1999. — 28. — P. 147–155.

Надійшла 25.05.04