**ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова,
отдел генетики, лаборатория иммунитета**

Изучение генетического контроля устойчивости зерновых культур к болезням (на примере листовой ржавчины пшеницы)

Создание устойчивых к грибным заболеваниям сортов хлебных злаков составляет одну из очередных задач современной селекции сельско-хозяйственных растений (Вавилов, 1913) .

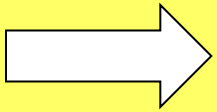
Симптомы поражения листовой ржавчиной
А – флаг-листья; В – ювенильные растения.

Взаимодействие двух аллелей в локусе устойчивости (R r) и двух аллелей в локусе вирулентности (V v)

Ген вирулентности	Ген устойчивости	
	R-	rr
V-	-	+
vv	+	+

Важнейшие для селекции следствия из теории Флора

Сорта, защищенные единичными генами устойчивости, должны быстро терять устойчивость, т.к. достаточно мутации одного гена патогена для его превращения из авирулентного в вирулентный

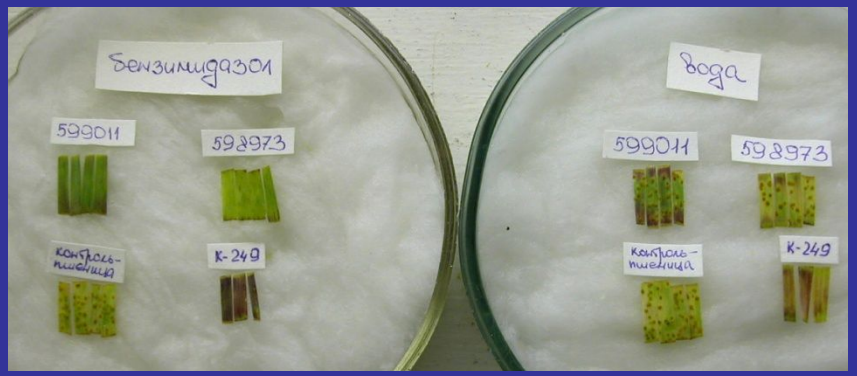


Необходим постоянный поиск новых генов устойчивости

В селекции следует использовать не просто устойчивые образцы, а носители конкретных эффективных генов устойчивости.

Выделение источников устойчивости

Система взаимодействия	Изучено образцов	Устойчивы в бензимидазоле	Устойчивы интактно	% ошибочной классификации
Мягкая пшеница – *P. triticina*	311	63	22	65
Ae. tauschii – *P. triticina*	62	7	2	71
Ae. cylindrica – *P. triticina*	41	16	0	100
Тритикале – *P. triticina*	391	152	27	82
Твердая пшеница – *P. triticina*	1527	81	5	94
Ячмень – *Blumeria graminis*	504	10	4	60
Ячмень – *Bipolaris sorokiniana*	98	6	0	100



Индукция устойчивости к листовой ржавчине под действием бензимидазола

Тип реакции на заражение сборной популяцией *P. recondita* образцов пшеницы, имеющих по литературным данным новые эффективные гены ювенильной устойчивости

Образец	Обозначение гена устойчивости	Тип реакции при заражении	
		интактных растений	отрезков листьев на бензимидазоле
к- 58835	LrM_2	3	0
к- 58837	LrM_4	3	0
к- 58839	LrM_3	3	0
и- 429309	один ген	3	0
и-429236	один ген	3	0
HD 2307	один ген	3	0
Frederick	*LrFred1, Lrfred2*	3	0
TAM 106	*LrCo1, Lrfred2, Lrpar*	3	0
Parker	*Lrpar*	3	0
Parker 5	*LrCo1, Lrpar*	3	0
Co 725055	*LrCo1, LrCo3*	3	0
Co 725082	*LrCo1, Lrco2*	3	0
F_2H-296	*LrCo1, Lrpar*	3	0
Purdue 6693	*LrPur1, Lrpur2*	3	0
к- 58840	LrM_6	3	е.п.
Harihikari	*LrH*	3	0

Критерии сходства (r) и идентичности (I) для сборов клонов *P. triticina* с одного образца пшеницы

Сравниваемые сборы (образец, дата)	r	I
ПФ ВИР, 2007 г.		
Саратовская 29, 01.08 – Саратовская 29, 07.08	0,71	45,62
ДОС ВИР, 2007 г.		
Siete Cerros, 22.06 – Siete Cerros, 30.06	0,80	48,61
ДОС ВИР, 2008 г.		
к-23731, 03.06 – к-23731, 11.06	0,74	70,06*
к-31474, 03.06 – к-31474, 11.06	0,83	48,03
ПФ ВИР, 2008 г.		
к-28683, 07.08 – к-28683, 24.08	0,71	79,05*
к-48548, 07.08 – к-48548, 24.08	0,76	80,32*

Характеристика по вирулентности субпопуляций *P. triticina*, собранных с одного образца пшеницы в разные сроки

Сбор (образец, дата)	Частота клонов, вирулентных к линиям пшеницы с геном устойчивости					
	Lr1	*Lr2a*	*Lr26*	*Lr23*	*Lr20*	*Lr19*
ДОС ВИР, 2007 г.						
Siete Cerros, 22.06	0,32	0,46	0,21	0,49	0,51	0,06
Siete Cerros, 30.06	0,53	0,60	0,41	0,80	0,64	0,10
td	2,99**	2,02*	3,08**	4,98**	1,79	1,16
ПФ ВИР, 2007 г.						
Саратовская 29, 01.08	0,41	0,35	0,41	0,62	0,45	0,05
Саратовская 29, 07.08	0,37	0,30	0,36	0,82	0,77	0,04
td	0,53	0,66	0,62	3,20**	4,94**	0,31
ДОС ВИР, 2008 г						
к-31474, 03.06	0,40	0,52	0,36	0,79	0,53	0,15
к-31474, 11.06	0,61	0,70	0,40	0,88	0,66	0,17
td	4,35**	3,89**	0,84	2,55*	2,8**	0,40

АНАЛИЗ РОДОСЛОВНЫХ

1. Аутентичность изучаемого образца.

2. Знание реакции на заражение патогеном всех генотипов, входящих в родословную.

3. Только уже известные гены устойчивости могут контролировать признак у изучаемых образцов.

ГИБРИДОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Количество генов устойчивости	Соотношение растений	
	устойчивые	восприимчивые
1 доминантный ген	3	1
1 рецессивный ген	1	3
Некумулятивная полимерия		
2 доминантных гена	15	1
2 рецессивных гена	7	9
2 гена, один рецессивный и 1 доминантный	13	3
3 доминантных гена	63	1
3 рецессивных гена	37	27
3 гена, один рецессивный и 2 доминантных	61	3
3 гена, один доминантный и 2 рецессивных	55	9
Комплементарное взаимодействие генов		
2 доминантных гена	9	7
2 рецессивных гена	1	15
2 гена, один рецессивный и 1 доминантный	3	13
3 доминантных гена	27	37
3 рецессивных гена	1	63
3 гена, один рецессивный и 2 доминантных	9	55
3 гена, один доминантный и 2 рецессивных	3	61
Один независимый и 2 комплементарных гена		
1 доминантный и 2 комплементарных доминантных	57	7
1 доминантный и 2 комплементарных рецессивных	49	15
1 доминантный и 2 комплементарных – доминантный и рецессивный	51	13
1 рецессивный и 2 комплементарных доминантных	43	21
1 рецессивный и 2 комплементарных рецессивных	19	45
1 рецессивный и 2 комплементарных – доминантный и рецессивный	25	39

Ожидаемые расщепления по устойчивости в F_3 от скрещивания устойчивого и восприимчивого к ржавчине родителей

.

Число и характер взаимодействия генов устойчивости	Соотношение семей		
	R*	RS	S
Один ген	1	2	1
Два гена, некумулятивная полимерия	7	8	1
Два гена, комплементарность	1	8	7
Три гена, некумулятивная полимерия	37	26	1
Три гена, комплементарность	1	26	37
Три гена, два комплементарных и один независимый	19	38	7

* R – устойчивые семьи; S – восприимчивые семьи; RS – семьи, расщепляющиеся по устойчивости

Значения χ^2 для гипотез генетического контроля устойчивости к ржавчине образца MN 81330 по результатам расщепления в F_2 от скрещивания с Мильтурум 7526

Количество генов устойчивости	Значение $\chi^2_{факт.}$
1 доминантный ген	0,03
Некумулятивная полимерия	
2 доминантных гена	61,89
2 гена, один рецессивный и 1 доминантный	2.26
3 доминантных гена	373,90
3 гена, один рецессивный и 2 доминантных	95,80
3 гена, один доминантный и 2 рецессивных	9,67
Комплементарное взаимодействие генов	
2 доминантных гена	17,02
3 доминантных гена	51,04
Один независимый и 2 комплементарных гена	
1 доминантный и 2 комплементарных доминантных	20,42
1 доминантный и 2 комплементарных рецессивных	0,05
1 доминантный и 2 комплементарных – доминантный и рецессивный	1,10
1 рецессивный и 2 комплементарных доминантных	3,62
2 рецессивных и 2 комплементарных доминантных	0,01

Значения χ^2 для гипотез генетического контроля устойчивости к ржавчине по результатам расщепления в F_3 от скрещивания MN 81330 × Мильтурум 7526

Количество генов устойчивости	Значение $\chi^2_{факт.}$
1 ген	0.48
2 гена	30.64
Три гена, два комплементарных и один независимый	8.34
Четыре гена, два независимых и 2 комплементарных	96.83

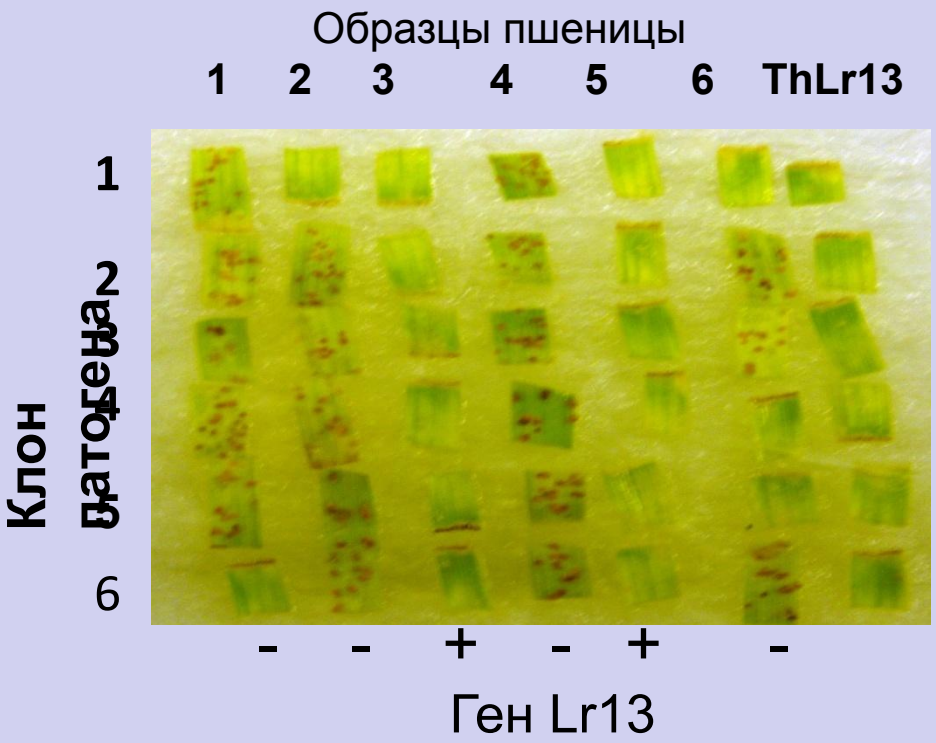
Идентификация гена

Скрещивание изучаемого образца с носителями конкретных генов устойчивости

F_2 MN 81330 × Scua 213 R : 0 S

Фитопатологический тест

Если опытный образец устойчив ко всем независимо выделенным авирулентным к конкретному гену устойчивости изолятам, то он имеет этот ген резистентности; в случае восприимчивости хотя бы к одному из этих изолятов надежно постулируется отсутствие данного гена у образца.



	Клон 1	Клон 2
Образец 1	+	–
Образец 2	–	+

1.Различные гены устойчивости
2. Разные аллели одного гена устойчивости
3. Один идентичный ген устойчивости + различные гены устойчивости

Тест на аллелизм

1.Строго доказано, что 2 образца имеют по одному гену устойчивости к конкретному инокулюму
2. Отсутствует расщепление в F_2 от их скрещивания
3.Дифференциальная реакция на клоны патогена.

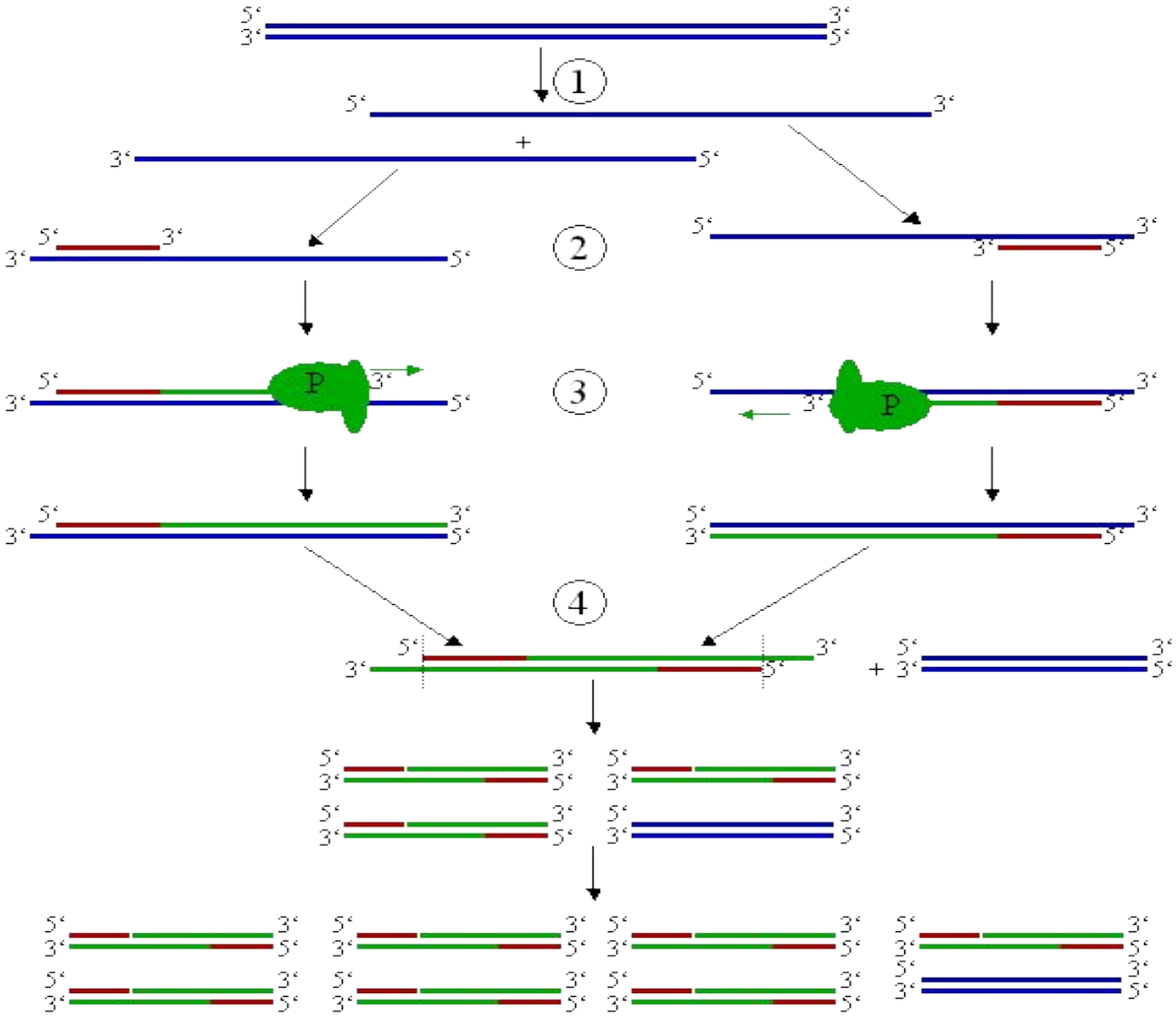


Рис. 2. Схема Полимеразной цепной реакции (ПЦР)

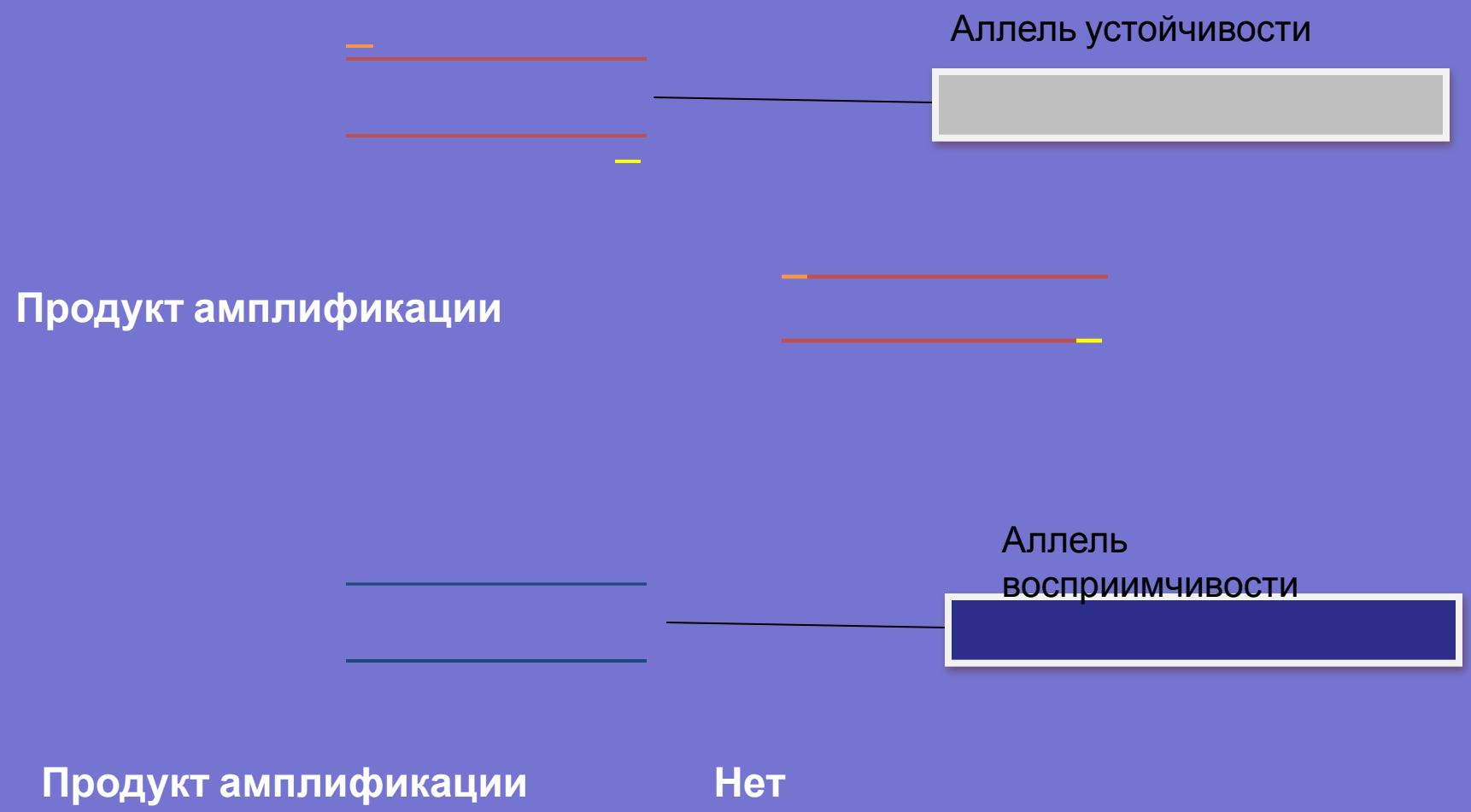


Рис.3 Схема идентификации гена устойчивости с использованием ПЦР ДНК маркера

Преимущества

- 1. срок идентификации
- 2. отсутствие супрессии
- 3. независимость от внешних условий
- 4. большое количество маркеров (∞).

Гены устойчивости пшеницы к листовой ржавчине, для которых разработаны ПЦР ДНК маркеры (по McIntosh et al, 2008)

***Lr*1, *Lr*3, *Lr*9, *Lr*10, *Lr*13, *Lr*14a, *Lr*16, *Lr*19, *Lr*20, *Lr*21, *Lr*22, *Lr*24, *Lr*25, *Lr*26, *Lr*28, *Lr*29, *Lr*32, *Lr*34, *Lr*35, *Lr*37, *Lr*39, *Lr*46, *Lr*47, *Lr*50, *Lr*51, *Lr*52, *Lr*57, *Lr*58.**

Публикации, в которых идентификация генов устойчивости пшеницы к листовой ржавчине осуществлена только по результатам анализа ПЦР ДНК маркеров

- **Гайнуллин Н.Р., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Киселева М.И., Коломиец Т.М., Коваленко Е.Д.** Использование фитопатологического и молекулярно-генетического методов для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом // Генетика. 2007. Т. 43. С. 1058-1064.
- **Гультяева Е.И., Канюка И.А., Алпатьева Н.В., Баранова О.А., Дмитриев А.П., Павлюшин В.А.** Молекулярные подходы в идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у российских сортов пшеницы // Доклады РАСХН. 2009. № 5. С. 23-26.
- **Дженин С.В., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Коваленко Е.Д.** Доноры устойчивости яровой мягкой пшеницы к бурой ржавчине и мучнистой росе с генетическим материалом видов Aegilops speltoides L., Aegilops triuncialis L., Triticum kiharae Dorof. et Migusch. //ДокладыРАСХН. 2009. N 5. С. 3-7.
- **Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович, Картель Н.А.** Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (Triticum aestivum L.) с использованием молекулярных маркеров // Генетика. 2006. V. 42. С. 675-683.
- **Stepien L., Golka L., Chelkowski J.** Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources // J. Appl. Genet.. 2003. V. 44. P. 139-149.

Greganova Z., Kraic J., Galova Z. Diagnostic of wheat leaf rust resistance genes by DNA markers and their application in mas // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2003. – V.39. – P.127–129.

Wioeniewska H., Stкpiec J., Kowalczyk K. Resistance of spring wheat cultivars and lines to leaf rust // J. Appl. Genet. 44(3), 2003, P. 361-368

Singh R., Tiwari R., Datta D. Detection of Leaf Rust Resistance Genes Lr9 and Lr10 in Wheat (Triticum aestivum) by PCR Based STS Markers //Acta Phytopath et Ent. Hungarica. 2003. V. 38. P. 245-249.

Babar M., Mashhadi A.F., Mehvish A. et al. Identification of rust resistance genes Lr10 and Sr9a in Pakistani wheat germplasm using PCR based molecular markers //African Journal of Biotechnology.

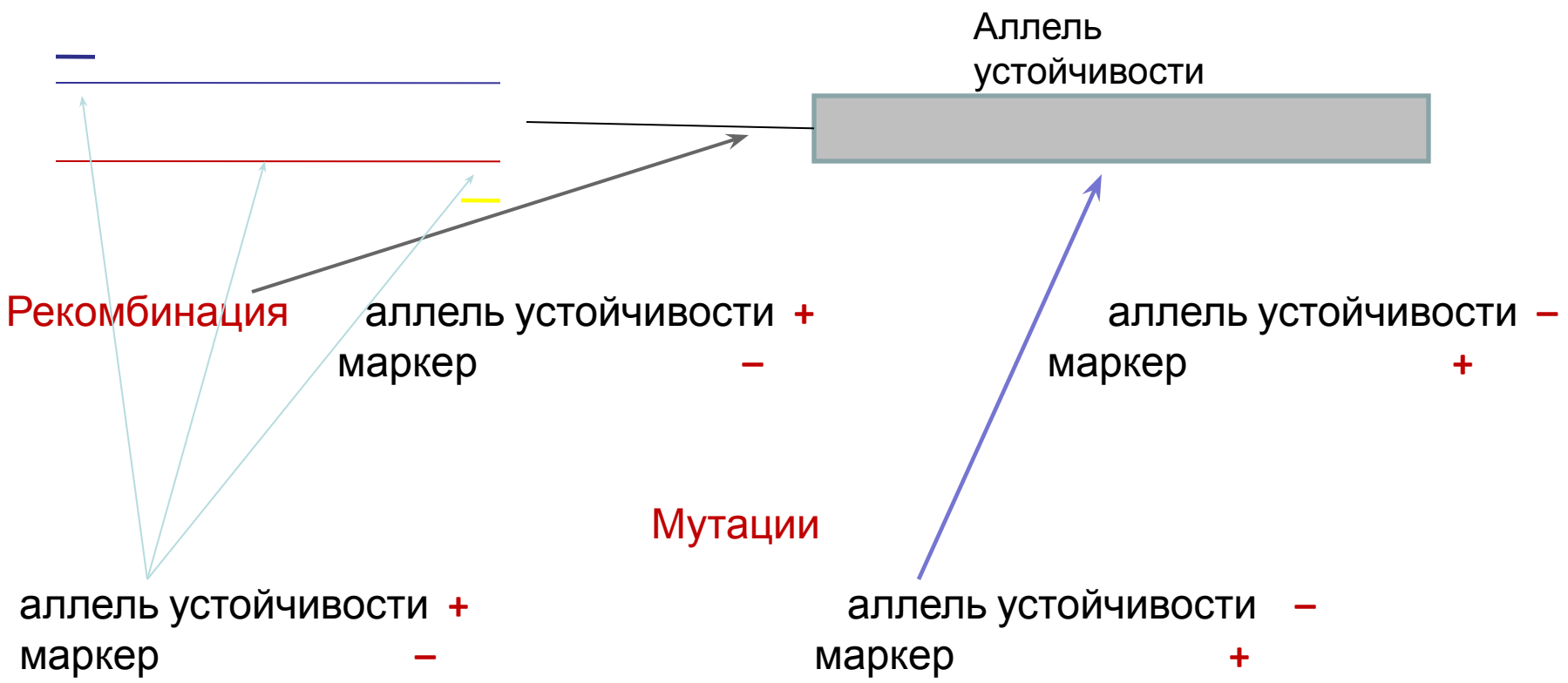


Рис.4 Возможные механизмы нарушения связи наличия аллеля устойчивости и ПЦР ДНК маркера

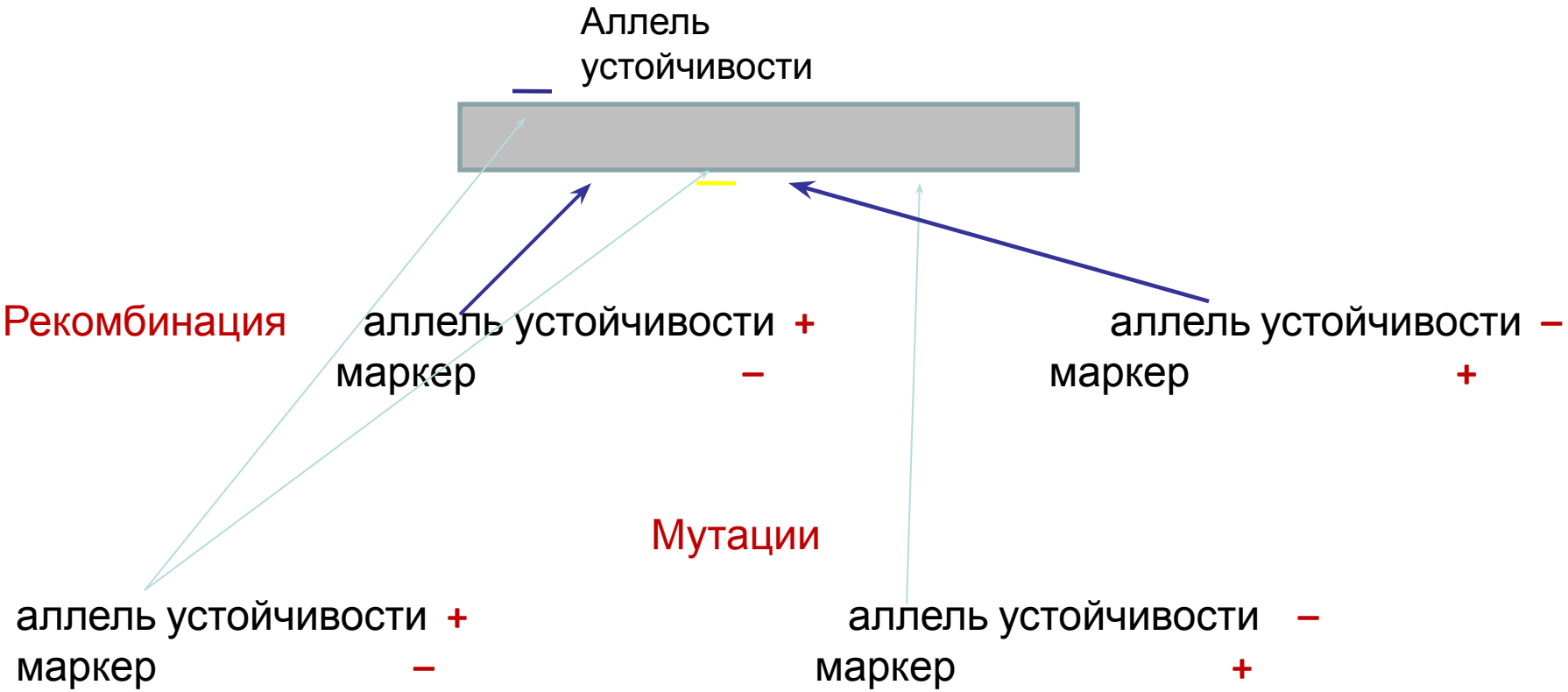


Рис.5 Возможные механизмы нарушения связи наличия аллеля устойчивости и ПЦР ДНК маркера

Абсолютное совпадение результатов идентификации гена устойчивости мягкой пшеницы к листовой ржавчине с помощью ПЦР ДНК маркера, гибридологического анализа и фитопатологического теста

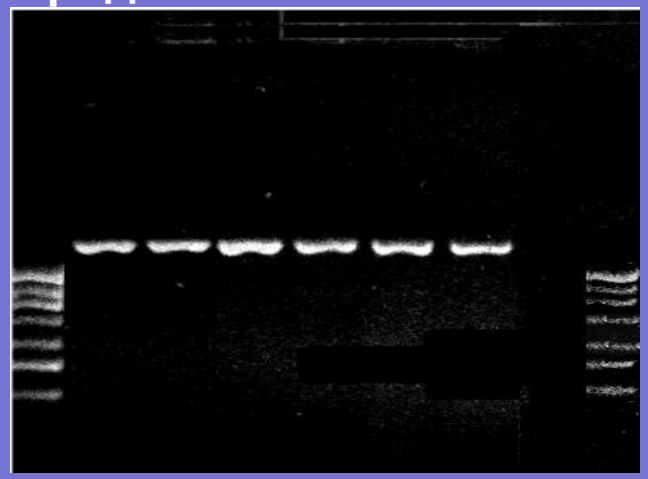


Рис. 6. Продукты амплификации с использованием праймеров J 13 к STS локусу, сцепленному с геном устойчивости *Lr*9.
М – маркер молекулярного веса, 1 – АНК-4, 2 – Гарасовскя 5, 3 – Зоя, 4 – Квинта, 5 – Киевская, 6 – Сер 14 –Tapes, 7– Thatcher.

Таблица 1. Характеристика образцов, выделенных как имеющих ген *Lr*9, по устойчивости к листовой ржавчине и наличию амплифицированного фрагмента STS маркера J13.

Образец	Тип реакции на заражение, инокулюм		Наличие фрагмента амплификации
	популяция	клоны, вирулентные к гену *Lr*9	
Th*Lr*9	0	3	+
АН -34	0	3	+
АНК-4	0	3	+
Гарасовская 5	0	3	+
Дуэт	0	3	+
Зоя	0	3	+
Линия F6BC5 555/15	0	3	+
Лютесценс101	0	3	+
Удача	0	3	+
GKB-1	0	3	+
TR/55P 6628	0	3	+

Не полное совпадение результатов идентификации гена устойчивости с помощью ДНК маркера, гибридологического анализа и фитопатологического теста

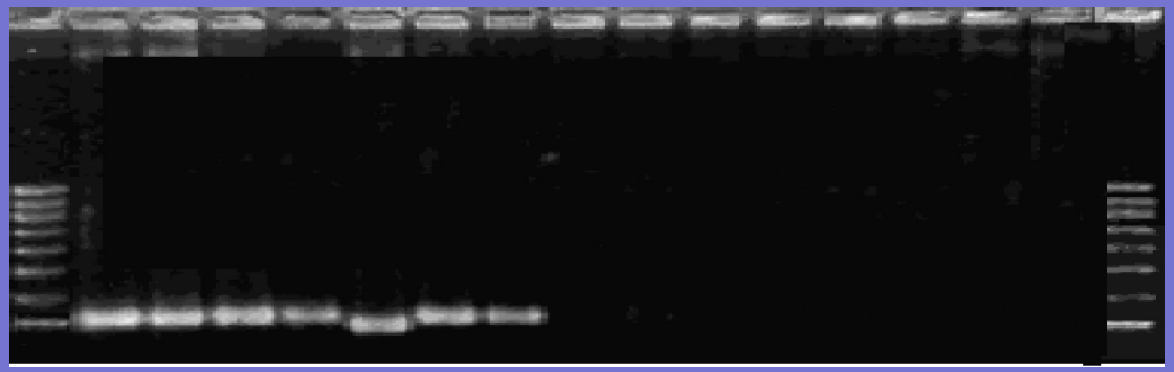


Рис. 7 Продукты амплификации с использованием праймеров J09 к STS локусу, сцепленному с геном устойчивости Lr24.
M – маркер молекулярного веса, 1 – N89L, 2 – Siouxland 89, 3 – Parker 76, 4 – Arapohoe, 5 – Лавина, 6 –Stoa, 7 – STW 646252, 8 – Torres, 9 – PS 131, 10 – PS 133, 11 – Scua, 12 – BR- 34, 13 – PF 84316, 14 – Sunco, 15 – Thatcher.

Таблица 2. Характеристика образцов, выделенных как имеющих ген *Lr*24, по устойчивости к листовой ржавчине и наличию амплифицированного фрагмента STS маркера J9.

Образец	Тип реакции на заражение, инукулюм		Наличие STS маркера
	популяция	клоны, вирулентные к *Lr*24	
Th *Lr*24	0	0, 3	+
Лавина	0	3	+
Arapohoe	0	3	+
Collin	0	3	+
Gus	0	3	+
Norkan	0	3	+
Parker 76	0	3	+
Siouxland 89	0	3	+
SST-25	0	3	+
Stoa	0	3	+
STW 646252	0	3	+
Tules	0	3	+
BR 16	0	3	-
Scua	0	3	-
Torres	0	3	-
Century	0	3	-
Cimmaron	0	3	-
MN 81330	0	3	-
OC8826	0	3	-

Не совпадение результатов идентификации генов устойчивости с помощью ДНК маркеров и фитопатологического теста

Таблица 3. Типы реакции сортов мягкой пшеницы на заражение клонами *P. triticina*, авирулентными к гену устойчивости *Lr*1

Сорт, образец	Ген устойчивости по результатам STS анализа	Клон					
		1	2	3	4	5	6
Doublecrop	*Lr*1	3	3	3	3	0	3
Хазарка	*Lr*1	0	0	0	3	3	3
Roblin	*Lr*1	0	0	0	0	0	0
Omega	*Lr*1	0	3	0	3	0	3
Pasqua	*Lr*1	0	0	0	0	0	0
Норе	*Lr*1	3	3	3	3	3	3
Прохоровка	*Lr*1	0	0	0	3	3	3
Родина	*Lr*1	3	3	3	3	3	3
Тэтчер		3	3	3	3	3	3
Th*Lr*1		0	0	0	0	0	0

Таблица 4. Типы реакции сортов мягкой пшеницы на заражение клонами *P. triticina*, авирулентными к гену устойчивости *Lr*20

Сорт, образец	Ген устойчивости по результатам STS анализа	Клон					
		1	2	3	4	5	6
Заря	*Lr*20	3	3	3	3	3	0
Omega	*Lr*20	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
Planet	*Lr*20	0	0	3	0	0	3
Тэтчер		3	3	3	3	3	3
Th*Lr* 20		1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2

Таблица 5. Типы реакции сортов мягкой пшеницы на заражение клонами *P. triticina*, авирулентными к гену устойчивости *Lr*26

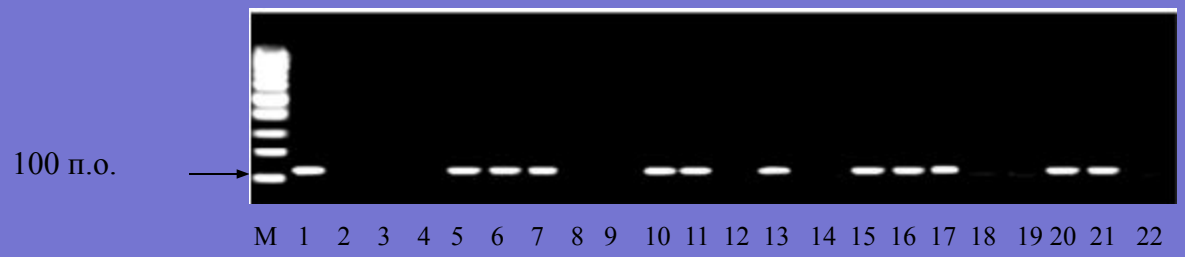
Сорт, образец	Ген устойчивости по результатам STS анализа	Клон					
		1	2	3	4	5	6
	*Lr*26	3	0	0	3	3	3
Хазарка	*Lr*26	0	0	0	0	0	0
Prospect	*Lr*26	0	3	3	0	0	0
Прохоровка	*Lr*26	0	0	0	0	0	0
Тэтчер		3	3	3	3	3	3
Th*Lr* 26		0	0	0	0	0	0

Таблица 6. Типы реакции сортов мягкой пшеницы на заражение клонами *P. triticina*, авирулентными к гену устойчивости *Lr*10

Сорт, образец	Ген устойчивости по результатам STS анализа	Клон			
		1	2	3	4
Piko	*Lr*10	3	3	3	3
Brigadier	*Lr*10	0;	3	0	3
Vance	*Lr*10	0;	0	3	3
Lerma Rojo 64	*Lr*10	0;	3	3	0
Rendezvous	*Lr*10	0;	2	3	3
Prospect	*Lr*10	0	0	0	0
AC Domain	*Lr*10	0	0	0	0
Leguan	*Lr*10	0	3	3	3
Hope	*Lr*10	0	3	3	3
Прохоровка	*Lr*10	0	0	0	0
Саррубра	*Lr*10	0	0	0	3
Roblin	*Lr*10	0	0	0	0
Харьковская 26	*Lr*10	2	3	3	3
Манна 2	*Lr*10	3	3	3	3
Ангелина	*Lr*10	3	3	3	3
Мильтрум 63	*Lr*10	3	3	3	3
Эскада 70	*Lr*10	0	3	0	3
Маринка	*Lr*10	0	3	3	3
Мальцевская 110	*Lr*10	0	0	3	0
Эстер	*Lr*10	3	3	0	3
Воронежская 16	*Lr*10	3	3	3	3
Родина	*Lr*10	3	3	3	3
Th*Lr*10		0	0	0	0

Таблица 7. Типы реакции сортов мягкой пшеницы на заражение клонами *P. triticina*, авирулентными к гену устойчивости *Lr*34

Сорт, образец	Ген устойчивости по результатам SSR анализа	Клон			
		1	2	3	4
Lerma Rojo 64	*Lr*34	X	3	3	3
Заря	*Lr*34	3	3	3	3
Manitou	*Lr*34	0;	0;	0;	0;
Pasqua	*Lr*34	0;	0;	0;	0;
Doublecrop	*Lr*34	3	3	3	3
AC Domain	*Lr*34	0;	0;	0;	0;
Roblin	*Lr*34	0;	0;	0;	0;
Тэтчер		3	3	3	3
Th*Lr*34		0;	0;	0;	0;

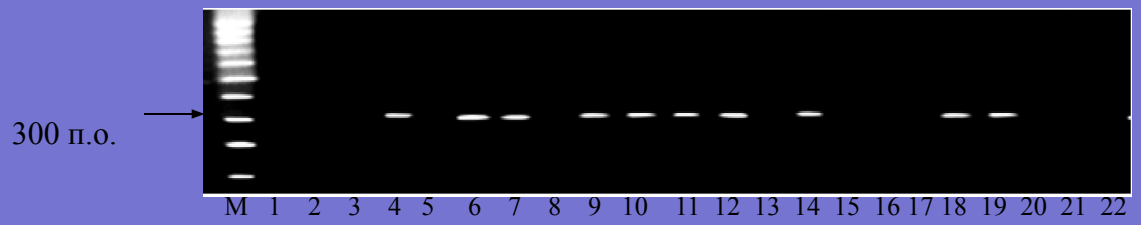


Р и с. 8 Продукты амплификации с использованием праймеров WMS130 к SSR локусу *Xgwm*130, сцепленному с геном устойчивости *Lr*34

M – маркер молекулярного веса, 1 – Thatcher *Lr*13, 2 – **Chris**, 3 – Neepawa, 4 – Thatcher *Lr*10, 5 – Mayo 54, 6 – Mayo 52, 7 – Эскада 70, 8 – Hope, 9 – Piko, 10 – Rendezvouz, 11 – Prospect, 12 – Прохоровка, 13 – Эстер, 14 – Родина, 15 – Thatcher *Lr*34, 16 –Doublecrop, 17 – Lerma Rojo 64, 18 – **Roblin**, 19 – Заря, 20 – **Manitou**, 21 – **Pasqua**, 22 – Thatcher

Т а б л и ц а 8 . **Типы реакции отрезков листьев образцов пшеницы на инокуляцию монопустульными изолятами *P. recondita* f.sp. *tritici***

Образец	Номер монопустульного изолята	
	1	2
Th*Lr*34	0;	0;
Doublecrop	3	3
Lerma Rojo 64	3	3
Mayo 52	3	3
Mayo 54	3	3
Prospect	3	3
Rendezvous	3	0
Эскада 70	3	3
Эстер	3	3
Thatcher	3	3



Р и с. 9 Продукты амплификации с использованием праймеров к STS локусу F12245 , сцепленному с геном устойчивости *Lr*10

М – маркер молекулярного веса, 1 – Thatcher *Lr*13, 2 – Chris, 3 – Neepawa, 4 – Thatcher *Lr*10, 5 – **Mayo 54**, 6 – **Mayo 52**, 7 – Эскада 70, 8 – Hope, 9 – Piko, 10 – Rendezvouz, 11 – **Prospect**, 12 – **Прохоровка**, 13 – Эстер, 14 – Родина, 15 – Thatcher *Lr*34, 16 –Doublecrop, 17 – Lerma Rojo 64, 18 – **Roblin**, 19 – Заря, 20 – Manitou, 21 – Pasqua, 22 – Thatcher.

Т а б л и ц а 9 . **Типы реакции отрезков листьев образцов пшеницы на инокуляцию монопустульными изолятами *P. recondita* f.sp. *tritici***

Образец	Номер монопустульного изолята	
	1	2
Th*Lr*10	0	0
Piko	3	3
Rendezvous	3	3
Заря	3	3
Родина	3	3
Эскада 70	3	3
Thatcher	3	3

НЕ СОВПАДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ Lr 9 и 24 У ОБРАЗЦОВ *AEGILOPS UMBELLULATA* И ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ЧУЖЕРОДНЫМИ ТРАНСЛОКАЦИЯМИ С ПОМОЩЬЮ ДНК МАРКЕРОВ, И ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТА

Таблица 10. Характеристика образцов *Aegilops umbellulata* по устойчивости к листовой ржавчине и наличию амплифицированного фрагмента STS маркера J 13

Номе каталога либо интродукции ВИР	Тип реакции на заражение *P. triticina*		Наличие маркера размером 1100 п. о.
	популяция	клоны, вирулентные к *Lr*9	
1283	3	3	-
1461	0	3	+
2029	3	3	-
3325	0	3	-
539427	0	3	-
570032	0	3	+
570116	3	3	+
570230	[illegible]	[illegible]	-

Рис. 11 Продукты амплификации с использованием праймеров J 13 к STS локусу, сцепленному с геном устойчивости *Lr*9. М – маркер молекулярного веса, 1 – к-1283, 2 – Thatcher, 3 – Th*Lr*9 , 4 – к-2029, 5 – и-570230, 6 – к-1461, 7– и-570116, 8 – и-570032, 9 - и-539427.

• Таблица 11. Характеристика образцов мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом по наличию ДНК маркеров и вирулентных клонов возбудителя листовой ржавчины

Образец, линия	Устойчивость от	Идентифицированные гены устойчивости методом ПЦР-анализа		Наличие вирулентных клонов *P. triticina*
		Lr 9	*Lr* 24	
76/00	*Ae. speltoides*	+	-	+
79/00	*Ae. speltoides*	+	-	+
119/00	*T. kiharae*	+	-	+
120/00	*T. kiharae*	+	+	+
122/00-1	*Ae. triuncialis*	-	+	+
k-1652	*Ae. triuncialis*	+	-	+

•Гайнуллин и др. , 2007.
•Дженин и др., 2009.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ