

ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ РИЗОБИЙ ВИДОВ *Sinorhizobium fredii* И *Bradyrhizobium japonicum*, ОБИТАЮЩИХ В ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ПОЧВАХ

М.В. Якименко, С.А. Бегун, кандидаты биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт сои,
675027, Амурская область, Благовещенск, Игнатьевское шоссе
E-mail: mariy-y@yandex.ru

С целью всестороннего изучения дальневосточных природных популяций клубеньковых бактерий сои во Всероссийском научно-исследовательском институте сои (г. Благовещенск) проведены лабораторные эксперименты по выявлению отличительных признаков ризобий видов *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984) и *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), выделенных в чистую культуру из почв соевоющих регионов Дальнего Востока. Установлено, что штаммы вида *B. japonicum* в чашках Петри начинают рост на 7-10-е и даже 20-е сутки после посева, усваивают ограниченный набор источников углеродного питания с выделением продуктов метаболизма в основном щелочного характера, обладают пониженной осмоустойчивостью. Экстремальные условия среды обитания ризобии этого вида переносят плохо, резко замедляют рост на кислых и щелочных питательных средах, при высоких температурах (37-42 °C) не растут. В то же время в оптимальных условиях данный вид ризобий доминирует при нодуляции растений сои, обладая высокой и устойчивой вирулентностью. Рестриктивный анализ исследуемых штаммов *B. japonicum* подтвердил их идентичность. Штаммы вида *S. fredii* в чашках Петри дают рост на 2-4-е сутки после посева, хорошо усваивают широкий спектр источников углеродного питания с выделением продуктов метаболизма кислотного характера. Большинство штаммов этого вида обладает высокой осмоустойчивостью. В группе штаммов *S. fredii* выделены культуры с универсальными способностями роста при экстремальных условиях среды обитания (высокая температура, низкие и высокие показатели pH). Этот вид ризобий может доминировать при формировании симбиотического аппарата в годы с экстремальными погодными условиями. Анализ результатов ферментативного расщепления гена 16S рРНК исследуемых штаммов *S. fredii* рестриктазой HaeIII подтвердил их идентичность. С помощью RAPD-PCR анализа показана внутривидовая специфичность изучаемых штаммов *B. japonicum* и *S. fredii*, следовательно, виды обладают широким полиморфизмом, что свидетельствует о их популяционной гетерогенности.

DISTINCTIVE FEATURES OF RHIZOBIA SPECIES *Sinorhizobium fredii* AND *Bradyrhizobium japonicum* LIVING IN THE FAR EASTERN SOILS

Yakimenko M.V., Begun S.A.

All-Russian Scientific Research Institute of Soybean,
675027, Amurskaya oblast, Blagoveshchensk, Ignat'evskoe shosse, 19
E-mail: mariy-y@yandex.ru

In order to comprehensive study of the Far Eastern natural populations of soybean nodule bacteria, the All-Russian Scientific Research Institute of Soybean (FSBSI ARSRI of Soybean, Blagoveshchensk) carried out laboratory experiments to identify the distinctive features of rhizobia species *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984) and *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) Jordan, isolated in pure culture from soils of the Far Eastern regions engaged in soybean cultivation. As a result, it was found that in Petri dishes the strains of *B. japonicum* species make a growth on the 7-10th and even the 20th day after sowing, assimilate a limited set of carbon nutrition sources with the release of metabolic products of mainly alkaline nature, and have reduced osmotic resistance. The rhizobia of *B. japonicum* species poorly tolerate to the extreme environmental conditions, they sharply slow down growth (37-42 °C). At the same in acidic and alkaline nutrient medium. They do not grow at high temperatures time, under optimal conditions, this type of rhizobia dominates in the nodulation of soybean plants, having high and stable virulence. Restriction analysis of the being studied *B. japonicum* strains confirmed their identity. In Petri dishes the strains of *S. fredii* species make a growth on the 2nd – 4th day after sowing, they well assimilate a wide range of carbon nutrition sources with the release of acid metabolic products. Most strains of this species have high osmotic resistance. In the group of *S. Fredii* strains, cultures that have universal growth abilities under extreme environmental conditions (high temperature, low and high pH values) were identified. This type of soybean rhizobia can dominate at the formation of symbiotic apparatus in years with extreme weather conditions. Analysis of results of the enzymatic cleavage of the 16S rRNA gene of the studied *S. Fredii* strains by Hae III restriction enzyme confirmed their identity. The conducted RAPD-PCR analysis showed the intraspecific specificity of the studied *B. Japonicum* and *S. fredii* strains, therefore the species have a wide polymorphism that indicates the population heterogeneity of the species.

Ключевые слова: ризобии сои, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium fredii*, штаммы, вирулентность, экстремальные условия, продукты метаболизма, рестриктивный анализ, RAPD-PCR анализ

Key words: soybean rhizobia, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium fredii*, strains, virulence, extreme conditions, metabolic products, restriction analysis, RAPD-PCR analysis

Особенность дальневосточного региона – наличие в почвах природных популяций ризобий сои. Их высокая активность позволяет заниматься селекцией микроорганизмов-азотфиксаторов для дальнейшего использования в хозяйственных целях. Работа по подбору питательных сред, отработке и освоению методов аналитической селекции клубеньковых бактерий сои, в основу которых были положены идеи крупнейшей исследовательницы микробной азотфиксации – Е.М. Ми-

шустина, В.К. Шильниковой, Л.М. Доросинского, начата во ВНИИ сои в 70-е годы прошлого века [1, 2]. В чистую культуру ежегодно выделяли 11-95 штаммов ризобий сои, всего за годы исследований – свыше 2000 форм клубеньковых бактерий этой культуры [3]. До середины 80-х годов XX в. существовало мнение, что на сое могут формировать клубеньки только медленнорастущие ризобии – *Rhizobium japonicum* [4, 5]. Поэтому исследования ризобий на Дальнем Востоке до недав-

него времени ограничивались изучением лишь этого вида, хотя первые единичные формы быстрорастущих клубеньковых бактерий были отмечены во ВНИИ сои еще в 70-е годы прошлого века [6]. Многочисленные данные, полученные в результате использования современных методов определения генетического родства при изучении клубеньковых бактерий, позволили выделить из рода *Rhizobium* (Frank, 1889) два самостоятельных рода – *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982) и *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) [7, 8]. Это послужило основанием при выделении чистых культур ризобий из дальневосточных природных популяций быстрорастущие формы относить к виду *Sinorhizobium fredii*, а медленно растущие – к виду *Bradyrhizobium japonicum* [9, 10]. В настоящее время коллекция чистых культур клубеньковых бактерий, нодулирующих сою Всероссийского научно-исследовательского института сои, насчитывает 289 штаммов [11].

Цель настоящей работы – выявить отличительные признаки штаммов ризобий сои видов *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii*, выделенных из почв Дальнего Востока, и оценить популяционную изменчивость аборигенных ризобий с помощью рестриктазного и RAPD-PCR анализов для изучения видового разнообразия дальневосточных природных популяций клубеньковых бактерий сои.

Методика. Объектами исследований были чистые культуры ризобий сои двух видов – *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii*, выделенных из природных популяций Российского Дальнего Востока. Типовой штамм для вида *B. japonicum* В-1967 получен в 2014 г. из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии имени Г.К. Скрыбина (г. Пушино), для вида *S. fredii* – в 1990 г. из китайской коллекции (штамм КНР6).

Лабораторные микробиологические эксперименты выполняли в соответствии с общепринятыми методами [12–14]. Использовали минерально-растительную питательную среду (МРС). При определении сроков появления и размеров колоний у соевых ризобий проводили глубокий микробиологический посев. Чувствительность ризобий к концентрации соли в среде оценивали по их способности расти на минимальной агаризованной питательной среде с различной концентрацией хлористого натрия. Для определения усвоения различных источников углеродного питания чистые культуры ризобий выращивали на МРС, где наряду с маннитом использовали другие углеродсодержащие соединения. Чтобы обнаружить изменение pH, к МРС добавляли индикатор бромтимоловый синий из расчета 5 мл 0,4%-ного спиртового раствора/л среды. Вирулентность коллекционных штаммов определяли методом выращивания бактеризованных семян в пробирках с питательной средой для растений [15].

Выделение и очистку хромосомной ДНК осуществляли фенольным методом [16, 17]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе «GeneAmp PCR System 2700» (Applied Biosystems, США). Для амплификации генов 16S рРНК использовали универсальные зубактериальные праймеры: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (27f, прямой праймер) и 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3' (1492g, обратный праймер) [18, 19]. Продукты ПЦР разделяли в 1%-ном агарозном геле с добавлением этидиума бромид в камере для электрофореза в 0,5-кратном буфере ТВЕ по стандартной методике [20]. Выделенные штаммы группировали на основе рестриктазного анализа генов 16S рРНК [21]. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в электрофорезной камере («Helicon») в 1,3%-ном агарозном геле в буфере ТВЕ при напряжении 90 В. Обработку результатов

электрофореза осуществляли специализированной системой обработки изображений «ViTran» (Компания «Биоком», Москва).

RAPD-PCR анализ проводили с праймером M13 (5'-GAGGGTGGCGGTCT-3') [22]. ПЦР осуществляли в 25 мкл смеси, содержащей: 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера («Fermentas», Литва); 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂; 2,5 мкл смеси из 4 дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (2,5 мМ каждого); 10 пМ праймера; 0,1–0,5 мкг ДНК; 1U *Taq*-полимеразы («Fermentas», Литва). После предварительной денатурации (94 °С, 2 мин) проводили 30 циклов амплификации в следующих условиях: денатурация – 94 °С, 60 с; отжиг – 40 °С, 30 с; синтез – 72 °С, 120 с. Продукты ПЦР разделяли в 1,4%-ном агарозном геле с добавлением этидиума бромид в камере для электрофореза в 0,5-кратном буфере ТВЕ при напряжении 90 В. Визуализацию полос осуществляли в УФ-трансиллюминаторе.

Результаты и обсуждение. Штаммы амурской селекции вида *B. japonicum* начинали рост в чашках Петри на 7–10-е и даже 20-е сутки после посева, усваивали ограниченный набор источников углеродного питания с выделением продуктов метаболизма в основном щелочного характера, обладали пониженной осмоустойчивостью (табл.). Экстремальные условия среды обитания переносили плохо, резко замедляли рост на кислых и щелочных питательных средах и прекращали его при высоких температурах (37–42 °С). В то же время, в оптимальных условиях этот вид ризобий доминировал при нодуляции растений сои, обладая высокой и устойчивой вирулентностью.

Штаммы вида *S. fredii* в чашках Петри давали рост на 2–4-е сутки после посева, хорошо усваивали широкий спектр источников углеродного питания с выделением продуктов метаболизма кислотного характера. Большинство штаммов этого вида обладало высокой осмоустойчивостью. В группе штаммов *S. fredii* выделены культуры с универсальными способностями роста при экстремальных условиях среды обитания (высокая температура, низкие и высокие показате-

Отличительные признаки коллекционных штаммов ризобий сои видов *B. japonicum* и *S. fredii*, выделенных из почв Российского Дальнего Востока

№ п/п	Признак	Вид ризобий сои	
		<i>B. japonicum</i>	<i>S. fredii</i>
1	Срок появления колоний в чашках Петри, сутки	7–20	2–4
2	Изменение pH среды при выращивании	Подщелачивание (до 90% штаммов)	Подкисление (100%)
3	Усвоение углеродсодержащих соединений	Маннит, глюкоза	Монозы, олигосахара, многоатомные спирты и др.
4	Осмоустойчивость	Низкая	Высокая
5	Рост на кислых и щелочных средах	Прекращается или замедляется	Не изменяется или замедляется
6	Рост при повышенных температурах (37–42 °С)	Прекращается	Дают рост
7	Вирулентность и интенсивность клубенькообразования у сои	Высокая (до 100%)	Пониженная (10–100%)
8	Потеря способности образования клубеньков (вирулентности) у сои	Не теряют	Могут терять

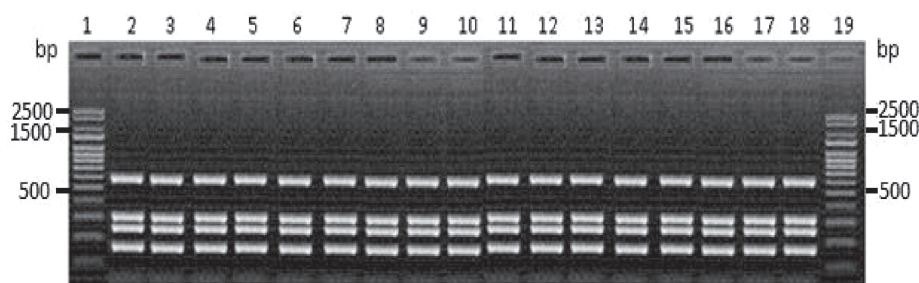


Рис. 1. Рестриктивный анализ амплифицированных генов 16S рРНК изучаемых штаммов *B. japonicum* с помощью эндонуклеазы *HaeIII*; дорожки 2-18 – рестриктивные профили штаммов: 2 – В-1967, 3 – СМ-42к, 4 – СМ-46, 5 – ММ-121, 6 – БМ-91, 7 – Буд-63, 8 – ТС-196, 9 – 648а, 10 – ТМ-437, 11 – МС-63, 12 – АС-17, 13 – ММ-117, 14 – ТА-125, 15 – ТА-40, 16 – ММ-125, 17 – ММ-124, 18 – БМ-58; дорожки 1, 19 – маркер молекулярных масс в парах нуклеотидов (bp) («Fermenas», Литва).

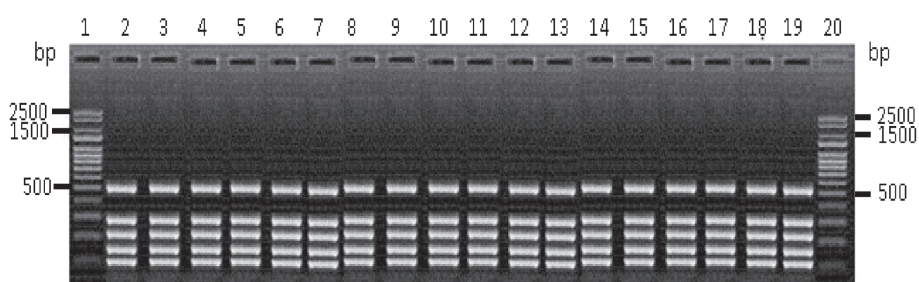


Рис. 2. Рестриктивный анализ амплифицированных генов 16S рРНК изучаемых штаммов *S. fredii* с помощью эндонуклеазы *HaeIII*; дорожки 2-19 – рестриктивные профили штаммов: 2 – КНР6, 3 – МБ-85к, 4 – ББ-87к, 5 – СБ-51к, 6 – КБ11, 7 – ТБ-491, 8 – СБ-43к, 9 – ТБ-524к, 10 – ББ-55к, 11 – ОБ-42, 12 – ТБ-522, 13 – ТБ-365, 14 – ТБ-398, 15 – СБ-38, 16 – ТБ-508, 17 – ТБ-587, 18 – ТБ-467к, 19 – ББ-90к; дорожки 1, 20 – маркер молекулярных масс в парах нуклеотидов (bp) («Fermenas», Литва).

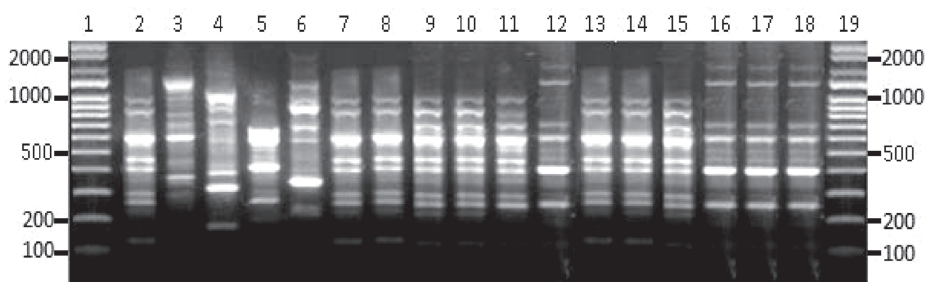


Рис. 3. RAPD-PCR анализ ДНК изучаемых штаммов *B. japonicum* с праймером М13; дорожки 2-18 – профили штаммов (см. подпись к рис. 1); дорожки 1, 19 – маркер молекулярных масс в парах нуклеотидов (bp) («Fermenas», Литва).

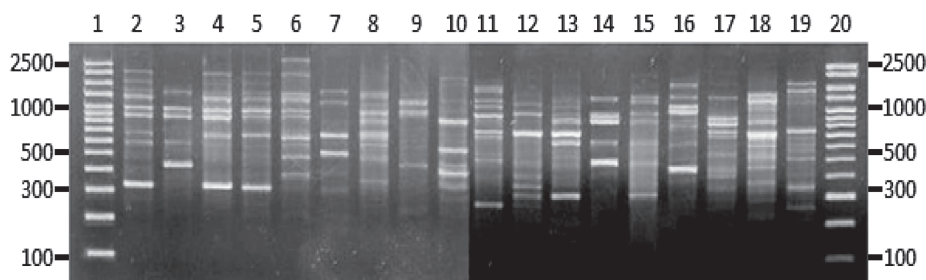


Рис. 4. RAPD-PCR анализ ДНК изучаемых штаммов *S. fredii* с праймером М13; дорожки 2-19 – профили изучаемых штаммов (см. подпись к рис. 2); дорожки 1, 20 – маркер молекулярных масс в парах нуклеотидов (bp) («Fermenas», Литва).

ли рН). Штаммы этого вида обладают пониженной вирулентностью в сравнении с видом *B. japonicum* и способностью терять вирулентность в процессе пересевов. При формировании симбиотического аппарата в годы с экстремальными погодными условиями данный вид ризобий сои может доминировать.

Для оценки популяционной изменчивости аборигенных ризобий были исследованы 35 коллекционных штаммов видов *B. japonicum* и *S. fredii* селекции ВНИИ сои с помощью рестриктивного и RAPD-PCR анализов. В качестве контролей привлекали типовые культуры: штамм В-1967 для вида *B. japonicum*, штамм КНР6 – для вида *S. fredii*.

С целью дифференциации изолятов провели сравнительный анализ фрагментов рестрикции генов 16S рРНК. Известно, что размер амплифицированного с применением универсальных зубактериальных праймеров гена 16S рРНК у всех бактерий составляет около 1450 пар нуклеотидов (п.н.). Однако нуклеотидные последовательности этого участка гена у разных видов бактерий различаются. С помощью эндонуклеаз рестрикции можно различить бактерии, относящиеся к разным видам.

Гель-электрофорез продуктов рестрикции штаммов *B. japonicum* представлен на рис. 1. Результаты сравнительного анализа полученных фрагментов позволили выявить рестриктивные профили амплифицированных генов 16S рРНК длиной 150, 250, 300 и 600 п.н. Следовательно, анализ результатов ферментативного расщепления гена 16S рРНК исследуемых штаммов *B. japonicum* рестриктазой *HaeIII*, подтвердил их идентичность.

Гель-электрофорез продуктов рестрикции штаммов *S. fredii* представлен на рис. 2. Результаты сравнительного анализа полученных фрагментов позволили выявить рестриктивные профили амплифицированных генов 16S рРНК длиной 100, 150, 200, 300 и 600 п.н. Таким образом, анализ результатов ферментативного расщепления гена 16S рРНК исследуемых штам-

мов *S. fredii* рестриктазой *HaeIII* подтвердил их идентичность.

Применение одного рестриктазного анализа может не выявить полиморфизм при дифференциации близкородственных организмов. Поскольку рестриктазные профили генов 16S рРНК у всех изучаемых штаммов *B. japonicum* и *S. fredii* были идентичными, для оценки популяционной изменчивости использовали более чувствительный метод – RAPD-ПЦР. Все продукты амплификации имели длину 100-2000 п.н. и давали 6-10 продуктов/штамм.

По результатам фингерпринтов исследуемые штаммы *B. japonicum* разделили на 5 групп (рис. 3). Идентичные RAPD-профили были получены для девяти штаммов: В-1967, Буд-63, ТС-196, 648а, ТМ-437, МС-63, ММ-117, ТА-125 и ТА-40, их отнесли к группе I. Ко второй группе отнесли четыре штамма: ММ-125, ММ-124, БМ-58 и АС-17. По одному представителю групп III, IV и V составили штаммы СМ-42к, СМ-46 и ММ-121 соответственно.

Проведенный RAPD-анализ свидетельствует о том, что имеются существенные различия и между исследуемыми штаммами *S. fredii* (рис. 4). Все продукты амплификации имели длину 100-2000 п.н. и давали 5-11 продуктов/штамм. Идентичные RAPD-профили были получены для штаммов КНР6, СБ-43к, ТБ-491, отнесенных к группе I. Ко второй группе отнесены штаммы ТБ-522 и СБ-38. У остальных 13 штаммов *S. fredii* RAPD-профили были полностью не идентичны. RAPD-PCR анализ показал внутривидовую специфичность изучаемых штаммов, следовательно, виды обладают широким полиморфизмом.

Таким образом, выявлено значительное межвидовое различие по культурально-биохимическим свойствам штаммов *B. japonicum* и *S. fredii* дальневосточной селекции. В экстремальных условиях среды обитания штаммы быстрорастущего вида *S. fredii* обладают более высокой устойчивостью к жизнедеятельности, чем штаммы медленно растущего вида *B. japonicum*. Однако в оптимальных условиях штаммы *B. japonicum* сохраняют высокие показатели вирулентности.

Рестриктазный анализ амплифицированных генов 16S рРНК изучаемых штаммов *B. japonicum* и *S. fredii* подтвердил их видовую идентичность. Используя более чувствительный метод – RAPD-PCR анализ ДНК, удалось отнести штаммы *B. japonicum* к 5 группам. При этом штаммы вида *S. fredii* оказались более разнообразными, что говорит о популяционной гетерогенности видов. Оказалось, что дальневосточные природные популяции более разнообразны по видовому составу.

Литература

1. Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. – Л.: Колос, 1970. – 192 с.
2. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. – М.: Наука, 1973. – 340 с.
3. Тильба В.А., Бегун С.А., Якименко М.В. Природные популяции ризобий сои и их использование в соевых агроценозах // Инновационная деятельность аграрной науки в Дальневосточном регионе: Сб. науч. тр./ Россельхозакадемия. Дальневост. региональный науч. центр. Примор. НИИСХ. – Владивосток: Дальнаука, 2011. – 362 с.
4. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Матниязов Р.Т., Чубукова О.В., баймиев Ал.Х. Современная систематика клубеньковых бактерий // Биомика. – 2013. – Т. 5. – N 3-4. – С. 136-157.

5. Shamseldin A., Abdelkhalek A., Sadowsky M.J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review // *Symbiosis*. – 2017. – V. 71. – P. 91-109.
6. Бегун С.А., Тильба В.А. Быстрорастущие формы клубеньковых бактерий сои в почвах Приамурья // Бюл. ВИР. Санкт-Петербург, 1992. – Вып. 220. – С. 78-85.
7. Акимова Е.С., Гуменко Р.С., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Маркеры для поиска клубеньковых бактерий на основе симбиотических генов // *Микробиология*. – 2017. – Т. 86. – N 5. – С. 621-628.
8. Frugoli J., Dickstein R., Udvardi M.K., Roy S., Liu W., Sekhar Nandety R., Crook A., Mysore K.S., Pislariu C.I. Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation // *Plant Cell*. – 2020. – V. 32. – P. 15-41.
9. Scholla M., Elkan G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fastgrowing species that effectively nodulates soybeans // *Internat. J. System. Bacteriol.* – 1984. – V. 34. – N 4. – P. 484-486.
10. Jordan D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum*, Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria of leguminous plants // *Internat. J. System. Bacteriol.* – 1982. – V. 32. – N 1. – P. 136-139.
11. Якименко М.В., Бегун С.А. Основные направления исследований дальневосточных природных популяций ризобий // *Вестник ДВО РАН*. – 2016. – № 2. – С. 45-49.
12. *Микробиология: практикум / Л.С. Лавренчук, А.А. Ермошин; М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. – 107 с.*
13. *Практикум по микробиологии / Под ред. В.А. Шильниковой. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.*
14. *Лабораторный практикум по микробиологии: учебное пособие / Н.А. Клёнова. – Самара: Изд-во «Самарский университет», 2012. – 102 с.*
15. Бегун С.А. Способы, приемы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции. – Благовещенск: Зея, 2005. – 70 с.
16. Ausubel F.H., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., K. Struhl K. *Current protocols in Molecular Biology* // John Wiley and Son. – 1994.
17. Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Гермаш Н.Н., Антифеев И.Е. Методы выделения и очистки ДНК из лизатов клеток (обзор) // *Научное приборостроение*. – 2019. – Т. 29. – N 4. – С. 28-50.
18. Versalovic J., Schneider M., Bruijn F.J., Lupski J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction // *Meth. Cell. Mol. Biol.* – 1994. – N 5. – P. 25-40.
19. Lane D.E. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Eds. Stacebrandt E., Goodfellow M. New York: Wiley, 1991. – P. 115-147.
20. Sambrook J., Frisch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989. – 279 p.
21. Savelkoul P.H., Aarts H.J., J. de Haas, Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L., Schouls L., Lenstra J.A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – N 37. – P. 3083-3091.
22. Torriani S. Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *Lactis*. // *J. Appl. and Env. Microb.* – 1999. – V. 65. – N 10. – P. 4351-4356.

Поступила в редакцию 26.02.20
После доработки 02.03.20
Принята к публикации 10.04.20