

ПРОЕКТ
«ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА КЛОНАЛЬНОЕ
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ *FRAGARIA ANANASSA*»

Выполнила:

Лапинская Анастасия

Снежская гимназия, 10 класс

Наставник:

Силина Наталья Игоревна,

зав. лабораторией центра «ОГМА»

Брянск, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1 Клональное микроразмножение земляники садовой в культуре <i>in vitro</i>	6
1.1 Общая характеристика земляники садовой <i>Fragaria Ananassa</i>	6
1.2 Использование фиторегуляторов роста для выращивания растений в культуре <i>in vitro</i> ..	7
Глава 2 Материалы и методы.....	10
2.1 Объект исследования.....	10
2.2 Методы исследования.....	10
Глава 3 Результаты.....	13
Глава 4 Выводы.....	16
Заключение.....	17
Литература.....	18

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

6-БАП – 6-бензиламинопурин, цитокинин

ИМК – Индолилмасляная кислота, ауксин

ИУК – Индолилуксусная кислота, ауксин

НУК – Нафтилуксусная кислота, ауксин

MS – питательная среда Мурасиге-Скуга для выращивания растений в культуре *in vitro*

ВВЕДЕНИЕ

Клональное микроразмножение – массовое бесполое размножение растений в культуре клеток и тканей, при котором возникшие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру. Очень важно, чтобы посадочный материал, получаемый этим методом, был генетически идентичен давшему ему начало растению (Шевелуха, 2008).

Микроклональное размножение земляники садовой в культуре *in vitro* – размножение растений вегетативным способом в условиях стерильности. В результате микроклонирования растений создаются генетически идентичные формы, при этом посадочный материал однороден, растения быстро размножаются, что дает возможность получать большое количество трудно размножаемых высокопродуктивных, ценных видов растений до 1 млн от одного растения в год (Князькина и др., 2011; Широков, Крюков, 2012).

Использование методов культуры клеток, тканей и органов растений *in vitro* открывает новые возможности для вегетативного размножения и поддержания генетических коллекций. Сельскохозяйственные или декоративные растения размножают вегетативным способом в том случае, если они имеют специальные органы для такого типа размножения (клубни, луковицы, клубнелуковицы, столоны) или у них растянутый ювенильный период, что удлиняет сроки получения урожая, затрудняет селекционную оценку отдельных генотипов (древесные и кустарниковые культуры). Также очень важно избавляться от бактериальных и грибных инфекций, так как земляника вегетативно размножаемая культура, поэтому легко накапливает инфекции, в следствии чего снижается урожайность (Белошапкина, 2005; Сковородников и др., 2011; Мацнева, Ташматова, 2018).

К основным преимуществам клонального микроразмножения относится (Шевелуха, 2008; Широков, Крюков, 2012):

- высокий коэффициент размножения – важный показатель при массовом внедрении новых сортов,
- возможность круглогодичного размножения,
- работа проводится в закрытом помещении,
- получение качественного безвирусного материала.

Гипотеза

Фиторегуляторы роста растений из семейства цитокининов по-разному влияют на коэффициент размножения земляники. Под воздействием 6-бензиламинопурина (6-БАП) в питательной среде коэффициент размножения земляники садовой сорта королева Елизавета II и сорта Щедрая будет больше, чем при выращивании на среде с фиторегулятором роста кинетином.

Цель: определить влияние фиторегуляторов роста ряда цитокининов на коэффициент размножения земляники садовой сорта королева Елизавета II и сорта Щедрая.

Задачи:

1. Обзор литературных данных по выращиванию различных сортов земляники садовой в культуре *in vitro*;
2. Введение в культуру семян земляники, а именно, стерилизация семян земляники;
3. Собственно микроразмножение на трех видах питательных сред по прописи Мурасиге-Скуга (среда MS) (безгормональная питательная среда (контроль), питательная среда с добавлением 6-БАП в концентрации 1 мг/л и среда с добавлением кинетина в концентрации 1 мг/л).

ГЛАВА 1 КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

1.1 Общая характеристика земляники садовой *Fragaria Ananassa*

Земляника садовая *Fragaria Ananassa* – одна из наиболее популярных и широко распространенных ягодных культур в мире. На ее долю приходится свыше 70% общемирового производства ягод. Валовое производство земляники в мире постоянно растет и в настоящее время составляет более 4 млн. тонн ягод в год. Широкое распространение земляники садовой связано с рядом ее бесспорных преимуществ в сравнении с другими ягодными и плодовыми культурами. Ценность земляники обуславливается ее скороплодностью, высокими вкусовыми качествами, привлекательным видом и красивой окраской, а также богатым биохимическим составом, питательностью и лечебными свойствами. Земляника очень пластичная культура. При высоком уровне агротехники ее можно успешно выращивать в различных природно-климатических условиях, а в защищенном грунте появляется возможность внесезонного получения товарного урожая (Муратова, 2017).

Ремонтантные сорта *Fragaria × ananassa* интересна тем, что способна закладывать цветковые почки при высоких температурных режимах и длительной протяженности светового дня. Период плодоношения продолжается до поздней осени. При этом ягоды формируются как на материнских, так и на дочерних растениях, образовавшихся в начале сезона (Навальнева, Буковцова, 2012).

Сорт королева Елизавета II

Сравнительно молодой сорт, выведенный в 2001 году в "Донском питомнике" и полюбившийся садоводам возможностью двух-трехкратного сбора урожая в теплый сезон, а также отличными вкусовыми характеристиками ягод, вес которых может достигать 40 грамм. Плоды клубники красивые, глянцевые, с достаточно плотной кожицей и некрупными семенами. Растение хорошо адаптировано к особенностям отечественного климата, однако требует утепления на зиму. Размножается усами, кусты могут зимовать с уже сформированными бутонами.

Преимущества сорта:

- мощные кусты отличаются хорошей урожайностью с несколькими пиковыми периодами на протяжении теплого сезона,
- плотная, крепкая мякоть, сохраняющая вкусовые и эстетические свойства на протяжении 3-4 дней после сбора,
- устойчивость к грибковым заболеваниям и поражению клещами,
- при легком укрытии кусты способны выдерживать температуру до -20°C,

- подходит для выращивания в грунте, на балконах и в теплицах,
- ягоды можно использовать для замораживания, сушки, варки варенья.

Сорт Щедрая

Искусственно выведенный сорт, отличающийся компактными размерами и крупными кустами. Гибридная разновидность клубники, которая была выведена селекционерами благодаря скрещиванию сортов «Обильная» и «Кульвер». Сорт отличается высокой урожайностью и универсальностью применения. Крупноплодный сорт ремонтантной земляники, очень рано вступает в плодоношение. Куст полураскидистый, высотой до 15-18 см, быстро растущий. Многочисленные розетки на усах зацветают и плодоносят в первый год. Ягоды красные, сочные. Плодоношение с конца мая и до поздней осени. Урожайность ягод с одного куста 1,4-1,6 кг. Подходит для «ягодных ампелей» и «земляничной грядки» на лоджиях и балконах. Прочность и выносливость растений, высокая продуктивность подходят для оформления декоративных вертикалей в саду и сбора высокого урожая ягод с небольшой площади.

1.2 Использование фиторегуляторов роста для выращивания растений в культуре *in vitro*

Принято различать фитогормоны и фиторегуляторы роста растений. Фитогормоны – это соединения, с помощью которых осуществляется взаимодействия клеток, тканей и органов, и которые в малых количествах необходимы для запуска и регуляции физиологических и морфогенетических программ растений (Полевой, 1989). Например, Д. Летам (1964) из незрелых зерновок кукурузы выделил первый природный цитокинин – зеатин. Фитогормоны влияют на деление и рост клеток растяжением, состояние покоя, созревание, старение, формирование пола, устойчивость к стрессу, тропизмы, транспирацию; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития. Фиторегулятора роста – вещества негормональной природы, а синтетические вещества, вызывающие физиологические и морфогенетические изменения. Например, 6-БАП, тидиазурон. К числу наиболее активных и изученных соединений гормонального действия растительного происхождения относятся ауксины, гиббереллины, цитокинины и т.д. Эти вещества относятся к классу индукторов (Шевелуха, 2008; Широков, Крюков, 2012).

Ауксины

Ауксины, или соединения индолилуксусной кислоты (ИУК), образуются в зонах с высокой меристематической активностью: в апексах стеблей, в формирующихся семенах, откуда они перемещаются в базипетальном направлении, попадая в боковые побеги и листья.

Ауксины инициируют деление клеток и влияют на скорость их растяжения, регулируют формирование проводящих пучков, обуславливают явления фото- и геотропизма растений, связанные с несимметричностью их распределения. Активация растяжения клеток происходит при стимулировании ауксином секреции протонов в клеточную стенку. Возникающая при этом повышенная концентрация ионов водорода приводит к более активному ферментативному расщеплению поперечных связей, соединяющих между собой целлюлозные микрофибриллы.

Другими свойствами ауксинов являются способность вызывать партенокарпию, задерживать опадание листьев и завязей, активировать корнеобразование у черенков. Ткани, обогащенные ауксином, обладают аттрагирующим действием, то есть способны притягивать питательные вещества. Ауксин обеспечивает корреляционное взаимодействие между органами растущего растения.

Гиббереллины

Гиббереллиновые кислоты (GA) представляют собой класс растительных гормонов и тетрациклических дитерпеноидов, участвующих в росте и развитии растений, включая прорастание семян, рост корней, удлинение стебля, разрастание листьев и цветочную индукцию, развитие пыльников, рост семян и околоплодника.

Гиббереллины — фитогормоны, производные флуоренового ряда. Стимулируют деление и растяжение клеток апикальных и интеркалярных меристем. Под действием гиббереллинов удлиняются листья, цветки и соцветия. Гиббереллины усиливают рост стеблей сильнее, чем ауксины. В то же время гиббереллины практически не влияют на рост корней. Участвуют в процессах прорастания семян и перехода длиннодневных растений к цветению. Способствуют образованию партенокарпических плодов.

Гиббереллины способны смещать пол растений в мужскую сторону. Влияние на метаболизм растения связано с их участием в нуклеиновом обмене: под их действием индуцируется синтез матричных РНК, которые кодируют образование гидролитических ферментов, прежде всего амилаз.

Гиббереллины синтезируются в основном в листьях и оттуда перемещаются вверх и вниз по стеблю.

Цитокинины

Цитокинины — фитогормоны, производные пуринов, стимулируют цитогенез, прорастание семян, способствуют дифференциации почек. Обладают способностью задерживать процессы старения растительных организмов и поддерживать нормальный обмен веществ у пожелтевших листьев, вызывать их вторичное позеленение.

Цитокинины участвуют в мобилизации-притягивании питательных веществ к местам локализации: плодам, семенам, клубням. Освобождают боковые почки от апикального доминирования, вызываемого ауксином, стимулируют их рост. На молекулярном уровне цитокинины в комплексе со специфическим белковым рецептором увеличивают активность РНК-полимеразы и матричную активность хроматина, при этом повышается количество полирибосом и синтез белков. Цитокинины участвуют в синтезе фермента нитратредуктазы и транспорте ионов H^+ , K^+ , Ca^{2+} .

Образуются в корнях, откуда передвигаются вверх по стеблю в акропетальном направлении.

6-Бензиламинопурин, бензиладенин, БАП или ВА представляет собой синтетический цитокинин первого поколения, который стимулирует рост и развитие растений, цветение и насыщенность плодов, стимулируя деление клеток. Он является ингибитором дыхательной киназы в растениях.

Кинетин - это тип цитокинина, класс фиторегуляторов роста, который способствует делению клеток. Кинетин часто используется в культуре тканей растений для индукции образования каллуса (в сочетании с ауксином) и для регенерации тканей побегов из каллуса (с более низкой концентрацией ауксина). Кинетин также широко используется для производства новых растений из культур тканей.

Известно, что 6-БАП проявляет более высокую активность в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза по сравнению с кинетином (Шевелуха, 2008; Широков, Крюков, 2012).

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования является земляника садовая сорт королева Елизавета II (рис. 1), выращиваемая на питательной среде MS без фиторегуляторов роста, а также семена земляники сорта Щедрая, которые будут введены в культуру *in vitro* (рис. 2)

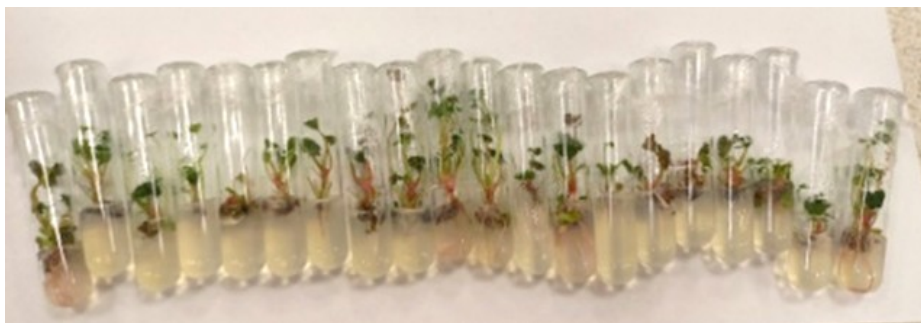


Рис.1 Земляника садовая сорт королева Елизавета II.



Рис.2 Земляника садовая сорт Щедрая.

2.2 Методы исследования

Первым этапом работы по созданию стерильной культуры является стерилизация растительных эксплантов с целью избавления от внешней бактериальной или грибной инфекции. В качестве стерилизующего агента использовали белизну, содержащую активный хлор. Стерилизацию эксплантов, в данном случае семян земляники сорта Щедрая, проводили в растворе белизны в отношении с водой 1:2, время экспозиции составляло 5 минут (рис.3). Данный протокол был выбран как наиболее распространенный среди других научных групп по исследованию стерилизации эксплантов различных сортов земляники садовой (Князькина и др., 2011; Сковородников и др. 2013; Мацнева, 2018).



Рис.3 Стерилизующий агент – белизна.

Рабочее место для введения в культуру *in vitro* представлено на рис. 4. Для этого требуются следующие основные материалы:

1. Семена культуры земляники
2. Стерилизующий раствор Белизны
3. Автоклавированная дистиллированная вода
4. Питательная среда MS



Рис.4 Рабочие материалы для работы по стерилизации семян.

Все работы по введению семян в культуру *in vitro*, а также дальнейшее микрочеренкование ведутся в ламинар-боксе, создающим стерильный воздух (рис. 5).



Рис.5 Стерилизация семян. Этап промывки от раствора белизны.

После стерилизации семена помещали на безгормональную питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (табл. 1) (Шевелуха, 2008).

Таблица 1 Компоненты среды Мурасиге-Скуга.

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л
NH_4NO_3	1650,0
KNO_3	1900,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,0

MgSO ₄ · 7H ₂ O	370,0
KH ₂ PO ₄	170,0
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27,95
Na ₂ ЭДТА * 2H ₂ O	37,3
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ * 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025
Мезоинозит	100,0
Никотиновая кислота (витамин РР)	0,5
Пиридоксин – HCl (витамин РР)	0,5
Тиамин – HCl (витамин В1)	1,0
Глицин	2,0
Сахароза	30000

Готовили два вида питательных сред. Питательную среду для проращивания простерилизованных семян земляники сорта Щедрая готовили без добавления фиторегуляторов роста, среду для выращивания земляники сорта королева Елизавета II готовили с добавлением 6-БАП и кинетин в концентрации 1 мг/л (рис. 6). Для этого добавили необходимые макро-и микроэлементы, хелат железа, необходимые органические вещества, хлорид кальция, а также сахарозу. Далее следует этап добавления фиторегуляторов роста (во вторую среду), а также доведение питательной среды до оптимального рН 5,6-5,8, в конце добавили агар-агар. Вскипятили до растворения агар-агара, разлили по пробиркам Флоринского и автоклавировали (стерилизовали) при 1 атм и 121 °С.



Рис.6 Приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга.

Культивировали экспланты при температуре 23 ± 1 °С, освещенности 4 тыс.люкс и фотопериоде 16 ч день/ 8 ч ночь, относительная влажность воздуха 60–70 % (рис. 7).



Рис.7 Световая комната для культивирования растений культуры *in vitro*.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Основными факторами эффективного введения в культуру *in vitro* растительных объектов являются тип стерилизующего вещества и время обработки, сортовые особенности растения, возраст и качество растительного материала, сезон проведения работ. Полная стерильность растительного материала и быстрая стабилизация ростовых процессов – необходимые условия нормального развития эксплантов в культуре *in vitro*.

Было простерилизовано 8 семян земляники сорта Щедрая (30.01.2023). Результаты стерилизации семян земляники сорта Щедрая представлены на рис. 8 Через 12 дней (10.02.2023) культивирования бактериальных и грибных инфекции не обнаружено. Считаем, что эффективность стерилизации составила 100%. Наблюдение за морфологическими изменениями в настоящее время продолжаются.

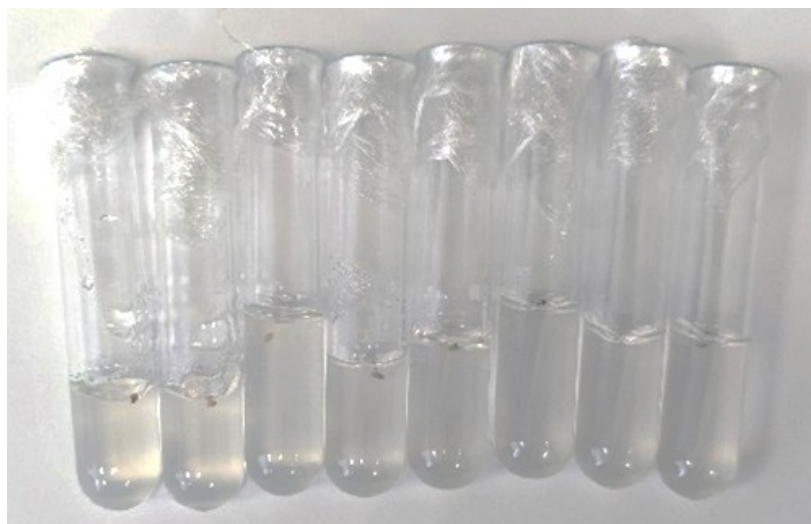


Рис.8 Семена земляники сорта Щедрая через 12 дней после стерилизации раствором Белизны (1:2).

Черенкование и пересадку растений земляники сорта королева Елизавета II осуществляли с питательной среды, не содержащей фиторегуляторов роста, в среду, содержащую 6-БАП и кинетин в концентрации по 1 мг/л, предварительно удалив корневую часть с микрорастений и произведя микрочеренкование. Было получено по 10 растений на каждый вариант питательной среды (рис. 9). Подсчет числа контаминаций, корнеобразования и число нормально развитых листьев (всего на вариант в среднем) на новой питательной среде оценивались через 11 дней после пересадки (табл. 2). Как видно из результатов, приживаемость растений оказалась лучше в среде без фиторегуляторов роста, в других вариантах идет процесс адаптации к новым условиям.

Таблица 2. Результаты по пересадки растений на три вида питательных сред.

Вариант питательной среды	Количество растений на момент пересадки	Контаминация (заражение)	Корнеобразование	Среднее число листьев на 1 растение
Мурасиге-Скуга б/г	10	0	60%	2,9
Мурасиге-Скуга + 6-БАП 1 мг/л	10	0	0%	1,9
Мурасиге-Скуга + кинетин 1 мг/л	10	0	30%	2,6



Рис.9 Микрорастения земляники садовой сорта королева Елизавета II в культуре *in vitro*.

Дальнейшая работа состоит в наблюдении за ростом и развитием растений двух сортов земляники. Для сорта Щедрая число взошедших семян имеет важное значение, так как действие раствора Белизны в течении 5 минут могло губительно сказаться на зародыше семени, поэтому необходимо подобрать меньшее время стерилизации. Для сорта королева Елизавета II не прошло достаточного количества времени для культивирования и образования новых розеток, поэтому оценка влияния двух регуляторов роста 6-БАП и

кинетина по сравнению с контролем (без фиторегуляторов роста) на коэффициент размножения планируется в будущем.



Рис. 10 Конечное число микрорастений земляники сорта королева Елизавета II.

ГЛАВА 4 ВЫВОДЫ

1. Был проведен обзор литературных данных по выращиванию и введению различных сортов земляники садовой в культуре *in vitro*. На основании этих данных был применен протокол стерилизации семян земляники сорта Щедрая с целью введения растений в культуру *in vitro*. Было выявлено, что большинство исследований используют для получения максимального количества микрорастений в основном два фиторегулятора роста цитокининового ряда 6-БАП или кинетин, либо же в сочетании с ауксинами (ИМК, ИУК, НУК) (Князькина и др., 2011; Сковородников и др. 2013).
2. Первый этап работы с культурой *in vitro* предполагает получение стерильного материала. Была проведена стерилизация семян в качестве экспланта с помощью раствора Белизны (1:2). Через 12 дней культивирования бактериальных и грибных инфекций не зафиксировано.
3. Для изучения влияния двух фиторегуляторов роста 6-БАП и кинетин в концентрации по 1 мг/л была осуществлена пересадка имеющихся растений земляники сорта королева Елизавета Пна новые питательные среды. Лучшая приживаемость растений оказалась в среде без фиторегуляторов роста, в других вариантах идет процесс адаптации к новым условиям. Также на процесс роста и развития растений сказывается предыдущее черенкование, поэтому выборку растений в каждом варианте можно считать условно репрезентативной.
4. Для изучения влияния двух фиторегуляторов роста 6-БАП и кинетин в концентрации по 1 мг/л была осуществлена пересадка имеющихся растений земляники сорта королева Елизавета II на новые питательные среды. Лучшая приживаемость растений оказалась в среде без фиторегуляторов роста (контроль). Вариант опыта с использованием в питательной среде 6-БАП (1 мг/л) характеризовался большим коэффициентом размножения (1,4 шт./эксплант), но рост растений был незначительный. В варианте с кинетином (1 мг/л) растения хорошо развивались, но коэффициент размножения был меньше, чем в контрольном варианте (1 шт./эксплант и 1,2 шт./эксплант соответственно).

1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Земляника садовая является одной из основных ягодных культур в нашей стране и за рубежом. Она обладает высокой пластичностью и приспособленностью к различным условиям выращивания, скороплодностью, ежегодной урожайностью, высокими вкусовыми качествами плодов. Применение методов биотехнологии, одним из которых является клональное микроразмножение, направлено на решение различных проблем, которые встречаются при выращивании земляники: получение стабильного многократного урожая земляники в течение года, освобождение от вирусных и бактериальных инфекций, снижение применения химикатов.

В основе метода клонального микроразмножения лежит тотипотентность растительной клетки - уникальная способность одной клетки давать начало целому растительному организму под воздействием экзогенных факторов. В нашем исследовании изучается влияние двух регуляторов роста растений, а именно, 6-БАП и кинетин, которые в той или иной мере способствуют увеличению коэффициента размножения различных культур, оба вещества способствуют снятию апикального доминирования и индукции развития многочисленных пазушных побегов. Изучив влияние каждого регулятора роста на два исследуемых сорта земляники королева Елизавета II и сорта Щедрая, можно будет составить протоколы выращивания в культуре *in vitro*, адаптированные под данные сорта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белошапкина О.О. Биологические и технологические основы оздоровления посадочного материала земляники от вирусов М.: МСХА. – 2005. 162с.
2. Князькина М. С., Денисенко Л. М., Заякин В. В., Айтжанова С. Д., Нам И. Я. Получение сортового посадочного материала земляники садовой методом клонального микроразмножения *in vitro* // Вестник БГУ. 2011. №4. [Электронный ресурс] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/poluchenie-sortovogo-posadochnogo-materiala-zemlyaniki-sadovoy-metodom-klonalnogo-mikrorazmnozheniya-in-vitro> (дата обращения: 13.02.2023).
3. Леонова Н.В. Оптимизация состава питательной среды при размножении земляники садовой *in vitro* // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. №1. С. 45-48.
4. Мацнева О.В., Ташматова Л.В. Оптимизация сроков введения земляники в культуру *in vitro*. 2018 год. [Электронный ресурс] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/optimizatsiya-srokov-vvedeniya-zemlyaniki-v-kulturu-invitro/viewer> (дата обращения 13.02.2023).
5. Муратова С.А. Биотехнологические аспекты размножения плодовых и ягодных культур // Сборник научных трудов ГНБС (WoksoftheStateNikit. Botan. Gard.) – 2017. – Vol. 144. – PartII. – С. 84-89.
6. Полевой В.В. Физиология растений: Учеб. Для биол. Спец. Вузов. – М.: Высш. Шк., 1989 год. – 464 с.
7. Сковородников Д. Н., Леонова Н. В., Андропова Н. В. Влияние состава питательной среды на эффективность размножения земляники садовой *in vitro* // Вестник ОрелГАУ. 2013. №1. [Электронный ресурс] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-sostava-pitatelnoy-sredy-na-effektivnost-razmnozheniya-zemlyaniki-sadovoy-in-vitro> (дата обращения: 13.02.2023).
8. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология – М.: Высш. шк., 2008. – 710 с.
9. Широков А.И., Крюков Л.А. Учебно-методический комплекс по дисциплине «Ботаника». Основы биотехнологии растений. 2012 год Электронное учебно-методическое пособие. [Электронный ресурс] URL: http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Metod_Shirokov_Kryukov.pdf (дата обращения 13.02.2023).