

Оригинальные работы

УДК 577.21:633.71

А.В. ШАХБАЗОВ¹, Г.А. ЯКОВЛЕВА²,
И.А. РОДЬКИНА², Н.А. КАРТЕЛЬ¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Минск, 220072, ул. Академическая 27,
E-mail: a.shakbazau@igc.bas-net.by

² Научно-практический центр НАН Беларуси
по картофелеводству и плодоовощеводству,
Беларусь, п. Самохваловичи, 223013, ул. Ковалева 2а,
E-mail: y.galina@mail.ru

ПЛЕЙОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГЕНА ХИТИНАЗЫ ИЗ *SERRATIA PLYMUTHICA* В ТРАНСГЕННОМ КАРТОФЕЛЕ



Плейотропные эффекты трансгенеза включают в себя различные последствия inserции трансгена, не связанные с непосредственным действием его продукта. Необходимость оценки перспектив применения в селекции созданного нами трансгенного картофеля, содержащего ген бактериальной хитиназы ch1A, обусловила изучение возможного неспецифического влияния интродукции трансгена на фенотипические свойства трансгенных линий. В настоящем исследовании рассматривается влияние интродукции трансгена хитиназы на такие агрономически важные характеристики картофеля, как урожайность и неспецифическая устойчивость.

© А.В. ШАХБАЗОВ, Г.А. ЯКОВЛЕВА, И.А. РОДЬКИНА,
Н.А. КАРТЕЛЬ, 2008

Введение. Трансгенные растения получили широкое распространение, и процент занимаемых ими посевных площадей во многих странах мира постоянно повышается. В связи с этим растет интерес к возможности побочных эффектов, вызванных inserцией чужеродного генетического материала. Накопленные к настоящему времени литературные данные свидетельствуют о необходимости многофакторного комплексного анализа последствий встраивания в растительный геном чужеродной ДНК для оценки возможного побочного воздействия трансгеноза на важные сельскохозяйственные культуры. Плейотропные эффекты трансгеноза могут быть вызваны как процедурами культуры клеток *in vitro* и собственно генетической трансформации, так и непосредственно inserцией трансгена либо побочной чужеродной ДНК (последовательностей маркерных генов, бактериальных плазмид, фрагментов бактериального генома и дополнительных полных либо частичных копий трансгенной вставки). Интеграция привнесенного извне генетического материала в геном может привести к изменениям в структуре и функции генома и, как следствие, в биохимических и физиологических процессах, происходящих на уровне клетки и растения в целом и обусловленных как мутациями непосредственно в сайте inserции трансгена, так и мутациями в произвольных сайтах генома [1]. Подобные мутации в сайте inserции и геномные мутации могут вызывать нежелательные эффекты при их возникновении в функционально активной области генома растения, включающей кодирующие последовательности и регуляторные элементы. Возможные изменения в генотипе и морфологии растения могут повлиять на сортообразующие параметры при дифференцировке и паспортизации сортов и форм и соответственно при использовании трансгенных растений в селекционных целях.

Трансформационно-индуцируемые мутации подразделяются на мутации в сайте inserции и мутации в произвольных сайтах генома, также называемые геномными мутациями [1]. В частности, мутации в сайте inserции вызываются агробактериальной трансформацией — методом, который более 20 лет используется для получения трансгенных растений и более 10 лет — для создания коммерческих сортов. Исследования популяции трансформантов

арабидопсиса [2] показали, что большинство инсерций Т-ДНК вызывают в сайте интеграции небольшие (1–100 п.н.) делеции, а в более чем 20 % случаев – широкомасштабные перестройки геномной ДНК, в том числе крупные (до 78 тыс. п.н.) делеции [3], дубликации и хромосомные транслокации [4]. Для более 7 % трансформантов была показана инсерция побочной чужеродной ДНК плазмиды либо участков Т-ДНК. Частота интеграции участков плазмид вне области Т-ДНК варьировала от 20 до 62 % при использовании различных протоколов трансформации [1].

Другой популярный метод – баллистическая трансформация – также может иметь выраженные мутагенные эффекты, включающие крупные делеции или геномные перестройки. Трансгенная ДНК в большинстве случаев может интегрироваться в виде сложных многокопийных кластеров инсерций, иногда перемежающихся фрагментами растительной ДНК различной длины. Однокопийные вставки при баллистической трансформации достаточно редки [1]. Недостаточная очистка наносимых на частицы фрагментов может приводить к вставкам бактериальных плазмид и участков бактериального генома.

Наличие дополнительных вставок показано и для доступных на рынке трансгенных вариантов сельскохозяйственных культур. Например, коммерческая трансгенная линия сои Roundup Ready® (событие 40–3–2), помимо заявленной копии трансгена *epsps*, включает фрагмент гена *epsps* размером 254 п.н., сегмент ДНК неидентифицированного происхождения размером 540 п.н., сегмент растительной ДНК и еще один фрагмент гена *epsps* размером 72 п.н., а также различные дополнительные геномные изменения [5]. Мутации в сайте инсерции выявлены и в коммерческой трансгенной линии кукурузы YieldGuard® [6]. Линии трансгенного картофеля NewLeaf® Plus, устойчивого к колорадскому жуку и вирусу PLRV, показали наличие мультিকопийных либо перестроенных вставок целевых и маркерных трансгенов, а также инсерций бактериального селективного маркера и локуса репликации [1].

Изучение геномных мутаций методами анализа полиморфизма ДНК (RFLP, AFLP, RAPD и другие ПЦР-методы) показало возможность

наличия многих сотен или тысяч мутаций в различных сайтах генома растений, трансформированных с применением упомянутых типовых протоколов [7]. «Индекс геномной тождественности», равный 100 % у контрольных растений, для трансгенных растений составил 96–98 % [8]. Несмотря на несовершенство методов анализа, факт наличия геномных мутаций, а также их наследования в потомстве подтвержден для большого количества трансформантов [7].

Мутации в сайте инсерции и геномные мутации могут вызывать нежелательные эффекты при их возникновении в функционально активной области генома растения, включающей кодирующие последовательности и регуляторные элементы. Указанные нежелательные эффекты могут проявляться в изменении агрономических характеристик растения. Например, трансформационно-индуцированная мутация может нарушить целостность гена, ответственного за синтез какого-либо питательного вещества, или же вызвать изменения в гене, ответственном за контроль синтеза токсичных метаболитов. Изменения в структуре гена, кодирующего регуляторный протеин, например фактор транскрипции, могут вызвать каскад нарушений экспрессии комплекса различных генов.

В целом плейотропные эффекты трансгеноза являются достаточно слабоизученным аспектом трансформации растений, однако даже немногочисленные работы в этом направлении позволяют говорить о необходимости тщательного анализа трансгенных вариантов сельскохозяйственных культур, предлагаемых для коммерциализации.

Материалы и методы. Создание и анализ трансгенных растений картофеля. Ген хитиназы из почвенной бактерии *Serratia plymuthica* IC1270 [9] в cassette экспрессии CaMV был встроен в векторы pGreen0229 и pBI121 [10]. Популяция трансгенного картофеля сорта Дельфин была создана методом агробактериальной трансформации, инсерция трансгена была подтверждена методами ПЦР и блот-гибридизации по Саузерну [11]. Анализ экспрессии трансгена проводили посредством RT-PCR и биохимических методов с хитиназа-специфичными субстратами, степень подавления

роста хитин-содержащих грибов оценивали по стандартным методикам [9, 12].

Молекулярный и биохимический скрининг трансформантов. Реакцию RAPD осуществляли с использованием праймеров, разработанных фирмой Oregon (орw05 и орw10), праймера р37, любезно предоставленного Сиволапом [13], и праймеров, разработанных Университетом Британской Колумбии (UBC73, UBC127, UBC140, UBC180, UBC337, UBC356, UBC458, UBC499, UBC601), по ранее описанным программам [13, 14]. Продукты амплификации разделяли в 2%-ном агарозном геле с последующей визуализацией на системе Gel-Doc 2000. Биохимический анализ проводили посредством SDS-PAGE общего белка и тонкослойной хроматографии гликоалкалоидов [15].

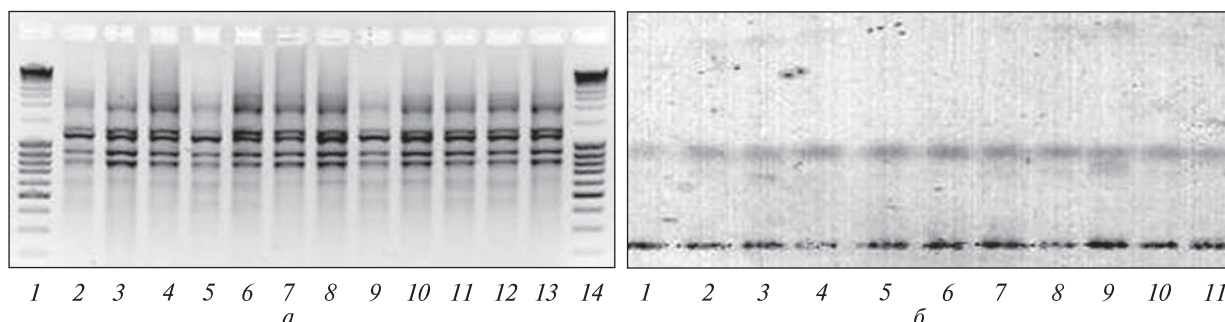
Фенотипический анализ трансгенных растений. Полученные в условиях защищенного грунта миниклубни опытных трансгенных образцов и контрольных вариантов были высажены на однорядковые делянки по 10 клубней в двукратной повторности. Описание морфологических признаков проводили в соответствии с частной методикой отличимости, однородности и стабильности UPOV [15] индивидуально для каждого растения. В опытном образце учитывали степень выраженности существенных морфологических признаков. Анализировали, в частности, высоту, тип и габитус куста; интенсивность антоциановой окраски стебля; силуэт листа, интенсивность его зеленой окраски, антоциановой окраски на главной жилке и наличие плющелостности; размер, ширину, волнистость края, глубину жилкования и матовость верхней поверхности долей листа, форму конечной доли; количество цветков, антоциановую окраску цветоножки, частоту образования плодов; окраску внутренней и внешней стороны венчика цветка; окраску и форму пыльников; форму клубня, характер и окраску кожуры, окраску основания глазков и мякоти. Учет по элементам урожайности трансгенных образцов и контрольных вариантов проводили во время уборки покусно.

Фитопатологический анализ трансгенных растений. Индуцированные трансгенозом плейотропные эффекты в отношении устойчивости растений картофеля оценивали на примере *Phytophthora infestans* — одного из

ключевых представителей патогенов картофеля. Для оценки на устойчивость к фитофторозу использовали смесь местных изолятов патогена *Phytophthora infestans* 2005 г. Учеты проводили на 7-е сутки после заражения в баллах по девятибальной шкале (9 — очень высокая устойчивость, 1 — очень низкая устойчивость). При анализе устойчивости трансформантов картофеля к фитофторозу был использован стандартный тест на отделенных листьях. Поскольку клетки *Phytophthora infestans* не содержат хитин, исключается прямое влияние трансгенного продукта хитиназы на потенциальные плейотропные эффекты.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате экспериментов по трансформации была создана популяция трансгенного картофеля сорта Дельфин, инсерция и экспрессия трансгена была подтверждена молекулярным и биохимическим анализами [11]. Эксперименты *in vitro* показали способность трансгена обеспечивать подавление роста патогенных грибов *Fusarium oxysporum* и *Alternaria solani* до 60 % в сравнении с нетрансгенным контролем, а также более чем двукратное снижение уровня прорастания спор возбудителя *Botrytis cinerea*. Для отдельных линий получены предварительные результаты о повышенной устойчивости к *Alternaria solani* при искусственном заражении интактных растений в условиях теплицы.

Оценку плейотропных эффектов трансгена хитиназы проводили посредством молекулярного и биохимического скрининга трансформантов, морфологического анализа и изучения неспецифической устойчивости трансформантов. Для оценки геномной тождественности трансформантов использовали метод RAPD. Большинство использованных праймеров показали эффективную амплификацию с трансгенными и контрольными растениями картофеля. При разделении продуктов амплификации в 2%-ном агарозном геле полосы наблюдались в диапазоне 200–3000 п.н.; большинство фрагментов детектировалось в области 500–1500 п.н. Диапазон аллелей по всем праймерам и образцам составил от 1 до 13, среднее число аллелей на праймер равнялось 4,2. По результатам RAPD-анализа не выявлены полиморфные аллели, достоверно свидетельствующие о



Скрининг трансгенного картофеля на наличие молекулярно-генетических и биохимических отклонений: *a* – RAPD-анализ с применением праймера p37; 1, 14 – маркер молекулярной массы MassRuler («Fermentas»); 2–4 – контрольные образцы картофеля; 5–13 – *chiA*-трансгенные линии; *б* – анализ биосинтеза алкалоидов в картофеле; 1–3 – контрольные образцы картофеля; 4–11 – *chiA*-трансгенные линии

Анализ урожайности и неспецифической устойчивости трансгенного картофеля

| Образец | Вектор | Устойчивость к фитофторозу, $\bar{x} \pm S_x$, балл | <i>n</i> | Общая масса клубней с куста, $\bar{x} \pm S_x$, г | <i>n</i> |
|---------|---------------------|--|----------|--|----------|
| DK | Контроль | 6,1 ± 0,4 | 58 | 787,50 ± 97,89 | 20 |
| DH-1 | pBI- <i>chiA</i> | 5,3 ± 0,3 | 75 | 596,25 ± 54,87 | 20 |
| DH-3 | pBI- <i>chiA</i> | 6,2 ± 0,3 | 67 | 647,37 ± 68,49 | 19 |
| DH-17 | pBI- <i>chiA</i> | 6,9 ± 0,3 | 67 | 688,24 ± 71,38 | 17 |
| DH-22 | pBI- <i>chiA</i> | 5,5 ± 0,3 | 60 | 683,33 ± 56,77 | 18 |
| DH-23 | pBI- <i>chiA</i> | 5,0 ± 0,3* | 63 | 760,29 ± 75,15 | 17 |
| DH-29 | pBI- <i>chiA</i> | 5,8 ± 0,3 | 66 | 309,44 ± 47,65* | 18 |
| DH-39 | pBI- <i>chiA</i> | 4,1 ± 0,5* | 20 | 457,50 ± 66,75* | 20 |
| DH-41 | pBI- <i>chiA</i> | 3,8 ± 0,3* | 71 | 418,75 ± 46,68* | 20 |
| DH-42 | pBI- <i>chiA</i> | 4,9 ± 0,3* | 70 | 656,58 ± 59,80 | 19 |
| DH-43 | pBI- <i>chiA</i> | 6,1 ± 0,3 | 69 | 753,75 ± 70,26 | 20 |
| DCEA-7 | pGreen- <i>chiA</i> | 6,5 ± 0,3 | 65 | 645,0 ± 55,83 | 20 |
| DCEA-8 | pGreen- <i>chiA</i> | 4,2 ± 0,3* | 75 | 340,0 ± 29,67* | 20 |

Примечание. Опыты по оценке устойчивости к фитофторозу и урожайности проводили отдельно. * Разница для опытного и контрольного вариантов достоверна, $P < 0,05$.

различия между контрольным и каким-либо из трансгенных генотипов (рисунок, *a*). Анализ белков картофеля, доступных для детекции посредством электрофореза, также не показал каких-либо нарушений их экспрессии либо достоверных различий в уровне синтеза. Вместе с тем упомянутый метод анализа не гарантирует отсутствия изменений каких-либо минорных белков, присутствующих в незначительной концентрации, но зачастую играющих ключевую роль в биосинтезе вторичных метаболитов, важных для нормального развития и выживания растения. Примером небелковых компонентов, чувствительных к интродукции чужеродного генетического материала, являются алкалоиды картофеля. *chiA*-Трансгенные

образцы картофеля тестировали на уровень и состав синтезируемых гликоалкалоидов методом тонкослойной хроматографии (рисунок, *б*). Указанный метод не дает возможности определения точного количества того или иного алкалоида, однако позволяет оценить уровень его синтеза и наличие тех или иных нетипичных и потенциально токсичных фракций. Поскольку синтез гликоалкалоидов как сложный биохимический процесс является достаточно чувствительным к различным генетическим манипуляциям и контроль этого признака рекомендуется при введении трансгена в геном картофеля [17, 18], при изучении коллекции трансгенных растений картофеля, несущих вставку хитиназы из *Serratia plymuthica*, мы

учитывали возможность нарушения биосинтетических путей вследствие трансгенеза, чреватую снижением неспецифической устойчивости сортового картофеля. Однако проведенный анализ не выявил существенного изменения в синтезе как соланидина, так и минорных компонентов, что может свидетельствовать о сохранении в целом изначального характера синтеза алкалоидов в *chiA*-трансгенном картофеле.

В соответствии с данными проведенного морфологического описания все трансгенные образцы сохранили присущие исходному сорту признаки стебля, листа и цветка. Необходимо отметить, что при трансформации табака тем же вектором (*pBI-chiA*) нами были отмечены случаи лонгостилии и стерильности, ранее подробно описанные Дейнеко с соавт. [19]. В полевом эксперименте у трансгенного образца DCEA-8 зарегистрированы явные различия по форме клубня: овальные и длинно-овальные по сравнению с кругло-овальной у исходного сорта. По результатам статистического анализа урожайности 8 из 12 трансгенных образцов от сорта Дельфин имели общую массу клубней с куста в пределах средних значений для контрольных вариантов (таблица), т.е. в пределах варьирования признака для исходного генотипа.

Урожайность трансгенных образцов ДН-39 и ДН-41 была достоверно ниже, чем у нетрансформированного сорта (ДК). Самые низкие показатели урожайности отмечены у образцов ДН-29 и DCEA-8. Общая масса клубней для этих образцов составила примерно 50 % нижнего предела для исходного сорта.

Достоверное снижение устойчивости к *Phytophthora infestans* по сравнению с нетрансформированным сортом Дельфин в тесте с отдельными листьями наблюдали для 5 из 12 *chiA*-трансгенных линий (41,7 %). В то же время доля трансгенных линий с проявлением признака «устойчивость к фитофторозу» в пределах вариаций среднего значения исходного генотипа довольно значительна — 58,3 % (таблица).

Анализ приведенных в таблице обобщенных данных по урожайности и неспецифической устойчивости трансгенного картофеля свидетельствует о том, что выявленные негативные плейотропные эффекты могут являться генотип-специфичными и рассматриваться

как интегральная характеристика трансформанта — падение урожайности коррелирует ($r = 0,56$, $P < 0,05$) с падением неспецифической устойчивости к фитофторозу. Помимо этого, линия ДН29 по предварительным данным показала некоторое снижение устойчивости к колорадскому жуку.

Таким образом, интродукция трансгена в растение может приводить к заметному негативному эффекту, выражающемуся в падении неспецифической устойчивости и урожайности картофеля. Вместе с тем наши исследования не показали какой-либо корреляции указанных нарушений с наличием/отсутствием экспрессии либо уровнем активности фермента хитиназы, что позволяет сделать предположение о неспецифическом характере плейотропных эффектов, вызванных inserцией чужеродной ДНК в функционально активные сайты генома. Необходимо также отметить, что большая часть трансформантов не проявила каких-либо негативных эффектов и может быть использована для дальнейших селекционных испытаний с целью отбора образцов, способных к подавлению роста хитин-содержащих грибов.

Выводы. Плейотропные эффекты, индуцированные трансгенозом, потенциально достаточно сложны для обнаружения на геномном и биохимическом уровнях, однако конечным последствием их может стать вполне заметное снижение неспецифической устойчивости растений, ухудшающее агрономическую ценность подобного трансгенного генотипа. По литературным данным, картофель, трансформированный хитиназой из *Phaedon cochleariae*, проявил подобный пробиотический эффект в отношении тли *Myzus persicae* [20]. Снижение устойчивости к патогенам и вредителям показано также при введении кассет, содержащих широко распространенные маркерные и репортерные гены. Так, введение маркерных генов *nptII-gus* привело к повышению потребления листьев картофеля личинками колорадского жука до 50 % как на первичных регенерантах, так и на клубневом потомстве [21]. Негативные эффекты маркерных генов на трансгенном картофеле при полевых испытаниях были показаны и в других исследованиях [22].

Итоги анализа плейотропных эффектов трансгена хитиназы из *Serratia plymuthica* в

картофеле свидетельствуют о том, что, несмотря на отсутствие детектируемых проявлений индуцированного трансгеном мутагенеза на молекулярно-генетическом и биохимическом уровнях, инсерция трансгена способна вызывать изменения в морфологии растения и его неспецифической устойчивости. Это может быть объяснено крайне высокой полигенностью упомянутых признаков, вследствие которой выключение или нарушение одного из компонентов вызывает описанные системные эффекты. Вместе с тем нет никаких оснований считать, что отмеченные плейотропные эффекты могут представлять какую-либо опасность для человека или животных. Данные научной литературы, в том числе работ, посвященных плейотропным эффектам трансгенеза, свидетельствуют об отсутствии каких-либо негативных эффектов ГМО на организм человека.

Необходимо также отметить, что большая часть исследованных нами трансгенных линий не показала значимых отклонений морфологии, урожайности либо неспецифической устойчивости растения, что открывает возможности для успешного селекционного отбора линий картофеля с высокой активностью хитиназы и улучшенными антигрибными свойствами.

SUMMARY. We estimate the influence of transgenic bacterial chitinase from soilborne *Serratia plymuthica* onto agronomical important traits of potato, such as productivity and non-specific resistance. Transgene has been delivered into potato variety Delfin via Agrobacterial transformation with pGreen0229 and pBI121-based vectors. Growth inhibition of chitin-containing pathogenic fungi was shown. However, over 40 % of transgenic lines demonstrated decreased non-specific resistance to late blight (down to 62 % compared to control genotype), as well as 40–60 % productivity drop.

РЕЗЮМЕ. Розглянуто вплив інтродукції трансгена хітинази з ґрунтової бактерії *Serratia plymuthica* на агрономічно важливі характеристики картоплі, зокрема на урожайність та неспецифічну стійкість. Трансген у складі векторів на основі pGreen0229 та pBI121 був введений в картоплю сорту Дельфін методом агробактеріальної трансформації і показав можливість інгібувати зростання фітопатогенних грибів, що вміщують хітин. Разом з тим понад 40 % трансгенних ліній показали знижену стійкість до фітофторозу (до 62 % від вихідної) та зменшення врожайності на 40–60 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilson A., Latham J., Steinbrecher R. Genome Scrambling – Myth or Reality? Transformation-Induced Mutations in Transgenic Crop Plants. – Brighton : EcoNexus, 2004.
2. Forsbach A., Schubert D., Lechtenberg B., Gils M. et al. A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome // Plant Mol. Biol. – 2003. – 52. – P. 161–176.
3. Kaya H., Sato S., Tabata S., Kobayashi Y. et al. Hosoba toge toge, a syndrome caused by a large chromosomal deletion associated with a T-DNA insertion in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. – 2000. – 41. – P. 1055–1066.
4. Tax F., Vernon D. T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics // Plant Physiol. – 2001. – 126. – P. 1527–1538.
5. Makarevitch I., Svitashv S.K., Somers D.A. Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment // Plant Mol. Biol. – 2003. – 52. – P. 421–432.
6. Hernandez M., Pla M., Esteve T., Prat S. et al. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence // Transgenic Res. – 2003. – 12. – P. 179–189.
7. Sala F., Arencibia A., Castiglione S., Pelucchi M. Somaclonal variation in transgenic plants // Acta Hort. – 2000. – 530. – P. 411–419.
8. Labra M., Savini C., Bracale M., Sala F. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. – 2001. – 20. – P. 325–330.
9. Chernin L., De La Fuente L., Sobolev V., Haran S., Vorgias C.E., Oppenheim A.B. et al. Molecular cloning, structural analysis and expression in *E. coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans* // Appl. and Env. Microbiol. – 1997. – 63. – P. 834–839.
10. Шахбазов А.В. Экспрессия и наследование трансгена бактериальной эндохитиназы в растениях табака // Докл. НАН Беларуси. – 2005. – 49, № 5. – С. 86–88.
11. Шахбазов А.В., Панюш А.С., Чернин Л.С., Картель Н.А. Трансформация белорусских сортов картофеля генами, кодирующими PR-протеины // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006. – № 2. – С. 50–54.
12. Roberts W.A., Selitrennikoff C.P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity // J. Gen. Microbiol. – 1988. – 134. – P. 169–176.
13. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Под ред. Ю.М. Сиволапа. – Киев : Аграр. наука, 1998.
14. Шахбазов А.В., Забенькова К.И., Панюш А.С., Кар-

- тель Н.А. Инсерционный мутагенез в трансгенном картофеле: RAPD- и AFLP-анализ // Генетика и селекция в XXI веке : Матералы VIII съезда генетиков и селекционеров Республики Беларусь. — Минск, 2002. — С. 289–291.
15. Воронкова Е.В., Шахбазов А.В., Панюш А.С., Картель Н.А. Анализ биосинтеза гликоалкалоидов в трансгенном и гибридном картофеле // Молекулярная и прикладная генетика. — Минск, 2006. — Т. 3. — С. 16–20.
 16. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability / UPOV. — Potato / Pomme de terre / Kartoffel. TG/23/5. — 1986 — P. 11–21.
 17. Esposito F., Fogliano V., Cardi T., Carputo D. et al. Glycoalkaloid content and chemical composition of potatoes improved with nonconventional breeding approaches // J. Agric. Food Chem. — 2002. — **50**. — P. 1553–1561.
 18. Matthews D., Jones H., Gans P., Coates S. et al. Toxic secondary metabolite production in genetically modified potatoes in response to stress // J. Agric. Food Chem. — 2005. — **53**. — P. 7766–7776.
 19. Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская А.А., Филипенко Е.А., Шумный В.К. Нестабильность экспрессии маркерного гена nptII у трансгенных растений табака // Физиология растений. — 2000. — **47**, № 3. — С. 446–452.
 20. Saguez J., Hainez R., Cherqui A. Giordanengo P. Unexpected effects of chitinases on the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered via transgenic potato plants (*Solanum tuberosum*) and in vitro // Transgenic Res. — 2005. — **14**. — P. 57–67.
 21. Lecardonnel A., Prevost G., Beaujean A., Sangwan-Norreel B.S. Genetic transformation of potato with nptII-gus marker genes enhances foliage consumption by Colorado potato beetle larvae // Mol. Breed. — 1999. — **5**. — P. 441–451.
 22. Dale P., McPartland H. Field performance of transgenic potato plants compared with control regenerated from tuber discs and shoots cuttings // Theor. Appl. Genet. — 1992. — **84**. — P. 585–591.

Поступила 01.02.07