

Устойчивость к канамицину растений табака при воздействии препаратов ДНК на семена

В. А. Кацан*, А. И. Потопальский, М. Е. Леськив

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Исследовано влияние экзогенной ДНК (эДНК) плазмиды pCAMVNEO, несущей ген устойчивости к канамицину из бактериального Tn 5, на устойчивость к канамицину растений табака сорта Крупнолистный 20 в первом и втором поколениях (T₁ и T₂). эДНК pCAMVNEO использовали как отдельно, так и в смеси с эДНК наслена черного (Solanum nigrum) солеустойчивого и pTi8628 при действии на семена в водных растворах. Выявлена устойчивость к канамицину преобладающей части растений T₁. Резистентные в T₁ растения оказались чувствительными к антибиотик в T₂. Среди большинства вариантов опыта не было обнаружено взаимосвязи между статусом устойчивости к канамицину и содержанием основных групп фотосинтетических пигментов.

Введение. При действии канамицина и других антибиотиков, ингибирующих биосинтез белка на 70S рибосомах, наблюдаются подавление развития тилакоидной системы хлоропластов и снижение числа рибосом в их матриксе, что свидетельствует о нарушении биосинтеза белков, необходимых для формирования фотосинтетических мембран, а также ферментов, участвующих в биосинтезе пигментов фотосинтеза [1, 2]. Внешне это проявляется в замедлении роста различных органов растений, изменении длины и окраски листьев, появлении хлоротических пятен или полном обесцвечивании листьев [1—4]. Следует отметить сходство изменений, полученных в результате действия антибиотиков, с фенотипическими проявлениями мутаций, вызываемых N-нитрозо-N-метилмочевинной [2].

Устойчивость к канамицину, а также к ряду других антибиотиков аминокликозидного ряда (неомицин, G-418) обуславливается экспрессией гена неомицинфосфотрансферазы II (prt II) из бактериального транспозона Tn 5 (5,8 тыс. п. н.), содержащего два IS50-элемента в инвертированной ориентации, которые окружают район (2,7 тыс. п. н.), несущий гены устойчивости к антибиотикам [5]. Ген prt II включается в геном и экспрессируется в клетках животных, растений и бактерий, наследуется как доминантный фактор, согласно законам Менделя, поэтому он используется в качестве универсального маркера в генной инженерии [4, 6—8]. Специфически прерывая или делетируя гены, кодирующие апопротеины фотосинтетических мембран, ген prt II используется также для сайт-направленного мутагенеза у фотосинтетических бактерий [9].

Большое количество работ посвящено получению канамицинустойчи-

*Correspondence address.

вых трансформантов табака. Было выявлено, что ген *pr1 II* включается в высокомолекулярную ДНК табака [7].

При действии на семена препаратами, содержащими ДНК *pCAMVNEO*, несущей ген *pr1 II* [6], нами показано увеличение содержания хлорофиллов в листьях зацветающих растений желтолистного сорта табака Крупнолистный 20 [10].

Известно, что интеграция Т-ДНК *Ti*-плазмид агробактерий в геном приводит к росту опухолей у двудольных растений [11]. Неопластическую трансформацию протопластов табака и петунии вызывала также выделенная из культур агробактерий ДНК *Ti*-плазмид [7]. Следует отметить значительные отличия в структуре Т-ДНК, выявляемые в протопластах при воздействии очищенных ДНК *Ti*-плазмид, по сравнению с культурами онкогенных агробактерий: в случаях прямого переноса наблюдалась фрагментация Т-ДНК [7]. При делеции последовательностей, обуславливающих рост опухолей, ДНК *Ti*-плазмид используется как основа для конструкции векторов, предназначенных для переноса генов в растения [7, 12]. Нормальные фертильные растения, выращенные из трансформированных таким образом протопластов, продолжают нести Т-ДНК, которая наследуется как единичный менделирующий признак. Т-ДНК может включаться как в уникальные, так и в повторяющиеся последовательности ДНК растений [12].

Мутагенный эффект тотальных препаратов ДНК *Ti*-плазмид при действии на семена, очевидно, ранее не исследовался. Нами было обнаружено увеличение содержания хлорофиллов в листьях на стадии зацветания вследствие обработок семян табака сорта Крупнолистный 20 препаратами ДНК *pTi8628* [10].

Было показано повышение количества хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов, а также возрастание доли хлорофилла *b* в листьях зацветающих растений табака этого сорта при воздействии на семена препаратами, содержащими ДНК солеустойчивой формы паслена черного [10]. Алкилированные тиофосфамидом ДНК (ДНТ) более устойчивы к действию нуклеаз, оказывают сильное влияние на изменчивость признаков у растений, не вызывая крупных хромосомных поломок [10].

Данная работа является продолжением исследований мутагенного действия препаратов, содержащих очищенную ДНК *pCAMVNEO*, на геном растений. Цель настоящей работы — изучение влияния препаратов, содержащих ДНК *pCAMVNEO*, на устойчивость к канамицину растений табака сорта Крупнолистный 20 в первом и втором поколениях. Ставилась также задача проанализировать уровень содержания хлорофиллов и каротиноидов в резистентных и чувствительных к канамицину растений табака этого сорта.

Материалы и методы. Для исследований были использованы семена чистой линии табака сорта Крупнолистный 20, автором которого является А. П. Гребенкин (НПО «Табак», Краснодар, Россия), любезно предоставленные Б. А. Левенко (Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев).

Очищенная ДНК *pCAMVNEO* любезно предоставлена С. П. Смирновым (Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва). В опытах была использована также полученная в лаборатории ДНК *pTi8628* [11], и ДНК паслена черного солеустойчивого [13]. Алкилирование ДНК тиофосфамидом осуществляли, как описано ранее [14].

Семена (по 300 штук в каждом варианте) обрабатывали в водных растворах ДНК, согласно оригинальному методу. Поскольку разработанный нами метод является предметом изобретения, его описание в данной работе не приводится. Семена после обработки промывали водой и высевали в

обработанную в автоклаве (1,5 атм., 40 мин) почву, сеянцы пикировали. Растения выращивали методом почвенной культуры в отдельных сосудах в условиях теплицы и вегетплощадки. Для тестирования устойчивости к канамицину растений первого и второго поколений (T_1 и T_2) применен метод тестирования *in vivo* [4]. Описанный в работе [4] способ опрыскивания растений растворами канамицина нами был заменен инъекциями этих же растворов в ткань листа. Устойчивость к канамицину растений T_2 проверяли также методом культуры проростков, полученных из семян индивидуальных растений T_1 путем самоопыления. Нанесение капель и инъекции растворов канамицина в физрастворе проводили в нескольких точках листа, тестируя, как правило, по 3—4 листа каждого растения. Контролем служил стерильный физраствор. Все процедуры осуществляли на цветущих растениях табака после определения содержания фотосинтетических пигментов. Дальнейшие исследования на чувствительность к канамицину производили в условиях теплицы, куда растения переносили с вегетплощадки в связи с окончанием сезона.

Количество хлорофиллов и каротиноидов определяли спектрофотометрически [16] в листьях одинакового возраста со среднего яруса растений в момент зацветания центрального цветка. При расчетах содержания хлорофиллов использовали формулу Вернона, содержание каротиноидов вычисляли согласно формуле Веттштейна [16]. Окончательные результаты выражали в миллиграммах пигментов на грамм живой ткани, поскольку нами не было выявлено существенных различий по содержанию сухого вещества в листьях между контролем и выборкой, включающей растения из различных вариантов опыта ($21,57 \pm 1,05$ и $21,91 \pm 0,85$ % для опытов и контроля при $n = 26$ и 19 соответственно). Полученные данные подвергали статистической обработке [17].

Для тестирования растений на наличие вирусной инфекции был использован иммунологический метод [18] и сыворотки против ВТМ и X-, Y-, S-, M- и F-вирусов картофеля, любезно предоставленные Л. Ф. Диденко (Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины). Инфицированные растения исключали из опыта.

Результаты и обсуждение. Устойчивость к канамицину растений, принадлежащих к различным вариантам опыта. Для выявления устойчивых к канамицину растений табака их тестировали вначале раствором, содержащим 100 мг/л канамицина, нанося его капли на листья. Однако через 9 дней после этой процедуры положительная реакция на антибиотик (появление некротических пятен на листьях) была выявлена только у одного опытного растения из 171 (№ 78 из варианта, где на семена воздействовали ДНК *pCAMVNEO*), поэтому мы повторили тестирование. На этот раз растворы канамицина с более высокими концентрациями (200, а затем и 400 мг/л) инъецировали в боковые жилки. Введение растворов, содержащих 400 мг/л антибиотика, осуществляли в те же листья, что и 200 мг/л, через 10 дней. Признаки чувствительности к канамицину появились через месяц после 3-го тестирования у значительной части опытных растений и через 2 недели — у всех контрольных. Часть контрольных растений прореагировала уже на аппликации антибиотика. Окончательные результаты тестирования на чувствительность к канамицину растений T_1 табака сорта Крупнолистный 20 приведены в табл. 1.

Следует отметить, что у чувствительных к канамицину растений первого поколения преобладало побеление, но не отмирание участков листа в местах попадания антибиотика. Появление некротических пятен канамицин вызывал у незначительной части опытных растений T_1 . Для 34,21 % исследованных растений не было выявлено никаких признаков чувствительности к антибиотику. В то же время у 26,97 % опытных растений

Таблица 1

Влияние эДНК и эДНТ различного происхождения на чувствительность к канамицину растений табака сорта Крупнолистный 20 в первом поколении*

Вариант опыта	Количество исследованных растений	Реакция на канамицин, % растений		
		+	—	±
1. Смесь ДНК рСАМVNEO, рTi8628 и паслена черного солеустойчивого	78	33,83	30,77	35,90
2. ДНК рСАМVNEO	8**	62,50	25,00	12,50
3. ДНТ рСАМVNEO	1***	—	—	100,00***
4. ДНК паслена черного солеустойчивого	55	43,64	38,18	18,18
5. ДНК рTi8628	10**	40,00	50,00	10,00
Все варианты опыта	152	38,81	34,21	26,97
Контроль	20	100,00	—	—

*Применен метод тестирования *in vivo* [4]; **использованные в опыте ДНК и ДНТ резко снижали всхожесть семян, поэтому получены небольшие количества растений; ***возшло только одно растение (№ 73)

наблюдался мозаичный тип реакции — наличие чувствительных и нечувствительных листьев на одном и том же растении (табл. 1.) У части опытных растений при пожелтении листьев сохранялись хлорофиллы в местах инъекций канамицина (примерно у 10 растений на выборку).

Тестирование растений T₂, выращенных из семян, полученных вследствие самоопыления растений, резистентных к канамицину в T₁, свидетельствует о потере устойчивости к антибиотику в T₂ (табл. 2). При этом появление некрозов и белых пятен наблюдалось через 2—4 недели после инъекций растворов канамицина (400 мг/л). Для большинства растений T₂ был характерен некротический тип реакции на канамицин, и только для потомства растений № 5 и № 16 более частым было появление белеющих пятен (табл. 2).

Таблица 2

Устойчивость к канамицину растений второго поколения сорта табака Крупнолистный 20 при воздействии на семена различных эДНК и эДНТ

Потомство растений от №	Вариант опыта*	Реакция на канамицин		Количество растений T ₂	Преобладающий тип реакции в T ₂
		T ₁	T ₂		
1	1	+	+	3	Некрозы
5	1	±	+	11	Белые пятна
16	1	—	+	8	То же
35	1	—	+	12	Некрозы
74	2	+	+	2	«
73	3	±	+	5	«
92	4	—	+	14	«
113	4	—	+	4	«
156	5	—	+	2	«
160	5	—	+	5	«

*См. табл. 1.

На чувствительность к канамицину исследовали также проростки, полученные на содержащей канамицин среде Мурасиге—Скуга, из семян тех же растений, которые использовались в тестах (см. табл. 2). Первая пара листьев у таких проростков была, как правило, зеленой, но рост корневой системы ингибировался полностью, вторая пара листьев была значительно бледнее семядольных (почти белой). Эти результаты также подтверждают потерю в T_2 устойчивости к канамицину, проявляющуюся у значительной части растений T_1 .

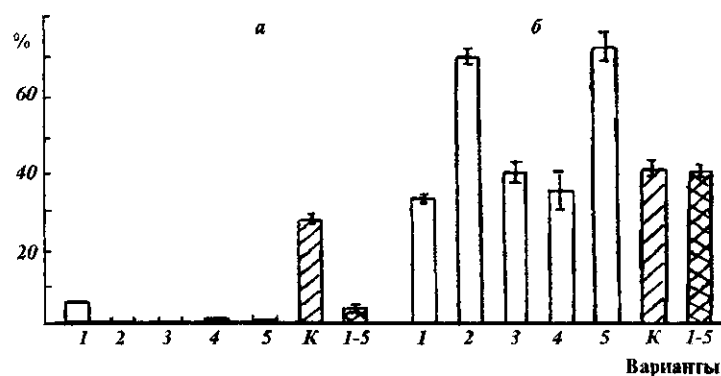


Рис. 1. Влияние ЭДНК и ЭДНТ на устойчивость к спонтанной вирусной инфекции табака сорта Крупнолистный 20. По оси ординат: количество инфицированных растений: а — T_1 при $n = 83$; 8; 1 (см. примечание к табл. 1); 69 и 10; б — T_2 при $n = 72$; 10; 5; 23 и 10 для вариантов опыта 1—5 соответственно. Выборки контроля содержали 17—29 растений. Расшифровку вариантов опыта см. в табл. 1; 1—5 — сумма вариантов опыта, К — контроль. Для T_2 , а также для контроля и суммы опытов в T_1 процент инфекции выражен в $M \pm m$

Резистентные к канамицину растения были выявлены во всех вариантах опыта и даже там, где ДНК *pCAMVNEO* не использовали (см. табл. 1). Заслуживает также внимания тот факт, что среди выборки опытных растений в T_1 наблюдались лишь единичные случаи спонтанной вирусной инфекции в условиях вегетплощадки, а затем теплицы, что было значительно ниже уровня инфекции в контроле (рис. 1, а). При этом чаще инфицировались растения, чувствительные к канамицину и проявляющие смешанный тип реакции. Устойчивость к вирусам в T_1 сохранялась до стадии образования семян. В то же время в T_2 (условия прежние) количество растений, инфицированных ВТМ, а также X-, Y-, M- и S-вирусами картофеля, выявленными в окружающей среде, было на порядок выше, чем в T_1 (рис. 1 б). Такая инфекция проявлялась уже в начале выгона цветonoсной стрелки.

Таким образом, устойчивость к канамицину значительной части опытных растений, возможно, обусловлена явлениями индукции системной приобретенной устойчивости [19, 20] и биосинтезом связанных с патогенезом белков (PR-белков) [19—24], в частности, хитиназ и хитинсвязывающих белков [19, 23]. Биосинтез хитиназ и хитинсвязывающих белков при различных формах стресса показан для ряда пасленовых: табака, картофеля, томатов [19]. Индукция генов, вызывающих патогенез, вероятно также в прорастающих семенах [21, 22], поэтому одной из причин устойчивости значительной части опытных растений к канамицину, в частности, для вариантов, где ДНК *pCAMVNEO* не использовали, может быть наличие в тканях листьев белков, способных связывать и, возможно, деградировать

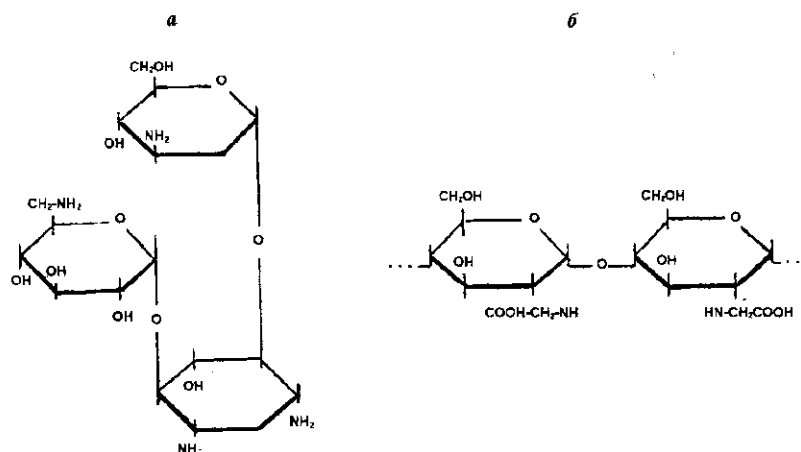


Рис. 2. Структура молекулы канамицина (а) и элементарного звена хитина (б)

канамицин. Исходя из структурного сходства молекул хитина и канамицина (канамицин содержит два остатка аминов дезоксипроизводных α , D-глюкопиранозы, связанных с 2-деокси-D-стрептомином 1→4 и 1→6 связями; хитин является полимером N-ацетил α , D-глюкопиранозы, рис. 2) такими белками могут быть хитинсвязывающие PR-белки.

Можно предположить, что использованные в данных условиях опыта эДНК и эДНТ прямо (воздействуя на ДНК генома табака) или опосредованно (как элитаторы или связанные с их биосинтезом вещества) инициируют экспрессию генов системной приобретенной устойчивости. Последним свойством (см. выше об устойчивости растений T_1 к вирусам) и наличием хитинсвязывающих белков можно было бы объяснить устойчивость к канамицину всего растительного организма, выявленную для ряда растений T_1 (отрицательная реакция на канамицин). Биосинтезом подобных белков в тканях листьев, вероятно, обусловлено также сохранение хлорофиллов при пожелтении листьев в местах инъекции антибиотика: освобождаясь из белковых комплексов в результате процессов протеолиза при старении листа, канамицин может ингибировать биосинтез ферментов, необходимых для деградации хлорофиллов.

В случае воздействия на семена табака препаратами, содержащими ДНК *pSAMVNEO*, очевидно, наблюдается транзистентная экспрессия гена *prt II* [8]. По-видимому, вследствие переноса гена *prt II* только в часть клеток зародышей табака его экспрессия носит мозаичный характер, чем и объясняется наличие чувствительных и нечувствительных листьев на одном и том же растении (промежуточный тип реакции на канамицин).

Скорее всего, устойчивость к канамицину в T_1 для табака сорта Крупнолистный 20 в данных условиях эксперимента определяется одновременно несколькими факторами, не исключаящими друг друга.

Представляет интерес исследование механизмов устойчивости к канамицину растений табака, полученной в данных условиях проведения эксперимента, на молекулярном уровне.

Уровень содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях устойчивых и чувствительных к канамицину растений первого поколения после воздействия эДНК и эДНТ. В целом для выборки опытных растений нами не было выявлено статистически достоверных различий между чувствительными и устойчивыми к канамицину растениями по содержанию хлорофил-

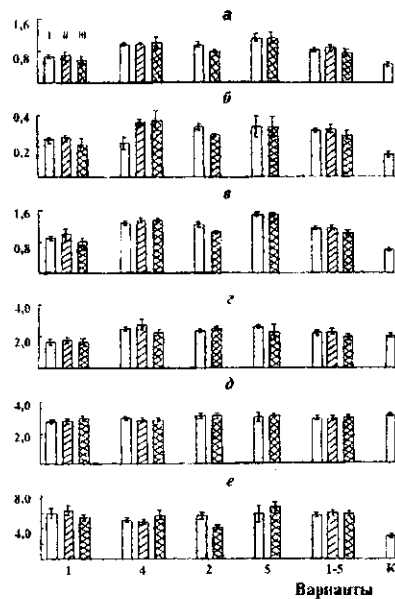


Рис. 3. Содержание хлорофилла *a* (*a*), *b* (*b*), суммы хлорофиллов *a + b* (*в*), суммы содержания каротиноидов (*г*), соотношения содержания хлорофиллов *a* и *b* (*д*), соотношения содержания зеленых и желтых пигментов (*е*) для растений табака, по-разному реагирующих на канамицин: *I* — чувствительных; *II* — проявляющих смешанный тип реакции; *III* — резистентных. Общее количество исследованных растений 76; количество исследованных растений 41; 8; 22 и 5 для вариантов опыта 1; 2; 4 и 5 соответственно

лов *a* и *b*, величине их соотношения, а также соотношения хлорофиллов и каротиноидов (рис. 3, *a—e*). В то же время проявлялась тенденция к снижению содержания каротиноидов в листьях нечувствительных растений по сравнению с чувствительными (рис. 3, *г*; $0,8 < p < 0,9$).

Не было обнаружено статистически достоверных различий по содержанию хлорофиллов, каротиноидов, а также по соотношениям основных групп пигментов для чувствительных и резистентных к канамицину растений в пределах вариантов 1 (смесь ЭДНК) и 5 (ЭДНТ *pTi8628*) (рис. 3, *a—e*). Тенденция к снижению содержания хлорофиллов *a* и *b*, их суммы, а также соотношения зеленых и желтых пигментов наблюдалась для устойчивых к антибиотик у растений варианта 2 (ЭДНК *pCAMVNEO*) (рис. 3, *a—в, e*; $0,8 < p < 0,9$ и $0,9 < p < 0,95$). В то же время для нечувствительных к канамицину растений варианта 4 выявлена тенденция к повышению содержания хлорофилла *b* (рис. 3, *б*; $0,90 < p < 0,95$), а для растений, проявляющих смешанный тип реакции, аналогичным образом увеличивалось содержание каротиноидов (рис. 3, *г*; $0,8 < p < 0,9$).

Следовательно, тенденция к наличию взаимосвязи между статусом устойчивости к канамицину и содержанием основных групп фотосинтетических пигментов наблюдалась только при действии препаратов ЭДНК *pCAMVNEO* и ЭДНТ паслена черного солеустойчивого. При этом следует отметить более низкое содержание хлорофиллов *a* и *b* и соотношение зеленых и желтых пигментов в устойчивых растениях по сравнению с чувствительными для ЭДНК *pCAMVNEO* и более высокое содержание хлорофилла *b* и каротиноидов — для ЭДНТ паслена черного. Подобные изменения, возможно, вызванные в пигментном аппарате табака при индуцировании устойчивости к канамицину двумя вышеназванными препаратами, могут свидетельствовать об изменениях экспрессии разных групп генов, участвующих в регуляции процессов биосинтеза и метаболизма хлорофиллов и каротиноидов.

Появление одиночных темно-зеленых пятен диаметром до 5 мм на листьях резистентных к антибиотик у растений, принадлежащих к вариантам опыта 1, 2 и 4, может быть обусловлено местным действием ЭДНК и ЭДНТ, использованных в опыте, на экспрессию генов, регулирую-

щих биосинтез хлорофиллов.

Выводы. В результате обработки семян табака сорта Крупнолистный 20 препаратами ДНК *pCAMVNEO*, *pTi8628* и паслена черного солеустойчивого наблюдалась устойчивость к канамицину преобладающей части растений T_1 . Все исследованные потомки этих растений оказались чувствительными к антибиотику в T_2 .

Тенденция к существованию различий по содержанию основных групп фотосинтетических пигментов в устойчивых к канамицину растениях по сравнению с чувствительными выявлена только при воздействии препаратов ДНК *pCAMVNEO* и ДНТ паслена черного солеустойчивого. Спектр изменений и их направленность при этом различны.

Авторы благодарны М. К. Зубко (Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев) за помощь в проведении исследований по выявлению устойчивости к канамицину в культуре проростков табака.

В. А. Кацан, А. І. Потопальський, М. Є. Леськів

Стійкість до канамицину рослин тютюну при дії препаратів ДНК на насіння

Резюме

Вивчено вплив екзогенної ДНК (eDNA) плазміди pCAMVNEO, використаної як окремо, так і в суміші з eDNA пасльону чорного (Solanum nigrum) солестійкого та pTi8628, на стійкість до канамицину рослин тютюну сорту Крупнолистний 20 у першому та другому поколіннях (T_1 та T_2) при прямій дії на насіння. Виявлено стійкість до канамицину в переважній більшості рослин T_1 . Резистентні у T_1 рослини стали чутливими до антибіотика в T_2 . Серед більшості варіантів досліду не було знайдено взаємозв'язку між статусом стійкості до канамицину та вмістом основних груп фотосинтетичних пігментів. Дискутуються можливі механізми стійкості тютюну в T_1 до канамицину.

V. A. Katsan, A. I. Potopalsky, M. E. Les'kiv

Kanamycin resistance of tobacco plants influenced by the preparations of DNAs on seeds

Summary

The direct influence of the exogenic pCAMVNEO DNA (eDNA) has been investigated on kanamycin resistance of the tobacco plants cultivar Krupnolistnyy 20 in the first and second generations (T_1 and T_2). The pCAMVNEO DNA had been effected on the seeds in the aqueous solutions being applied separately as well as in a mixture with eDNAs originated from pTi8628 and the salt-tolerant black nighshade (Solanum nigrum). Kanamycin-resistant plants were obtained in considerable amount in all variants of experiment. The progeny of the resistant in T_1 plants proved to be kanamycin-sensitive in T_2 . The correlation between the kanamycin resistance and the content of fundamental photosynthetic pigments was not revealed among the most variants of the experiment. The possible kanamycin resistance mechanisms of tobacco in T_1 are being discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Семенович Н. Д., Сердюченко Е. В., Пожидаева Л. И. О действии канамицина на формирование фотосинтетического аппарата в проростках пшеницы // Физиология растений.—1990.—37, № 2.—С. 220—225.
2. Кесслер Р. М., Колоколова Н. С., Иванова Е. В. и др. Действие эритромицина и пластидной мутации на ультраструктуру пластид, содержание хлорофилла и активность β -глюкозидаз // Там же.—1994.—41, № 3.—С. 399—403.
3. Чесноков Ю. В., Шевкун О. В., Глушакова А. А. Устойчивость к канамицину прорастающей *in vitro* пыльцы томата // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 6.—С. 66—70.
4. Weide R., Korneef M., Zabel P. A. A simple, nondestructive spraing assay for detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants // Theor. and Appl. Genet.—1989.—78.—P. 162—172.
5. Weinreich M. D., Mahnke-Braam L., Resnikoff W. S. A functional analysis of the Tn 5 transposase. Identification of domains required for DNA binding and multimerization // J. Mol.

- Biol.—1993.—241.—P. 166—177.
6. Fromm M. E., Taylor L. P., Walbot V. Stable transformation of maize by electroporation // Nature.—1986.—319.—P. 791—793.
 7. Davey M. R., Rech E.L., Mulligan B. J. Direct DNA transfer to plant cells // Plant Mol. Biol.—1989.—13.—P. 273—285.
 8. Topfer R., Gronenborn B., Schell J., Steinbiss H. H. Uptake and transient expression of chimaeric genes in seed-derived embryos // Plant Cell.—1989.—1.—P. 133—139.
 9. Еланская Н. В., Аллахвердиев С. И., Бойченко В. А. и др. Фотохимическая характеристика мутантов цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803 с нарушениями белков фотосистемы II // Биохимия.—1994.—59, № 8.—С. 1244—1253.
 10. Потопальский А. И., Кацан В. А., Леськив М. Е. Влияние экзогенных нативных и модифицированных нуклеиновых кислот на биосинтез фотосинтетических пигментов у *Nicotiana tabacum* L. I. Содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений первого поколения // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 2.—С. 88—99.
 11. Потопальский А. И., Ткачук З. Ю. Пухлини і нарости у рослин.—К.: Вища шк., 1985.—184 с.
 12. Hosters M. The interaction of agrobacterium *Ti*-plasmid DNA and plant cells // Biol. Cell.—1982.—43, N 1—2.—P. 6.
 13. Пацковский Ю. В., Гайдук В. В., Веселовский О. В. и др. Обнаружение *pU* 19-гомологичных повторяющихся последовательностей в геноме некоторых видов высших растений // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.—С. 23—28.
 14. Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленмина // Биоорг. химия.—1990.—16, № 7.—С. 981—990; 1993.—19, № 4.—С. 484—494; 19, № 5.—С. 562—569.
 15. Murashige T., Skoog F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.—1962.—15, N 3.—P. 473—497.
 16. Шлык А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* // Биохимия.—1968.—33, № 2.—С. 275—285.
 17. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.—Минск: Высшая шк., 1967.—328 с.
 18. Дунин М. С., Попова Н. Н. Капельный метод диагностики вирусов в растениеводстве.—М.: Сельхозгиз, 1937.—47 с.
 19. Ponstein A. S., Bres-Vloemans S. A., Sela-Buurgale M. B. et al. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity // Plant Physiol.—1994.—104.—P. 109—118.
 20. Vernooij B., Friedrich L., Morse A. et al. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal translocation // Plant Cell.—1994.—6, N 7.—P. 959—965.
 21. Xu Y., Fang P., Chang L. et al. Plant defence genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate // Ibid.—N 8.—P. 1077—1085.
 22. Cordero M. J., Raventos D., Segunto B. S. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound response of a monocot gene // Plant J.—1994.—6, N 2.—P. 141—150.
 23. Legrand M., Kauffmann S., Geofboy P., Fritig B. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 19.—P. 6750—6754.
 24. Alechander D., Goodman R. M., Gut-Reilla M. et al. Increase tolerance to two oomycete pathogen in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a // Ibid.—1993.—90, N 15.—P. 7327—7331.