

УДК 581.1

УСТОЙЧИВОСТЬ К АЛЬТЕРНАРИОЗУ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ *ProSmAMP1* ПОД КОНТРОЛЕМ СВЕТОИНДУЦИБЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА *Cab*

© 2023 г. Д. В. Беляев^{a,*}, Н. О. Юрьева^a, Д. В. Терешонок^a, М. К. Деревягина^b, А. А. Мелешин^b

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха, Красково, Россия

*e-mail: bdv@ippras.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

Геном растения звездчатка *Stellaria media* содержит семейство генов гевеин-подобных антимикробных пептидов, про некоторые из которых известно, что они кодируют два пептида, высвобождающиеся из продукта трансляции в результате пост-трансляционного протеолиза. Ранее было показано, что данные пептиды подавляют рост бактерий и грибов, в том числе, патогенов картофеля *Alternaria solani* и *Alternaria alternata*. В данной работе один из таких генов, *ProSmAMP1*, был введен в геном картофеля под контролем светоиндуцибельного промотора гена *Cab* мягкой пшеницы. Полученные трансгенные линии экспрессировали мРНК *ProSmAMP1* в течение нескольких вегетативных пассажей и их устойчивость к альтернариозу была оценена по нескольким показателям заражения отделенных листьев, причем растения с наибольшей экспрессией трансгена продемонстрировали также наибольшую устойчивость.

DOI: 10.31857/S0015330322600693, EDN: IBVUOH

ВВЕДЕНИЕ

Картофель является одной из важнейших продовольственных культур. Величина и качество урожая клубней картофеля сильно зависят как от погодных условий конкретного вегетационного периода, так и от поражения посадок фитопатогенами. Второй, по степени вредоносности, урон урожаю клубней картофеля наносит поражение посадок возбудителями альтернариоза грибами рода *Alternaria*. Поражение листьев растений приводит к снижению фотосинтезирующей поверхности и как результат к потерям урожая клубней. В 2018 г. потери урожая клубней картофеля в Швеции, Дании, Германии, Сербии и России превысили 50% [1]. Кроме того, было показано, что большинство видов альтернарии вызывают сильные аллергические реакции у людей, в частности, споры многих видов альтернарии относят к аэроаллергенам, и средняя концентрация 100 спор/м³ уже представляет риск возникновения респираторных аллергических заболеваний, а наличие мицелия альтернарии как на листьях, так и на пораженных клубнях может нанести значительный вред здоровью человека [2].

Заражение альтернариозом в Европе чаще всего начинается в середине июля, особенно когда погода сухая и жаркая. Наиболее сильно поражаются нижние ярусы более старых растений. На листе появляется некроз, окруженный хлоротичными тканями, с нижних листьев поражение распространяется на верхние ярусы. Зараженные растения формируют мелкие клубни с пониженным содержанием сухого вещества [3]. Во время дождей конидии смываются с листьев, попадают на почву и заражают клубни. На клубнях появляются темные вдавленные некрозы и сухая твердая гниль. Это вызывает потери при хранении клубней и снижение их пищевых качеств, а также ухудшает их семенные качества, снижая способность прорастания [4]. Возбудители альтернариоза *Alternaria solani* и *Alternaria alternata* относятся к надцарству (домени) Eukaryota, царству Fungi, отделу Deuteromycota, классу Nyphomycetes, порядку Nyphales и семейству Porosporae [5]. Грибы рода *Alternaria* являются полициклическими патогенами, способными реализовать несколько циклов инфицирования растений в течение вегетационного периода. Перезимовавший в виде мицелия или конидий в почве с

растительными остатками патоген формирует споры, которые могут проникать в ткани непосредственно через эпидермис, через устьица или поранения, вызванные механическим путем или вредителями, а также через увеличенные чечевички клубней чаще всего в период хранения и посадки [6]. К наиболее распространенным механизмам устойчивости к фитопатогенам, в том числе, возбудителю альтернариоза относится синтез в тканях растения алкалоидов и стероидных соединений [7]. В лабораторных исследованиях было выявлено высокое содержание фенолов в листьях растений, устойчивых к альтернариозу [8]. Кроме того, было показано, что проникновение этого патогена в клетку ингибируется рядом ферментов клеточной стенки: фенилаланин аммоний лиазой, пероксидазой, хитиназой и полифенол оксидазой [9]. Инфицирование как листьев, так и клубней растения картофеля происходит на свету. Поэтому механизмы защиты растения от проникновения патогена в условиях освещенности (в дневных условиях, на свету) играют большую роль в устойчивости растения. Для ускорения прорастания семенных клубней, улучшения дальнейшего роста растений картофеля в производстве применяется технология предпосадочного озеленения клубней [10]. С коммерческой точки зрения наибольший экономический эффект приносит выращивание сортов картофеля, устойчивых к альтернариозу. Но таких сортов очень немного и они обычно имеют поздние сроки созревания [11]. Создание устойчивых к патогену сортов картофеля традиционным способом половой гибридизации часто затруднено, так как во многих случаях высокая устойчивость к альтернариозу сопровождается низкой клубневой продуктивностью [12]. В случае использования межвидовых скрещиваний с дикими видами во многих случаях устойчивость к патогену определяется повышенным биосинтезом гликоалкалоидов, флавоноидов и лигнина, что ухудшает качество клубней и может сделать их опасными для здоровья человека [13]. Альтернативным методом создания сортов картофеля, устойчивых к фитопатогенам, является введение в геном ценных генов с использованием генетических конструкций. В настоящее время большой интерес представляют гены, кодирующие антимикробные пептиды из съедобных для человека растений: пшеницы, ячменя, огурца, люцерны [14–17], а также из лекарственных растений, например, гинкго билоба [18] и черного тмина *Nigella sativa* [19].

Ген ProSmAMP1 был выделен из употребляемого в пищу в Ирландии, Великобритании и других странах растения звездчатка (*Stellaria media*) [20], также используемого и в качестве корма для промысловых рыб [21]. Кроме того, экстракты из разных органов этого растения используются в медицинских целях [22]. Антимикробная активность AMP из семян растения звездчатки (*Stellar-*

ia media) была продемонстрирована как *in vitro*, так и в трансгенных растениях картофеля и табака [23–25]. Было показано многими исследователями, что наиболее часто от заражения вирусами, фитопатогенными грибами и бактериями страдают надземные органы растений, которые находятся под воздействием естественного освещения [26]. С точки зрения биобезопасности, важно отсутствие в органах сельскохозяйственных культур, у которых в потребительских целях используют подземную часть, например, в корнеплодах свеклы или моркови, или в клубнях картофеля, синтеза любых посторонних соединений, связанных с устойчивостью к патогенам. Поэтому специфичная экспрессия генов AMP, например, только на свету, представляет особый интерес.

Целевой экспрессии генов АМП на свету можно достигнуть использованием в генетических конструкциях светоиндуцибельных промоторов. Свет регулирует множество процессов в растении, в том числе, путем светоиндуцибельной экспрессии регуляторных белков. Сильные светоиндуцибельные промоторы также регулируют экспрессию эффекторных белков, представленных в клетке в значительно больших количествах, и к поиску таких промоторов сохраняется интерес [27]. Нами выбран для данной работы промотор Cab, контролирующей экспрессию хлорофилл-связывающего белка, участвующего в биосинтезе хлорофиллов *a* и *b* [28]. Результаты эксперимента с трансгенными растениями табака показали, что на свету активность промоторов семейства Cab повышалась, по сравнению с темнотой, в 1.5–60 раз, причем высокий уровень экспрессии наблюдался во всех фотосинтезирующих органах [29].

Целью нашего эксперимента было создание устойчивых к возбудителю альтернариоза растений картофеля с повышенной безопасностью путем использования гена из съедобного растения звездчатки (*Stellaria media*) и его экспрессии только на свету, но не в клубнях, которые формируются и хранятся в темноте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фрагмент, содержащий кДНК гена *proSmAMP1* вместе с терминатором транскрипции гена нопалинсинтазы [30] был субклонирован из рВ1-*proSmAMP1* [23] по сайтам XbaI и EcoRI в соответствующие сайты полилинкера агробактериального вектора рCambia2300. Промотор гена белка, связывающего хлорофиллы *a/b* (Cab) [28] был амплифицирован из ДНК мягкой пшеницы *T. aestivum* с помощью праймеров WC412F и WC898R (табл. 1), обработан рестриктазами HindIII и XbaI и клонирован в соответствующие сайты вектора рCambia2300 с геном *proSmAMP1*, полученного как описано выше. На рис. 1 представлена карта Т-ДНК полученной конструкции для агробак-

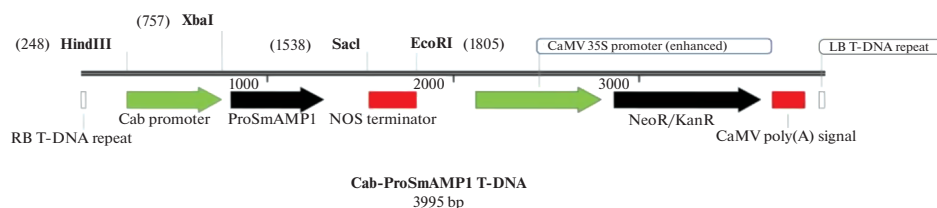


Рис. 1. Т-ДНК генетической конструкции Cab-ProSmAMP1.

териальной трансформации картофеля, названной Cab-ProSmAMP1.

Для агробактериальной трансформации использовали листовые и стеблевые экспланты четырехнедельных асептических растений восприимчивого к альтернариозу [25] сорта Удача, предоставленных коллекцией оздоровленных растений картофеля ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха. Исходные растения выращивали на безгормональной агаризованной среде MS, содержащей тиамин 1 мг/л, пиридоксин 1 мг/л, сахарозу 2%, pH 5.8 в климатической камере ИФР РАН при температуре +22°C, 16-часовом фотопериоде и влажности 75%. Трансформация была проведена в соответствии с методикой [31] с использованием штамма агробактерии AGL0 [32]. Регенеранты, сформировавшие хорошо развитый зеленый побег и корни на твердой среде MS с добавлением в качестве селективного фактора 50 мг/л канамицина и 300 мг/л цефотаксима для ингибирования роста агробактерии, были тестированы на наличие целевого гена (праймеры AMPSmF/R) и отсутствие латентной формы бактерии (праймеры *virE2*) с использованием метода ПЦР-анализа [25].

Для определения уровня экспрессии гена *SmAMP* под светочувствительным промотором *Cab* на

свету, линии с подтвержденной вставкой целевого гена выращивали на агаризованной безгормональной среде MS в пробирках в течение 4 недель. Анализ проводили в трехкратной повторности. Для получения микроклубней стеблевые экспланты, имеющие одну пазушную почку, помещали в 250 мл колбы с жидкой безгормональной MS средой, содержащей 2% сахарозы, в условиях темноты для формирования столонов и затем среду заменяли на аналогичную с содержанием 8% сахарозы для индукции клубнеобразования и роста микроклубней в соответствии с разработанной ранее методикой [33]. Часть полученных микроклубней оставляли в условиях темноты, а часть – переносили на свет.

Для измерения экспрессии целевого гена выделяли РНК из образцов листьев и клубней трансгенных и контрольных растений по методике, описанной в [34]. Количество РНК гена *proSmAMP1* определяли путем количественной ОТ-ПЦР (кОТ-ПЦР). Обратную транскрипцию проводили со случайным праймером (N10) при температурах от 37 до 45°C, затем продукты реакции амплифицировали с праймерами и зондами TaqMan для целевого гена *proSmAMP1*, а также для гена *Cyp1*, выбранного нами для нормировки [35].

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР и кОТ-ПЦР

Применение	Название	Последовательность	Источник
ПЦР промотора <i>Cab</i>	WC412F	AAAAAGCTTACGATCACTCCGACAATCA	
ПЦР промотора <i>Cab</i>	WC898R	AATCTAGATGCGCTGCACTTATGGT	
Проверка трансгенных растений на заражение агробактерией	<i>virE2 agl+</i>	CGAATACATTCTCGTGCGTCAAAC	
Проверка трансгенных растений на заражение агробактерией	<i>virE2agl-</i>	TTTCGAGTCATGCATAATGCCTGAC	
кОТ-ПЦР	N10	NNNNNNNNNN	
кОТ-ПЦР	AMPSmF	TGTGGTTCAGGCCCTAAGTA	[23]
кОТ-ПЦР	AMPSmR	AGCGTCAGTAGGCTCAATCT	[23]
кОТ-ПЦР	ProbeAMPS	FAM-TGCGCCCACAACACTCCTCTTTCTG-BHQ1	[23]
кОТ-ПЦР	CyP-F	AGGTGTTGGAAAGATGGGTA	[35]
кОТ-ПЦР	CyP-R	TCACCTCCTTGACACATGAAC	[35]
кОТ-ПЦР	TqmCyP	ROX-TACAAGGGCTCAACCTTCCACCGT-BHQ2	[35]

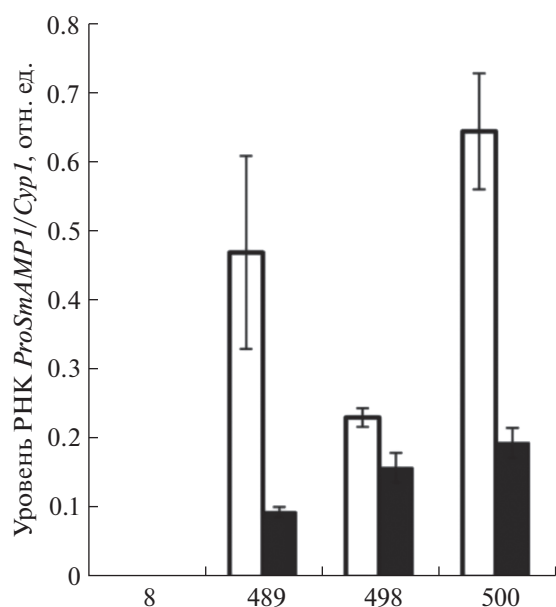


Рис. 2. Уровень РНК *ProSmAMP1* в клубнях, выращенных на свету (□) или в темноте (■). Уровень транскриптов *ProSmAMP1* выражали как отношение количества транскриптов *ProSmAMP1* к количеству транскриптов *Cyp1* в образце РНК, измеренное с помощью кОТ-ПЦР. 8 – исходный сорт Удача, трехзначные числа – трансгенные линии.

Последовательности праймеров для кОТ-ПЦР приведены в таблице 1.

Оценка устойчивости к возбудителю альтернариоза. Пробирочные растения трансгенных линий были размножены в культуре *in vitro* и высажены в теплице в 1 л горшки с торфяным грунтом “Воздушный” (www.biud.ru) по 5 растений на генотип. В теплице были естественное освещение и терморегуляция, полив осуществлялся в соответствии с необходимостью. В фазе бутонизации (45–50 сут. с момента высадки в грунт), с трех хорошо развитых растений из средней части было взято по одному сложному листу. В лабораторных условиях были отделены по 3 терминальные доли каждого из трех листьев (всего 9 долей) и помещены в подносы на влажную фильтровальную бумагу нижней стороной вверх. Показатели устойчивости растений к альтернариозу оценивали, как описано нами ранее [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для создания генетической конструкции для трансформации картофеля геном *ProSmAMP1* был использован вектор pCambia2300 (<https://cambia.org/welcome-to-cambialabs/cambialabs-projects/cambialabs-projects-legacy-pcambia-vectors-pcambia-legacy-vectors-1/>). В отличие от более ранних векторов семейства pVI [30], структура его Т-ДНК позволяет удобно клонировать целевые гены бли-

же к правой границе Т-ДНК по сравнению с селективным геном, что является преимуществом. Проникновение Т-ДНК в ядро растительной клетки обычно начинается с правой границы Т-ДНК [36]. В некоторых случаях, однако, лишь часть Т-ДНК попадает в ядро и затем встраивается в хромосому [37], и присутствие селективного гена рядом с правой границей может привести к получению растений, у которых в результате такого события присутствует селективный ген устойчивости к антибиотику, с помощью которого были отобраны трансформанты, а более далекий от правой границы целевой ген отсутствует или поврежден.

Для проведения эксперимента был выбран раннеспелый сорт картофеля Удача. По результатам наших предыдущих исследований [25], во время оценки устойчивости к альтернариозу нескольких сортов картофеля, раннеспелый сорт Удача продемонстрировал высокую восприимчивость к возбудителю альтернариоза *Alternaria solani*. В результате агробактериальной трансформации листовых эксплантов сорта Удача было получено 12 регенерантов, в 9 из которых была обнаружена вставка целевого гена. Эффективность трансформации (на 1 исходный эксплант) составила 8.2%, а на 1 полученный регенерант – 75.0%. С использованием пары праймеров *virE2* (табл. 1) подтвердили отсутствие латентной формы агробактерии у трансгенных линий.

Чтобы выявить активность светоиндуцибельного промотора *Sab* в клубнях, были получены микроклубни для трансгенных линий и исходного сорта картофеля. Анализ экспрессии гена *SmAMP* под промотором *Sab* в микроклубнях трансгенных линий картофеля на свету или в темноте подтвердил литературные данные об активации промотора *Sab* светом [28], хотя разница в накоплении мРНК трансгена на свету и в темноте варьировала у разных трансгенных линий (рис. 2).

На рис. 3 в виде двумерной диаграммы даны, по оси абсцисс, экспрессия трансгена, и по оси ординат, показатели восприимчивости к альтернариозу контрольных (8) и трансгенных линий: диаметр поражения, интенсивность спороношения и комплексный параметр индекс поражения, полученный, в частности, с использованием первых двух показателей. Во всех трансформированных линиях присутствует экспрессия трансгена, которая относительно однородна от линии к линии: наименьшее значение (линия 493) составляет 43% от наиболее сильной экспрессии (линия 499). Трансформированные линии отличаются также по устойчивости к альтернариозу. С точки зрения селекций, наиболее интересна линия 499, у которой наибольшая экспрессия *ProSmAMP1* сочетается с наибольшей устойчивостью к заражению альтернарией. У остальных линий устойчивость ва-

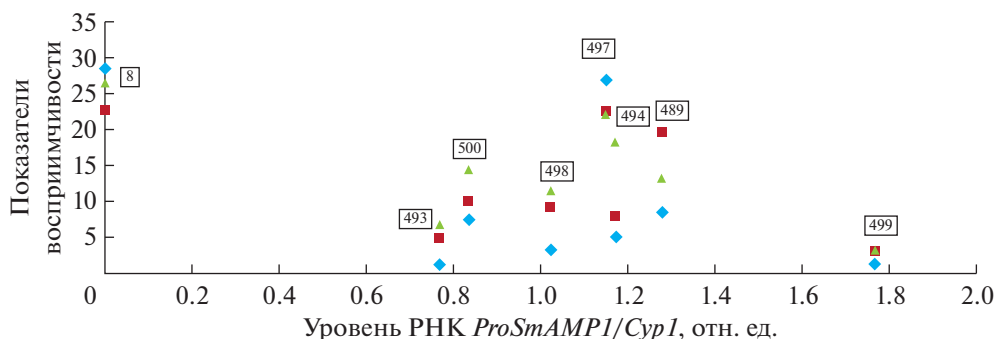


Рис. 3. Двумерная диаграмма взаимосвязи экспрессии трансгена *proSmAMP1* (уровней РНК) в листьях, выращенных на свету, и показателей восприимчивости трансгенных линий (трехзначные числа) и контрольных растений (отмечены 8). Уровень транскриптов *ProSmAMP1* выражали как отношение количества транскриптов *ProSmAMP1* к количеству транскриптов *Cyp1* в образце РНК, измеренное с помощью кОТ-ПЦР. Ординаты точек равны: ◇ – индексу поражения; □ – диаметру поражения; △ – 10X (интенсивность спороношения).

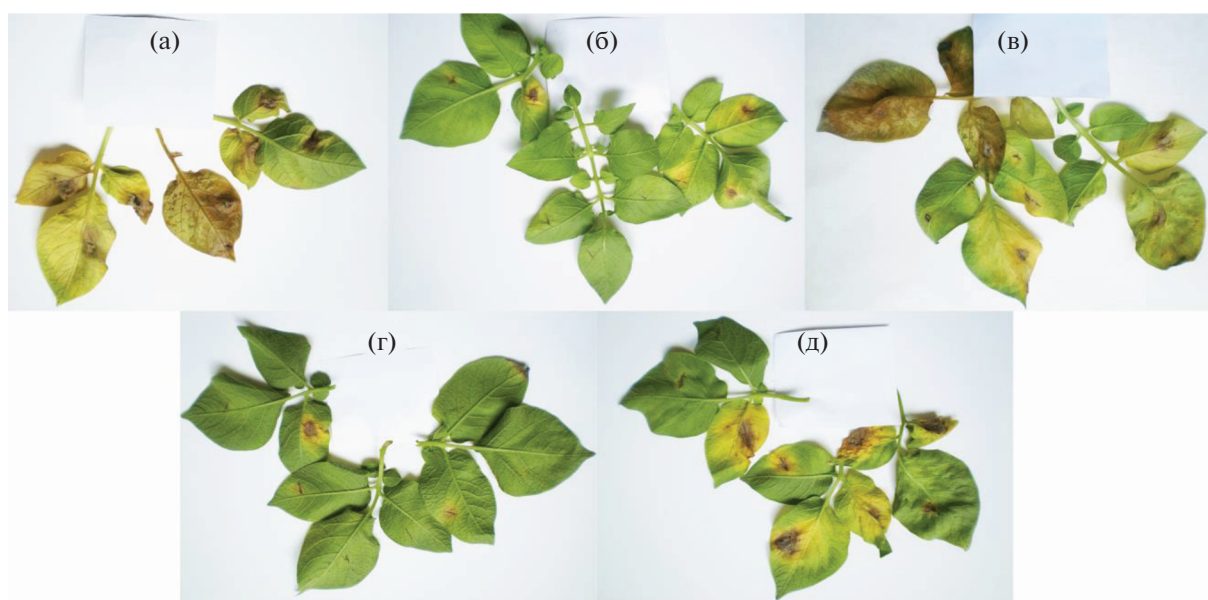


Рис. 4. Фотографии зараженных листьев. (а) – исходный сорт Удача; (б) – линия 493; (в) – линия 498; (г) – линия 499; (д) – линия 500.

рирует от величины устойчивости исходного сорта (8) до абсолютной устойчивости в смысле, количественно определенном использованными нами методами. Помимо наличия антимикробных пептидов, устойчивость растений к патогенам определяется многими другими факторами: механическими барьерами, тургором, рецепцией, фитоалексинами, что может быть объяснением различий в устойчивости трансгенных линий с близкими значениями экспрессии трансгена на рис. 2.

На рис. 4 показаны типичные симптомы заражения листьев грибами *Alternaria*, использованные для определения показателей восприимчивости исходной и трансгенных линий. Видно, что

листья исходного сорта и линий с умеренной устойчивостью желтеют и увядают даже там, где рост гриба не виден, в то время как у линий с высокой устойчивостью поражение остается локализованным вокруг места укола суспензией грибов (линия 499).

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе продемонстрирована повышенная устойчивость к альтернариозу растений картофеля, трансформированных геном антимикробных пептидов *ProSmAMP1* под контролем светоиндуцибельного промотора гена *Cab* из мягкой пшеницы. Устойчивость растений была сравнима с

таковой у растений, трансформированных этим же геном под контролем неспецифического промотора 35S [25]. В целом, наши результаты подтверждают литературные данные об активации экспрессии *cab* светом [28], хотя некоторое количество транскриптов присутствует и в выращенных в темноте клубнях. Однако по литературным данным для других видов растений, экспрессия гена *cab D. tertiolecta*, например, повышалась при уменьшении уровня освещенности, что было показано путем измерения уровня транскрипции данного гена, накопления его мРНК и белка [38]. По-видимому, данная водоросль компенсирует уменьшение освещенности увеличением содержания хлорофилла и светособирающих комплексов, и этот эффект длится несколько часов, после чего экспрессия *cab* опять падает.

В современной литературе [39] различия в экспрессии гена считаются существенными, если уровни накопления его транскрипта отличаются более чем в два раза. Наши данные показывают, однако, весьма небольшие различия в уровне содержания транскрипта трансгена: наименьшая экспрессия (у линии 493) составила 43% от уровня экспрессии трансгена в линии 499 с максимальной экспрессией. Такие небольшие колебания уровня генной экспрессии между линиями, возможно, являются следствием процедуры трансформации, во время которой происходил отбор трансформированных клеток на среде с канамицином. Для регенерации был необходим высокий уровень экспрессии гена *NPTII*, когда Т-ДНК, в которой содержался и целевой ген, была интегрирована в транскрипционно активную область хромосомы картофеля. Таким образом, селекция на канамицине также отбирает для дальнейшей регенерации трансформированные клетки с сильной экспрессией целевого гена. В ряде работ, однако, трансформация растений проводилась двумя Т-ДНК на одной или различных плаزمидных агробактерий, причем одна Т-ДНК несла селективный ген, а другая — целевой ген, и большинство полученных трансгенных линий содержали, помимо селективного, также и целевой ген, интегрированный в удаленный от места интеграции целевого гена locus. В таких трансгенных растениях экспрессия целевого гена больше не находится под давлением отбора и может варьировать в более широких пределах, чем когда и селективный, и целевой ген присутствуют на одной Т-ДНК [40]. Помимо растений с сильной экспрессией целевого гена, в этом случае можно получить линии со слабой экспрессией, что может быть преимуществом, если продукт гена, антимикробный пептид, в высокой концентрации образует неактивные олигомеры. В случае пептидов семейства SmAMP1.x, однако, это представляется маловероятным, так как они имеют лидерный пептид и, по-видимому, экскретируются в апопласт [23].

Достоинством методики трансформации растений с помощью отдельных Т-ДНК для целевого и селективного генов является возможность получить безмаркерное потомство в последующих семенных поколениях [40].

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042600086-7).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schepers H., Hausladen H., Hansen J.G.* Epidemics and control of early & late blight, 2017 & 2018 in Europe // Proceedings of the seventeenth EuroBlight Workshop. 2019. V. 19. P. 11. https://doi.org/https://agro.au.dk/file-admin/euroblight/Workshops/Proceedings/Special_Report_19_Totaal_LR.pdf
2. *Gravesen S.* Fungi as a cause of allergic disease // *Allergy*. 1979. V. 34. P. 135. <https://doi.org/10.1111/J.1398-9995.1979.TB01562.X>
3. *Tsedaley B.* Review on early blight (*Alternaria* spp.) of potato disease and its management options // *J. Biol. Agricul. Healthcare*. 2014. V. 4 P. 191. <https://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/18650>
4. *Adolf B., Andrade-Piedra J., Bittara Molina F., Przetakiewicz J., Hausladen H., Kromann P., Lees A., Lindqvist-Kreuzer H., Perez W., Secor G.A.* Fungal, oomycete, and plasmodiophorid diseases of potato // *The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind*. 2019. V. 9. P. 307. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_9
5. *Van Der Waals J.E., Korsten L., Aveling T.A.S.* A review of early blight of potato // *African Plant Protection*. 2001. V. 7. P. 1
6. *Kumar Chaudhary A., Yadav J., Kumar Gupta A., Gupta K.* Integrated disease management of early blight (*Alternaria Solani*) of potato // *Tropical Agrobiodiversity*. 2021. V. 2. P. 77. <https://doi.org/10.26480/trab.02.2021.77.81>
7. *Shinde B.A., Dholakia B.B., Hussain K., Panda S., Meir S., Rogachev I., Aharoni A., Giri A.P., Kamble A.C.* Dynamic metabolic reprogramming of steroidal glycol-alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis may impart early blight resistance in wild tomato (*Solanum arcanum Peralta*) // *Plant Mol. Biol.* 2017. V. 95. P. 411. <https://doi.org/10.1007/S11103-017-0660-2/FIGURES/7>
8. *Roddick J.G., Rijnenberg A.L.* Effect of steroidal glycoalkaloids of the potato on the permeability of liposome membranes // *Physiol. Plant*. 1986. V. 68. P. 436. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb03378.x>
9. *Yamunarani K., Jaganathan R., Bhaskaran R., Govindaraju P., Velazhahan R.* Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes // *Acta Physiol. Plant*. 2004. V. 26. P. 281. <https://doi.org/10.1007/S11738-004-0018-7>

10. Johansen T.J., Mølmann J.A.B. Seed potato performance after storage in light at elevated temperatures // Potato Research. 2018. V. 61. P. 133. <https://doi.org/10.1007/S11540-018-9363-6/FIGURES/3>
11. Henrique S.S.D., Zambolim L., Rodrigues F.A., Paul P.A., Pádua J.G., Ribeiro J.I. Field resistance of potato cultivars to foliar early blight and its relationship with foliage maturity and tuber skin types // Tropical Plant Pathology. 2014. V. 39. P. 294
12. Busnello F.J., Boff M.I.C., Agostinetto L., Souza Z. da S., Boff P. Potato genotypes reaction to early blight and late blight in organic cultivation // Ciência Rural. 2019. V. 49. <https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20180469>
13. Weber B.N., Jansky S.H. Resistance to *Alternaria solani* in Hybrids Between a *Solanum tuberosum* Haploid and *S. raphanifolium* // Phytopathology. 2012. V. 102. P. 214. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0146>
14. Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A., Korostyleva T.V., Kasianov A.S., Kovtun A.S., Makeev V.J., Shcherbakova L.A., Kudryavtsev A.M. Defensin-like peptides in wheat analyzed by whole-transcriptome sequencing: A focus on structural diversity and role in induced resistance // Peer J. 2019. V. 2019. P. e6125. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.6125/SUPP-16>
15. Toufiq N., Tabassum B., Bhatti M.U., Khan A., Tariq M., Shahid N., Nasir I.A., Husnain T. Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host // Braz. J. Microbiol. 2018. V. 49. P. 414. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.05.007>
16. Moravčíková J., Matušíková I., Libantová J., Bauer M., Mlynárová L. Expression of a cucumber class III chitinase and Nicotiana plumbaginifolia class I glucanase genes in transgenic potato plants // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2004. V. 79. P. 161. <https://doi.org/10.1007/S11240-004-0656-X>
17. Islam K.T., Velivelli S.L.S., Berg R.H., Oakley B., Shah D.M. A novel bi-domain plant defensin MtDef5 with potent broad-spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers // Sci. Rep. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16508-w>
18. Huang X., Xie W.J., Gong Z.Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from Ginkgo biloba // FEBS Letters. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01834-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01834-2)
19. Vasilchenko A.S., Smirnov A.N., Zavriev S.K., Grishin E.V., Vasilchenko A.V., Rogozhin E.A. Novel thionins from black seed (*Nigella sativa* L.) demonstrate antimicrobial activity // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2017. V. 23. P. 171. <https://doi.org/10.1007/S10989-016-9549-1/FIGURES/5>
20. Mithril C., Dragsted L.O. Safety evaluation of some wild plants in the New Nordic Diet // Food Chem. Toxicol. 2012. V. 50. P. 4461. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2012.09.016>
21. Yilmaz S., Ergün S. Chickweed (*Stellaria media*) leaf meal as a feed ingredient for tilapia (*Oreochromis mossambicus*) // J. Appl. Aquac. 2013. V. 25. P. 329. <https://doi.org/10.1080/10454438.2013.851531>
22. Rogowska M., Lenart M., Srećec S., Ziája M., Parzonko A., Bazylko A. Chemical composition, antioxidative and enzyme inhibition activities of chickweed herb (*Stellaria media* L., Vill.) ethanolic and aqueous extracts // Industrial Crops and Products. 2017. V. 97. P. 448. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.12.058>
23. Shukurov R.R., Voblikova V.D., Nikonorova A.K., Komakhin R.A., Komakhina V.V., Egorov T.A., Grishin E.V., Babakov A.V. Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens // Transgenic Res. 2012. V. 21. P. 313. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9534-6>
24. Vetchinkina E.M., Komakhina V.V., Vysotskii D.A., Zaitsev D.V., Smirnov A.N., Babakov A.V., Komakhin R.A. Expression of plant antimicrobial peptide pro-SmAMP2 gene increases resistance of transgenic potato plants to *Alternaria* and *Fusarium* pathogens // Russ. J. Genet. 2016. V. 52. P. 939. <https://doi.org/10.1134/s1022795416080147>
25. Beliaev D.V., Yuorieva N.O., Tereshonok D.V., Tashlieva I.I., Derevyagina M.K., Meleshin A.A., Rogozhin E.A., Kozlov S.A. High resistance of potato to early blight is achieved by expression of the *Pro-SmAMP1* gene for hevein-like antimicrobial peptides from common chickweed (*Stellaria media*) // Plants. 2021. V. 10. P. 1395. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10071395>
26. Muhammad A.F., Naz F., Irshad G. Important fungal diseases of potato and their management—a brief review // Mycopath. 2013. V. 11. P. 45.
27. Timerbaev V., Dolgov S. Functional characterization of a strong promoter of the early light-inducible protein gene from tomato // Planta. 2019. V. 250. P. 1307. <https://doi.org/10.1007/S00425-019-03227-X>
28. Nagy F., Boutry M., Hsu M.Y., Wong M., Chua N.H. The 5'-proximal region of the wheat Cab-1 gene contains a 268-bp enhancer-like sequence for phytochrome response. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 2537. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1987.TB02541.X>
29. An G. Integrated regulation of the photosynthetic gene family from *Arabidopsis thaliana* in transformed tobacco cells // Mol. General Genet. 1987. V. 207. P. 210. <https://doi.org/10.1007/BF00331580>
30. Bevan M. Binary agrobacterium vectors for plant transformation // Nucleic acids research. 1984. V. 12. P. 8711. <https://doi.org/10.1093/NAR/12.22.8711>
31. Banerjee A.K., Prat S., Hannapel D.J. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. andigena) plants via *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation // Plant Sci. 2006. V. 170. P. 732. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.11.007>
32. Lazo G.R., Stein P.A., Ludwig R.A. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium* // BioTechnol. 1991. V. 9. P. 963. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
33. Дерябин А.Н., Юрьева Н.О. Образование и морфометрические показатели микроклубней картофеля *in vitro* при разном составе сахаров в среде // Сельскохозяйственная биология. 2011. Т. 1. С. 54. <http://www.agrobiology.ru/1-2011deryabin-eng.html>

34. Yuorieva N.O., Voronkov A.S., Tereshonok D.V., Osipova E.S., Platonova E.V., Belyaev D.V. An assay for express screening of potato transformants by GFP fluorescence // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. V. 73. P. 69. <https://doi.org/10.3103/s0096392518020086>
35. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERI285>
36. Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models // Trends Genet. 2004. V. 20. P. 375. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2004.06.004>
37. Cluster P.D., O'Dell M., Metzloff M., Flavell R.B. Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression // Plant Mol. Biol. 1996. V. 32. P. 1197. <https://doi.org/10.1007/BF00041406>
38. Escoubas J.M., Lomas M., LaRoche J., Falkowski P.G. Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1995. V. 92. P. 10237. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.22.10237>
39. Czajka K.M., Nkongolo K. Transcriptome analysis of trembling aspen (*Populus tremuloides*) under nickel stress // PLOS ONE. 2022. V. 17. P. e0274740. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0274740>
40. Daley M., Knauf V.C., Summerfelt K.R., Turner J.C. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants // Plant Cell Rep. 1998. V. 17. P. 489. <https://doi.org/10.1007/S002990050430>