

В.В. РАДЧУК^{1,2}, Я.Б. БЛЮМ¹¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины,

ул. акад. Заболотного, 148, Киев-143,

² Институт генетики растений и исследований культурных растений,
Корренсштрассе 3, 06466 Гатерслебен, Германия

УСПЕХИ И ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА КРЕСТОЦВЕТНЫХ



Обобщены последние достижения генетической инженерии видов растений, принадлежащих к семейству крестоцветных, многие из которых являются важными масличными, овощными и кормовыми культурами. Подробно рассмотрены результаты по развитию эффективных методов трансформации крестоцветных как с помощью *Agrobacterium*, так и прямого переноса генов. Основной упор был сделан на возможностях генетического изменения растений с целью улучшения их хозяйственно полезных признаков. Обсуждаются также проблемы биологически безопасного внедрения трансгенных растений семейства крестоцветных в сельскохозяйственную практику.

© В.В. РАДЧУК, Я.Б. БЛЮМ, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 3

Введение

Семейство крестоцветных (*Brassicaceae*) насчитывает около 380 родов растений, большинство из которых распространено в умеренных широтах Северного полушария [1]. Значение представителей этого семейства в жизни человека трудно переоценить. За последние десятилетия важнейшим видом стал рапс (*Brassica napus*). На сегодня он является (валовой сбор более 10 млн тонн в год) второй по значимости масличной культурой в мире [2]. Другие виды, *B. carinata* и *B. rapa* ssp. *oleifera* (син. *B. campestris*), *B. nigra*, *Camelina sativa*, *Crambe abyssinica*, также выращивают для производства масла. Огромное значение имеет полиморфный вид *B. oleracea*, включающий такие важные овощные культуры, как кочанную (var. *capitata*), брюссельскую (var. *gemnifera*), цветную (var. *botrytis*), листовую (var. *acephala*) капусту, брокколи (var. *italica*), кольраби (var. *gongylodes*). В качестве пищевых или кормовых культур используют также китайскую (*B. chinensis*) и пекинскую (*B. pekinensis*) капусту, редис и редьку (*Raphanus sativus*), сарептскую (*B. juncea*), черную (*B. nigra*) и белую (*Sinapis alba*) горчицу, турнепс (*B. rapa*) и другие виды.

Быстрое увеличение площадей под масличными культурами из рода *Brassica* стало следствием продуктивной селекционной работы с активным вовлечением в процесс создания новых сортов результатов исследований как в области классической генетики, так и генетической инженерии [3, 4]. Программы по созданию новых сортов с улучшенными пищевыми характеристиками масел, повышенной устойчивостью к различным заболеваниям и абиотическим факторам существуют во многих странах. Одним из наиболее впечатляющих примеров в этой области является коренное улучшение озимых сортов рапса в течение последних 25 лет. Для создания сортов с принципиально новым качественным составом масла, характеризующимся низким содержанием горьких и неперевариваемых вторичных метаболитов (так называемые сорта *double low* (00) *quality*), потребовалось только пять новых аллелей: два для нулевого уровня эруковой кислоты и три — для низкого уровня глюкозинолатов. Однако эти новые аллели, привнесенные в геном озимого рапса из ярового путем гибридизации, в самом начале были тесно

сцеплены с низкой урожайностью и другими нежелательными признаками [5]. Предполагали, что такую корреляцию можно преодолеть посредством последующих обратных скрещиваний. Поэтому, начиная с 70-х годов, было проведено огромное количество различных скрещиваний, которые привели к созданию новых сортов, обладающих качественно новыми характеристиками масла, и при этом их урожайность к началу 90-х годов превысила урожайность исходных линий. Параллельно были интродуцированы и другие полезные признаки, такие как уменьшенный габитус растений, высокая устойчивость к корневой гнили и мучнистой росе. Возможности классической селекции в улучшении сортов рапса далеко не исчерпаны. Это и более высокая стабильная урожайность, и устойчивость к ряду заболеваний. Особое значение для восточноевропейских стран имеет возможность получения более зимостойких линий рапса. Обратные скрещивания показали, что очень высокая зимостойкость хорошо комбинируется с признаками, отвечающими за качество масла [5].

Однако классическая селекция имеет и свои ограничения, заключающиеся в отсутствии для многих полезных признаков подходящих спонтанных вариаций генотипов. Поэтому более быстрый прогресс в создании новых сортов можно ожидать при вовлечении в селекционный процесс достижений биотехнологии и, в частности, генетической инженерии. Используя метод переноса генов в растения, можно получить или уже получены линии, которые обладают устойчивостью к грибным и вирусным заболеваниям, насекомым и нематодам, абиотическим факторам, а также линии с улучшенными пищевыми характеристиками. Кроме того, такие признаки, как очень высокое содержание масел с низким количеством побочных вторичных метаболитов в семенах, устойчивость к гербицидам, измененное соотношение жирных кислот в масле, можно получить только с помощью генно-инженерных методов.

В последние годы особое значение в научных исследованиях приобрел другой представитель семейства крестоцветных — *Arabidopsis thaliana* [6]. Благодаря небольшому геному, короткому жизненному циклу, маленькому раз-

меру это растение стало главным объектом в молекулярно-биологических, биохимических и других исследованиях растений. Завершена работа по установлению полной нуклеотидной последовательности генома арабидопсиса [6].

Однако получению трансгенных растений с хозяйственно полезными признаками должна предшествовать разработка методов генетической трансформации для широкого числа генотипически удаленных видов и сортов в семействе *Brassicaceae*. Как и вообще для растений, для крестоцветных не существует универсального подхода для легкого и надежного получения трансгенных линий, но в целом большинство представителей этого семейства являются удобным объектом для манипуляций *in vitro* [7].

Трансформация с помощью *Agrobacterium*

Естественная способность почвенной агробактерии переносить гены в геном растений послужила основой для разработки метода трансформации. Преимущества этого метода заключаются в относительной простоте манипуляций для получения трансгенных растений. Кроме того, в результате трансформации чаще всего происходит встраивание только одной или небольшого числа копий переносимого гена, что может иметь существенное значение для его экспрессии.

Одним из ключевых факторов успешной трансформации растений с использованием агробактерии является наличие высокоэффективной методики регенерации побегов из используемых для кокультивации эксплантов. Методики адвентивного органогенеза были разработаны для очень многих видов и сортов семейства. Легче всего достичь регенерации побегов у *B. napus* и *B. oleracea*, а самым трудным объектом является *B. rapa* [8]. Для получения регенерированных растений использовали различные типы эксплантов: гипокотили, семядольные листочки, сегменты стебля, листа, корня, пыльники и микроспоры (обзор [3]). При этом было установлено, что на эффективность регенерации оказывали влияние такие факторы, как генотип, состав сред и композиция фитогормонов в них, наличие ингибиторов этилена и др. Установлено, что наибольшей регенерационной способностью

обладают экспланты гипокотилей, которые чаще всего и использовали в дальнейшем в опытах по трансформации. Состояние и возраст эксплантов, а также время кокультивации с агробактерией являлись ключевыми для эффективного получения трансгенных растений [9, 10, 135].

В опытах по трансформации растений семейства крестоцветных были опробованы различные типы эксплантов. В нескольких работах использовали экспланты из *ex vitro* культуры: листовые диски [11], сегменты стебля [12], цветоносы [13]. Несмотря на высокую регенерационную способность таких эксплантов, существенным их недостатком является необходимость проведения стерилизации непосредственно перед трансформацией, что значительно снижает их жизнеспособность, а также приводит к большим потерям из-за нестерильности части эксплантов. Кроме того, в случае использования цветоносов необходимо проводить заблаговременное планирование опытов, учитывая, что такие растения, как озимый рапс и капуста, являются двулетними и продуцируют генеративные органы только на второй год культивирования. Поэтому наиболее удобным источником эксплантов являются растения из культуры *in vitro*. При этом в подавляющем большинстве случаев были использованы сегменты гипокотилей [10, 14, 15, 135] или семядольные листочки [9, 16], поскольку эти экспланты обладают наивысшей способностью к морфогенезу.

Результаты ранних работ, посвященных изучению способности различных штаммов *Agrobacterium* вызывать инфекционный ответ в растениях рассматриваемого семейства, были обобщены в обзорах [3, 4]. На современном этапе большой интерес представляет возможность получения трансгенных растений при помощи обезоруженных штаммов *A. tumefaciens*, чему и посвящено подавляющее большинство исследований. В результате было разработано несколько методик, позволяющих эффективно трансформировать чужеродными генами ряд видов и сортов семейства. Трансгенные растения были получены, в частности, для более чем 35 озимых и летних сортов рапса [3, 9, 18], в том числе и сортов, созданных на территории СНГ [19, 20], несколь-

ких промышленных сортов белокочанной [21, 22, 23] и цветной капусты [24], брокколи [22], а также у диплоидных видов *B. rapa* [12], *B. nigra* [25], *B. pekinensis* [26] и амфидиплоидных *B. juncea* [27], *B. carinata* [28, 29] и др.

Самым распространенным селективным маркером, используемым в опытах по трансформации, является ген устойчивости к канамицину *nptII*, хотя в ряде исследований показано, что при применении этого гена может ингибироваться регенерация трансгенных побегов [15]. Продемонстрировано также, что наиболее оптимальным маркером при трансформации рапса является ген *aadA*, обеспечивающий устойчивость к спектиномицину [15]. С недавних пор успешно также применяют витальный маркер GFP, флуоресцирующий в трансформированных тканях зеленым при их облучении определенной волной света [30, 134].

В конечном счете эти и другие факторы оказывали существенное влияние на эффективность трансформации. Средние значения частоты трансформации для крестоцветных составляют 2–10 %. Более высоких значений (соответственно 30 и 55 %) достигли только De Block и др. [10] при использовании гипокотилей и Moloney и др. [16], применяя семядольные листочки. Недавно была предложена высокоэффективная методика трансформации, позволяющая получать до 25 % трансгенных побегов из гипокотильных эксплантов [134].

Реже использовали для трансформации растений семейства другой вид агробактерии — *A. rhizogenes*. При применении этой агробактерии чаще всего получают трансформированный корень с модифицированным фенотипом, так называемый «бородатый корень». Растения, которые регенерируют из этой ткани, часто также морфологически изменены из-за встраивания в растительный геном дополнительного генного локуса *rol* [31]. Такие растения характеризуются отсутствием апикального доминирования, имеют видоизмененные листья и т.п. Это значительно ограничивает возможность их использования в коммерческих целях. Морфологически ненормальные корни и побеги были получены при использовании *A. rhizogenes* у рапса [13], белокочанной капусты [32, 33] и турнепса [33, 34]. Установлено, что агропиновые штаммы агробактерии

(A4, 15834) более вирулентны, чем маннопиновые (8196, TR101, TR7) [35]. Было также обнаружено, что более эффективно трансформация происходит при использовании *A. rhizogenes*, содержащей бинарный вектор с переносимым геном, в результате чего удается с достаточно высокой эффективностью получить фенотипически нормальные побеги из трансгенных корней, что и было использовано для трансформации *B. oleracea* [32, 33] и *B. campestris* [33].

Очень простой и эффективный метод был разработан для получения трансгенных растений у *A. thaliana*, заключающийся в трансформации взрослых растений *in planta* на стадии цветения [36]. Для этого цветоносы подвергали инфильтрации суспензией *A. tumefaciens* при помощи вакуума. Затем растения выращивали до созревания семян, а трансгенные линии отбирали среди сеянцев следующего поколения. Метод практически не требует использования культуры *in vitro* и регенерации, легко воспроизводится [37]. Показана также возможность множественного переноса генов при *in planta* трансформации арабидопсиса [37, 38]. При этом большинство генов с различных конструкций встраивается в один и тот же генетический локус, что может быть полезным при конструировании целых метаболических путей в трансгенных растениях [38]. Использование этого метода значительно ускорило фундаментальные исследования в биологии растений. В последнее время при использовании различных модификаций метода *in planta* трансформации были получены трансгенные растения у других представителей семейства крестоцветных — *B. campestris* ssp. *chinensis* [39] и редиса (*Raphanus sativus* ssp. *longipinnatus*) [132], а также у двух сортов рапса [40].

Методы прямой трансформации

Прямой перенос генов в реципиентные клетки может служить в качестве альтернативного пути для получения трансгенных растений. Главное его преимущество заключается в отсутствии посредника между вектором и реципиентом, потому что сконструированная ДНК переносится непосредственно в геном растительной клетки. Недостатками прямых методов трансформации являются относительно

трудоемкий процесс и более длительный период получения трансформантов, низкие уровни воспроизводимости методики [41]. Кроме того, часто наблюдается перенос множественных копий гена, что является нежелательным, так как может привести к замолчанию трансгенов [42].

Большинство работ по прямой трансформации основано на применении протопластов в качестве реципиентов внедряемой ДНК. Воспроизводимые системы для регенерации растений из протопластов были разработаны для *B. napus*, *B. oleracea*, *B. campestris*, *B. rapa*, *B. juncea*, *B. carinata* и других видов (обзор [43]). Источниками протопластов служили мезофильные ткани листа, гипокотилей или семядольных листочков.

Чужеродная ДНК может быть перенесена в протопласты с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) или электропорации. При использовании ПЭГ были получены трансгенные растения цветной капусты [11, 44, 45], *B. nigra* [25], *A. thaliana* [46]. С помощью электропорации были успешно протрансформированы рапс [47, 48] и цветная капуста [11].

Векторная ДНК может быть доставлена в клетку-реципиент также с помощью микроинъекций. Это наиболее трудоемкий метод, требующий от исследователя определенных навыков и не гарантирующий получения надежных, воспроизводимых результатов. Тем не менее микроинъекции были использованы для трансформации микроспор [49] и проэмбрионидов из микроспор [50] рапса. В этих случаях применение данного метода было оправданным, поскольку полученные растения оказались гомозиготными по перенесенному гену, что дало возможность изучения рецессивных аллелей.

Бомбардировка микрочастицами — относительно новый метод переноса генов в геном растений. Его применение позволило трансформировать те виды, которые раньше считались трудными для генетической инженерии, прежде всего злаковые культуры. Из-за относительной легкости получения трансгенных растений у крестоцветных при использовании других методов возможность переноса генов с помощью биобаллистической трансформации практически не изучалась. Только Chen и Ве-

versdorff [51] применили данный метод для трансформации микроспор рапса.

Хлоропласты как объект генетической трансформации

Хлоропласты имеют ряд преимуществ для того, чтобы быть мишенью при трансформации. Они содержат собственный геном, который состоит из одной циклической хромосомы, мультиплицированной в 50–60 раз. В отличие от трансформации ядерной ДНК перенос чужеродных генов в хлоропластную ДНК (хлДНК) происходит с помощью гомологической рекомбинации, и поэтому ген встраивается не в случайное, а в определенное место в хлДНК [52]. До сих пор неизвестно о влиянии места встраивания чужеродного гена на его экспрессию в хлоропластах.

Для перенесения чужеродной ДНК в хлоропласты высших растений разработано три основных способа: биобаллистическая трансформация [53–55], трансформация с помощью полиэтиленгликоля [56, 57] и прямая доставка ДНК с помощью микроинъекций [58]. С применением этих подходов были получены растения, содержащие трансформированные хлоропласты у двух видов табака [55–57], а также у картофеля [59], риса [60] и арабидопсиса [61]. Интенсивно проводятся исследования по разработке метода переноса генов в хлДНК рапса.

Одно из главных преимуществ трансформированных хлоропластов заключается в том, что у большинства видов растений хлоропласты наследуются только по материнской линии [62]. Они не содержатся в пыльце, и поэтому чужеродные гены не могут распространяться в окружающей среде при помощи переопыления с дикими сородичами, что имеет огромное значение для биологически безопасного внедрения трансгенных растений в промышленных масштабах [63].

Получение трансгенных растений с хозяйственно полезными признаками

После разработки надежных и воспроизводимых методик трансформации последовали работы по переносу ряда генов, кодирующих хозяйственно полезные признаки. Этому способствовали также успехи биохимии, генетики

и, в особенности, молекулярной биологии, поскольку к сегодняшнему дню описаны основные пути биосинтеза веществ клетками растений и клонированы соответствующие гены [64].

Улучшение качества и соотношения жирных кислот в масле. Состав растительного масла и соотношение в нем жирных кислот являются ключевыми компонентами, определяющими уровень потребления того или иного вида масла [2]. Исходные линии рапса содержат несколько веществ, не пригодных для пищи: около 25–50 % эруковой (цис-13-докосеноиновой) кислоты (C_{22:1}) и глюкозинолаты. Эруковая кислота практически не переваривается в кишечнике и вызывает микроповреждения сердца у млекопитающих [65]. Поэтому еще несколько десятилетий назад масло из растений этого семейства имело только техническое применение. Но благодаря интенсивной селекционной работе, описанной в начале статьи, удалось создать сорта *B. napus* и *B. juncea*, которые не содержат этих неперевариваемых компонентов, что привело к значительному увеличению производства масла из крестоцветных [17]. Однако наличие некоторого количества ароматических глюкозинолатов иногда также отрицательно влияет на качество масла. Была сделана успешная попытка уменьшить содержание гликозинолатов с помощью генетической трансформации. В семенах трансгенных растений, экспрессирующих триптофан-декарбоксилазу, наблюдали уменьшение накопления глюкозинолатов на 97 % по сравнению с контролем [66].

Использование масла зависит от соотношения в нем жирных кислот. Растительное масло промышленных сортов растений семейства крестоцветных содержит главным образом пять основных жирных кислот: пальмитиновую, стеариновую, олеиновую, линолевую и линоленовую [17]. Масло рапса и других представителей этого рода содержит большое количество ненасыщенных жирных кислот и поэтому имеет высокие пищевые свойства. Однако для использования масла в технических целях необходимо, чтобы исходное сырье содержало больше пальмитиновой, олеиновой и линолевой кислот, но меньше линоленовой. При этом желательно, чтобы семена накапливали в основном только один тип жирной кис-

лоты, поскольку, главным образом, например, стеариновая кислота используется для производства маргарина, лауриловая — для детергентов и мыла и т.д.

С помощью методов генетической трансформации удалось изменить состав и соотношение жирных кислот в масле рапса. Первым достижением в этом направлении было получение трансгенных растений рапса, накапливающих около 50 % только одной лауриловой кислоты, в результате переноса гена, кодирующего фермент (12:0)-ацилтиоэстеразу из семян *Umbellularia californica* [67]. Экспрессия гена (16:0)-пальмитоил-ацил-тиоэстеразы из семян *Cuphea hookeriana* растениями рапса привела к увеличению пропорции (16:1)-пальмитиновой и уменьшению (18:1)-стеариновой кислоты [68]. В результате переноса гена специфической для семян стеариол-АСР-десатуразы в антисмысловой ориентации наблюдали изменение соотношения жирных кислот в рапсе, приведшее к увеличению на 30 % уровня (18:1)-стеариловой кислоты [69]. На сегодня опубликованы ряд других сообщений об успешной модификации композиции жирных аминокислот в масличных *Brassica* с последующими полевыми испытаниями четырех сортов. Существуют растительные линии с увеличенным содержанием до 40 % стеариновой (18:1), 60 % — лауриловой и 80 % — олеиновой кислот [2], тогда как контрольные растения накапливают только около 1–2 % стеариловой и 0,1 % лауриловой кислот. Достаточно реалистичной следует рассматривать возможность создания трансгенных линий, которые способны продуцировать до 90 % только одного типа жирной кислоты, что сделает их промышленно значимыми [2]. Так, американской компанией «Monsanto» созданы трансгенные растения рапса, которые накапливают в семенах главным образом лауриловую кислоту.

Улучшение кормовых качеств семян. Жмых семян, который остается после выделения масла, содержит в своем составе до 40 % белков, поэтому он является ценным кормом для животных. Однако белок жмыха семян масличных культур крестоцветных содержит несбалансированный состав аминокислот, в особенности мало метионина и лизина, что зна-

чительно снижает его питательную ценность. Поэтому были предприняты попытки модифицировать состав и соотношение аминокислот в семенах. При трансформации рапса геном 2S альбумина из *Bertholletia excelsa* семена трансгенных растений содержали на 33 % больше метионина в сравнении с контролем [70]. После интеграции гена, кодирующего напин, в антисмысловой ориентации наблюдали изменение направления биосинтеза запасных белков в трансгенных семенах рапса, приведшее к уменьшению количества менее ценного напина и увеличению круциферина [71]. При экспрессии гена круциферина в антисмысловой ориентации наблюдали увеличение содержания напина. Однако суммарный белок характеризовался повышенным содержанием незаменимых аминокислот лизина, метионина и цистеина по сравнению с контролем [72]. За счет экспрессии бактериальных генов лизин-нечувствительной дигидропиколиновой кислотой синтетазы и аспартаткиназы получили трансгенные растения рапса, аккумулирующие в семенах в пять раз больше лизина, чем контрольные линии [73].

Фитат является основным фосфорсодержащим запасующим веществом в растительных семенах. Однако домашние животные не могут эффективно извлекать фосфор из растительного сырья из-за недостатка фермента фитазы, расщепляющего фитат. Получены трансгенные растения рапса, экспрессирующие ген фитазы из *Aspergillus niger*, которые имеют более высокую кормовую ценность в отношении фосфора [133].

Улучшение сельскохозяйственных характеристик. Наибольший прогресс в этом направлении достигнут в получении промышленных сортов растений, устойчивых к гербицидам. Растения рапса и капусты, устойчивые к бифлафосу и глюфоzinату (фосфинотрицину), были получены в результате экспрессии переноса гена *bar* (фосфинотрицин-ацетил-трансферазы) из *Streptomyces hydropiscus* [10]. Экспрессия мутантного гена ацетоллактатсинтетазы из *A. thaliana* в растениях рапса привела к устойчивости трансгенных линий к хлорсульфурону, имидазолинону, флуметсуламу и метсульфурону [74], а экспрессия гена *aroA* из *Salmonella typhimurium* в растениях *B. campestris*

обеспечила устойчивость к гербицидам, содержащим в своем составе глифосат [75].

Огромные потери урожая при выращивании крестоцветных происходят из-за различных заболеваний и поражения вредителями, а применение химических средств борьбы приводит к удорожанию продукции и загрязнению окружающей среды. С целью повышения устойчивости растений к грибным фитопатогенам для трансформации использовали гены хитиназы различного происхождения. В результате получены трансгенные растения крестоцветных с повышенной устойчивостью к фитопатогенным грибам *Alternaria brassicae*, *Cylindrosporium concentricum*, *Phoma lingam*, *Sclerotinia sclerotiorum* [76]. Трансгенные растения рапса, экспрессирующие хитиназу из бобов, показали более высокую устойчивость к *Risoctonia solani* [77]. В результате трансформации растений рапса различными генами устойчивости из гороха — PR10.1, DRR206, хитиназой и дефензином — было установлено, что ген DRR206 при конститутивной экспрессии обеспечивает устойчивость к *Phoma lingam* [78]. При экспрессии гена дефензина также отмечали повышение устойчивости трансгенных растений к грибным фитопатогенам, тогда как экспрессия гена хитиназы не приводила к такой устойчивости, что противоречит данным других исследователей [76]. Вероятно, эти различия вызваны использованием различных по происхождению генов хитиназы. Экспрессия гена дефензина из редьки после перенесения в геном рапса и помидоров приводила к повышению устойчивости к ряду фитопатогенов как в опытах *in vitro*, так и *in vivo* [79]. Вероятно, что некоторые гены дефензинов могут быть использованы для получения трансгенных растений с повышенной устойчивостью к ряду заболеваний.

Растения, устойчивые к вирусам, практически невозможно получить при применении методов классической селекции. Однако трансгенные растения, содержащие часть ДНК вирусного генома, часто оказываются резистентными к поражению данным вирусом. Так, растения *B. napus*, экспрессирующие ген белка IV оболочки вируса мозаики цветной капусты, оказались устойчивыми к этому вирусу [80]. После переноса 100 пар оснований ДНК неко-

дирующей области вируса желтой мозаики турнепса (TYMV) в геном рапса наблюдали частичную устойчивость трансгенных растений к TYMV [81].

Создание растений, устойчивых к насекомым, связано главным образом с переносом генов семейства *cry*, кодирующих инсектицидные белки из *Bacillus thuringiensis*. Поскольку природные гены зачастую не являются активными в растениях, основные успехи связаны с применением синтетических генов, адаптированных для экспрессии в растениях. Трансгенные линии кочанной капусты [81] и брокколи [82–84], экспрессирующие различные изоформы гена *cry*, были высокоустойчивы к личинкам капустной моли (*Plutella xylostella*). При трансформации растений цветной капусты геном, кодирующим ингибитор трипсина, получены трансгенные растения, устойчивые к капустной моли и *Spodoptera litura* [85]. Показано, что агглютинин из зародышей пшеницы, являясь хитин-связывающим лектином, обладает инсектицидными свойствами. Растения горчицы (*Brassica juncea*), полученные в результате трансформации кДНК этого гена, были высокоустойчивы к горчичной тле (*Lipaphis erysimi*) [86]. Это один из первых успешных примеров получения методами биотехнологии растений, устойчивых к тле.

Абиотические факторы окружающей среды также приводят к значительным потерям урожая, поэтому был предпринят ряд попыток создания более устойчивых к ним линий трансгенных растений. Повышенная устойчивость к ионам тяжелых металлов получена за счет перенесения гена металлотионеина человека в геном *B. napus*. В результате трансгенные растения могли расти на грунтах с летальным для контрольных растений уровнем хлорида кадмия [87]. Поскольку эти растения способны накапливать тяжелые металлы, предположили, что они могут быть использованы для очистки загрязненных почв. Изучали также влияние бетаина, пролина и полиаминов на засухо- и солеустойчивость трансформированных растений рапса [88, 89].

Конструирование мужской стерильности и самосовместимости. Контроль за опылением растений, особенно для перекрестноопыляемых видов, является наиболее сложной и тру-

доемкой задачей в производстве гибридных семян F₁. Практическое значение при этом имеют линии с мужской стерильностью различных типов. В случае рапса ядерная мужская стерильность получена генно-инженерным путем в результате трансформации геном рибонуклеазы [90] и химерным геном, состоящим из барназы и РНКазы T1 под контролем тканеспецифического промотора [91]. Мужкостерильные растения белокочанной капусты были получены в результате переноса части гена дифтерии (*DTx-A*) под пыльцеспецифичным промотором [92].

Самосовместимость у белокочанной капусты определяется S-локусом и наблюдается в случае, когда тот же аллель экспрессируется в пыльцевой трубке и рыльце. Ген и промотор S-локус специфического гликопротеина (SLG) был изолирован. После трансформации растений *B. oleracea* геном SLG из *B. rapa* наблюдали восстановление самосовместимого фенотипа у трансгенных растений капусты [93].

Другие возможности генно-инженерного улучшения растений семейства крестоцветных. Масла в клетках семян запасаются в виде триглицеридов в масляных тельцах — олеосомах. Они отделены от цитоплазмы однослойной фосфолипидной мембраной, которая содержит большое количество специальных высоколипофильных белков, называемых олеозинами. Эти белки характеризуются высоким уровнем экспрессии в развивающихся семенах. Установлено, что олеозины могут обеспечивать транспорт рекомбинантных белков в олеосомы [29]. Следовательно, можно значительно облегчить дальнейшее выделение чужеродных белков из растений, поскольку они могут быть отобраны вместе с маслом, отделены от олеозина при помощи протеаз и выделены в чистом виде [94].

Использование трансгенных растений в качестве продуцентов полимеров может улучшить экологическую ситуацию, поскольку сейчас все пластические массы изготавливают из невозобновляемых источников углерода, которые являются ограниченными. В одной из первых работ по получению биополимеров в клетках растений показано, что в результате изменения метаболических путей в листьях и семенах трансгенных растений рап-

са и арабидопсиса происходил биосинтез и накопление полимера поли-3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалериата [95].

В качестве биореактора для промышленного производства трансгенного белка может использоваться белокочанная капуста [17]. Капуста в отличие от картофеля или табака не содержит токсических веществ. Последние опыты по трансформации показали, что трудности в получении трансгенных линий для этой культуры могут быть преодолены [21]. Одним из успешных примеров использования трансгенных растений в качестве биореактора являются также растения рапса, экспрессирующие ген запасного белка семян арабидопсиса, часть которого была заменена последовательностью, кодирующей нейропептид энкефалин. Модифицированный пептид был выделен, гидролизован трипсином, и в результате получен активный эндорфинный энкефалин человека [96].

Проблемы биологической безопасности трансгенных растений: вертикальный перенос генов

Количество опытов, демонстрирующих возможное практическое применение трансгенных растений семейства, растет с каждым днем. Недостаточный уровень знаний о возможном влиянии трансгенных растений на окружающую среду и здоровье человека привел к увеличению количества исследований по изучению аспектов безопасного внедрения новых трансгенных линий в промышленных масштабах.

Предложено различать проблемы биобезопасности (biosafety) в узком и широком смысле [97]. Биобезопасность в узком смысле включает проблемы определения присутствия трансгенов в том или ином организме, экологических особенностей генетически модифицированных организмов (ГМО) и токсикологической оценки ГМО или продуктов, их содержащих, тогда как биобезопасность в широком смысле затрагивает все другие возможные проблемы внедрения ГМО (например, социальноэкономические, этические). Потенциальный риск внедрения трансгенных растений заключается в их опасности для здоровья человека и распространении чужеродных генов в окружающей среде [98].

Большинство генов, используемых в качестве маркерных при получении трансгенных

растений, кодируют продукты, обеспечивающие устойчивость к различным антибиотикам, что существенно ограничивает внедрение подобных растений. Однако сейчас в качестве селективных используют и другие гены, например, ген устойчивости к гербицидам [97]. Такие подходы, как инактивация селективного гена [99] или его удаление из растительного генома с помощью гомологической рекомбинации [100] или транспозонов [101], также позволяют создать трансгенные линии, свободные от нежелательных последовательностей ДНК. При использовании для трансформации двух конструкций одновременно, одна из которых содержит нужный ген, а другая — маркерный, можно получить трансгенные растения, содержащие эти гены в различных нехомологичных генетических локусах [100]. С помощью последующих гибридизаций можно отобрать растения, содержащие только нужный ген [102].

Основное внимание при изучении проблем биобезопасности уделяют вероятности переноса чужеродных генов из культивируемых генетически модифицированных растений в окружающую среду посредством их одичания или переопыления с дикими сородичами [103], что может нарушить баланс в экосистеме и привести, например, к появлению «суперсорняков» [104]. Перенос генов между растениями разных видов или родов называют вертикальным [103].

Рапс был одной из первых трансгенных культур, допущенных к промышленному выращиванию. По данным на 2000 г., эту культуру выращивали в мире на площадях в 25 млн га, и 11 % этих посевов было занято генетически модифицированными сортами рапса [105]. В нашей работе [103] обобщены результаты изучения рапса в качестве потенциального сорняка, которые показали, что по экологическим характеристикам прорастание семян рапса следует отнести к категории «дикое растение» в пределах агросистемы. Более того, в соответствии с ростовым поведением и высокой репродуктивной способностью *B. napus* вытесняет сорняки и сам выступает как типичный конкурентоспособный сорняк, который дает ежегодно обновляющиеся семена даже в условиях ротационной системы севооборота. Следовательно, оценку риска влияния

на окружающую среду неконтролируемого высвобождения генетически модифицированных сортов рапса можно проводить только при условии всестороннего изучения способности этой сельскохозяйственной культуры к образованию гибридов с близкородственными видами и жизнеспособности таких гибридов [103].

Возникновение гибридов с генетически модифицированным *B. napus* может привести к переносу нового признака в геном сородичей, в результате чего возможно возникновение более жизнеспособных, в сравнении с существующими, вредоносных организмов и нарушение экологических взаимосвязей за счет вытеснения и/или замены одних видов другими. Возможность гибридизации рапса с сородичами в естественных условиях зависит от нескольких факторов: совпадения, хотя бы частичного, периодов цветения, наличия совместных переопылителей (для перекрестноопыляющихся видов), способа переноса пыльцы и достаточного близкого расположения растений друг от друга [106]. Проведен ряд опытов по установлению возможности переноса чужеродных генов из рапса к диким видам при помощи искусственного или естественного переопыления (таблица), а также при нормальных агрономических условиях [107]. Установлены также частота и расстояние возможного распространения пыльцы [108].

Показано, что для успешного завязывания семян важным является хромосомный набор культивируемых видов и их сородичей. Большинство возникающих гибридов нежизнеспособны из-за недостаточного развития эндосперма. Для успешного развития семени необходимо, чтобы соотношение материнских и отцовских хромосом было не менее 2 : 1 [109], поэтому направление скрещивания имеет большое значение. Опыление тетраплоидного женского растения пыльцой диплоидного обычно приводит к формированию семени. И наоборот, реципрокное скрещивание чаще всего не приводит к появлению гибридов, т.е. стерильно. Предложена концепция числа баланса эндосперма (ЧБЭ), согласно которой соотношение, характерное для данного вида, не связано с его хромосомным числом, а зависит от произвольной величины, которое определяется из числа удачных скрещиваний

при условии, что соотношение ЧБЭ в эндосперме остается 2 : 1 [110], т.е. скрещивание между двумя видами возможно только в случае, когда опыляемый вид имеет уровень ploидности не ниже того, который используют в качестве донора пыльцы.

B. napus является основной сельскохозяйственной культурой семейства и представляет собой аллотетраплоид, который произошел в результате слияний двух диплоидных геномов — СС генома *B. oleracea* и АА генома *B. campestris* (син.: *B. rapa*) [114], поэтому он имеет большую вероятность скрещивания с диплоидными видами в качестве материнского

Межвидовые и межродовые скрещивания вида *B. napus*, полученные половым путем

Скрещивание, женская × мужская особи	Тип потомков	Источник литературы
<i>B. rapa</i> × <i>B. napus</i>	СГ, F ₁ , F ₂ , Б	[111–115]
<i>B. napus</i> × <i>B. rapa</i>	СГ, F ₁ , F ₂ , Б	[111–115]
<i>B. juncea</i> × <i>B. napus</i>	СГ, F ₁ , F ₂ , Б	[113, 116–118]
<i>B. napus</i> × <i>B. juncea</i>	СГ, F ₁ , F ₂ , Б	[113, 116–118]
<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>	F ₁	[115]
<i>B. napus</i> × <i>B. oleracea</i>	F ₁ , F ₂ , Б	[119, 120]
<i>B. carinata</i> × <i>B. napus</i>	F ₁ , F ₂ , Б	[118, 121]
<i>B. napus</i> × <i>B. carinata</i>	F ₁ , F ₂ , Б	[114, 118, 121]
<i>B. nigra</i> × <i>B. napus</i>	СГ, F ₁ , Б	[116]
<i>B. napus</i> × <i>B. nigra</i>	СГ, F ₁ , F ₂ , БсР	[122]
<i>B. napus</i> × <i>Hirschfeldia incana</i>	СГ, МСГ, F ₁ , Б	[123, 124]
<i>B. napus</i> × <i>R. raphanistrum</i>	СГ, МСГ, F ₁ , Б	[125]
<i>D. erucoides</i> × <i>B. napus</i>	F ₁ , Б	[126]
<i>D. muralis</i> × <i>B. napus</i>	F ₁ , Б	[126]
<i>B. napus</i> × <i>Sinapis alba</i>	F ₁ , Б	[124]
<i>B. napus</i> × <i>Erucastrum gallicum</i>	F ₁	[125]
<i>B. napus</i> × <i>Sinapis alba</i>	F ₁	[122]
<i>B. napus</i> × <i>S. arvensis</i>	F ₁	[122]
<i>B. napus</i> × <i>B. fruticulosa</i>	F ₁	[122]
<i>B. napus</i> × <i>B. tournfortii</i>	F ₁	[122]
<i>B. napus</i> × <i>D. tenuifolia</i>	F ₁	[122]
<i>B. napus</i> × <i>Eruca sativa</i>	F ₁	[122]
<i>B. napus</i> × <i>R. rugosum</i>	F ₁	[122]
<i>B. maurorum</i> × <i>B. napus</i>	F ₁ , МСГ	[127]

Примечания. СГ — спонтанные гибриды, образовавшиеся без кастрации и опыления; МСГ — мужскостерильные спонтанные гибриды *B. napus*; F₁ — гибриды, полученные с использованием кастрации и искусственного опыления; F₂ — гибриды второго поколения; Б — поколения беккроссов.

растения [128, 129]. Но передача генетического материала от *B. napus* к диким сородичам при использовании его в качестве донора пыльцы практически невозможна. Существующие исключения, как показано ниже, также не приводят к дальнейшему распространению трансгенов в полученных гибридах. В случае с *Raphanum raphanistrum* не было отмечено разницы в направлении скрещивания [128], но все гибриды были мужскостерильны. Гибриды с *Sinapis alba* были возможны также и при обратных скрещиваниях, но только при применении дополнительных манипуляций — кастрации и искусственного опыления [130], что невозможно в естественных условиях. Все гибриды *B. maurorum* × *B. napus*, полученные в результате искусственного опыления и спасения зародышей через культуру *in vitro*, также оказались стерильными [127].

Однако образование гибридов *B. napus*, где рапс выступает в качестве материнского растения, с другими диплоидными видами при использовании их в качестве донора пыльцы проходит достаточно легко и поэтому неизбежно, особенно если отдельные растения рапса достаточно редко расположены в популяции [129]. Но имеют ли подобные гибридные растения шанс превратиться в сорные или одичавшие? Показано, что дальнейшее распространение генов при помощи переопыления рапса пыльцой *Raphanus raphanistrum* [131] или *B. rapa* [129] в естественных условиях происходит медленно и с низкой вероятностью. Необходимо как минимум четыре поколения для того, чтобы растения, несущие искусственно созданную генетическую конструкцию, приобрели хромосомный набор и фенотип, близкий к сорнякам [107]. В обычных сельскохозяйственных условиях это практически невозможно. Снижение вероятности распространения одичавших трансгенных растений должно происходить также при соблюдении следующих агротехнических приемов выращивания: удаление сорняков при помощи быстро распадающихся и поэтому менее вредных для среды гербицидов сплошного действия (типа Liberty® или Roundup®), соблюдение севооборота и/или выращивание трансгенных растений в зонах, где отсутствуют их дикие сородичи [98]. Недавно предложен но-

вый метод, позволяющий полностью исключить распространение трансгенных растений при помощи переопыления их с дикими сородичами. Способ заключается во встраивании в геном растений конструкции, содержащей нужный ген и дополнительный генетический локус, который в последующем блокирует жизненно важные функции в спонтанно возникших гибридах, что приводит к их гибели [132].

Поскольку, как уже отмечалось выше, хлоропласты большинства видов растений наследуются только по материнской линии, то хлДНК может быть идеальной мишенью для встраивания чужеродных генов. Была исследована возможность переноса генов с помощью пыльцы от транспластомного *B. napus* к дикому близкому виду *B. rapa* с использованием естественно существующих хлоропластных генов в качестве маркеров для гипотетической трансмиссии генов [62]. Оказалось, что в отличие от ядерных генов пластидные гены не переносятся от культурных видов к диким при помощи пыльцы.

Анализ данных свидетельствует, что для определения возможности переноса генов в геном любого вида семейства крестоцветных необходимо изучить обратные скрещивания растений этого вида с родственными, способность полученных гибридов к выживанию, фертильность их потомков, а также в случае перенесения генов, определяющих устойчивость к гербицидам, проверить экспрессию этих генов в поколениях F_1 и F_2 . Значительно повышается вероятность гибридизации через нестабильность числа хромосом у многих изученных диких родственных рапсу видов [116].

Из рассмотренных данных следует, что изучение вероятности перенесения генов от культурных к диким близкородственным видам является фундаментальной составляющей определения риска внедрения трансгенных растений. Надо заметить, что проводимые в контролируемых условиях эксперименты не могут предусмотреть все существующие аспекты проблемы. Степень перемещения генов от культурных видов к диким должна определяться конкретно в каждом регионе, где планируется выращивание трансгенных растений, поскольку риск от внедрения трансгенных растений значительно варьирует в зависи-

мости от агроэкосистемы. Создание эффективной информационной сети о состоянии научных исследований в данной области могло бы привести к более разумным решениям по регуляции распространения ГМО. Поскольку каждая страна обладает уникальным набором региональных и культурных детерминант, имеющих отношение к выращиванию и использованию трансгенных растений, внедрение новых технологий должно происходить только в результате широкой общественной дискуссии с привлечением мнения и результатов ученых, работающих в данной области исследований.

Заключение

На примере применения современных методов биотехнологии для получения новых форм и линий растений семейства крестоцветных видно, насколько широки возможности использования новых генетически модифицированных растений в будущем. Генетическая инженерия может внести свой вклад в решение таких проблем, как голод, загрязнение окружающей среды или рост населения. Хорошим примером является распространение выращивания гербицидустойчивого рапса на территории Канады, где раньше это было невозможно [98].

При этом важно осознавать, что существуют и ограничения методических возможностей генетической инженерии. Хотя теоретически возможен перенос генов из любого донорного организма в любой реципиентный, на практике это достижимо не всегда. Очевидно, что большие успехи в молекулярной биологии крестоцветных, достигнутые за последнее время, позволят постепенно решить ряд вопросов, связанных с эффективным функционированием чужеродных генов в растениях, принадлежащих к этому семейству. Кроме того, коллинеарность геномов *Brassica* и *Arabidopsis* позволит использовать генетические ресурсы арабидопсиса для изучения и клонирования генов из растений рода *Brassica* [2, 6]. Методики генетической трансформации для большинства важных представителей семейства разработаны настолько, что дают возможность использовать их как для изучения функций и регуляции генов, так и для получения коммерческих линий трансгенных растений.

Однако новая технология еще должна доказать свое преимущество в практическом использовании. Скорее всего, в будущем генетически модифицированные растения станут базисным материалом для классической генетики и селекции, которые и дальше будут основой для создания новых линий и сортов растений. В любом случае, необходимы дальнейшие исследования для установления условий безопасного вовлечения трансгенных растений в сельскохозяйственное производство.

SUMMARY. Plants of the *Brassicaceae* family are important oil, vegetable and feed crops. The review is devoted to the latest achievements in genetic engineering of plants from this family. Results concerning development of effective methods both of *Agrobacterium*-mediated transformation and of direct gene uptake are considered. Particularly, possibilities of plant genetic modification with the aim to improve agronomically and commercially important traits are stressed. Problems of biologically safe introduction of transgenic plants into agricultural production are discussed.

РЕЗЮМЕ. Узагальнено останні досягнення генетичної інженерії рослин родини хрестоцвітих, багато з яких є важливими олійними, овочевими та кормовими культурами. Детально розглянуто результати по розвитку ефективних методів трансформації хрестоцвітих як за допомогою *Agrobacterium*, так і прямого переносу генів. Головний акцент зроблено на можливостях генетичної модифікації рослин з метою покращання їх господарсько корисних ознак. Обговорюються також проблеми біологічно безпечного впровадження трансгенних рослин родини хрестоцвітих у сільськогосподарську практику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветилян В.Е. Семейство крестоцветные (*Brassicaceae*, или *Cruciferae*) // Жизнь растений / Под ред. А.Л. Тахтаджяна. — М.: Просвещение, 1981. — 5 (2). — С. 67—74.
2. Murphy D.J. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops // Trends Biotechnol. — 1996. — 14. — P. 206—213.
3. Poulsen G.B. Genetic transformation of *Brassica* // Plant Breed. — 1996. — 115. — P. 209—225.
4. Puddephat I.J., Riggs T.J., Fennig T.M. Transformation of *Brassica oleracea* L.: a critical review // Mol. Breed. — 1996. — 2. — P. 185—210.
5. Frauen M. Potentials and limitations of Mendelian genetics for plant breeding — rapeseed as an example // Vortr. Pflanzenzucht. — 2000. — 48. — P. 338—340.
6. The *Arabidopsis* genome initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. — 2000. — 408. — P. 796—815.
7. Sjödin C. *Brassicaceae*, a plant family well suited for modern biotechnology // Acta Agr. Scand. — 1992. — 42. — P. 197—207.
8. Murata M., Orton T.J. Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica* species // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1987. — 11. — P. 111—123.
9. Радчук В.В., Клоке Э., Радчук Р.И., Нойманн М., Блюм Я.Б. Получение трансгенных растений рапса (*Brassica napus* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Генетика. — 2000. — 36, № 7. — С. 932—941.
10. De Block M., Debrouwer D., Tenning P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants // Plant Physiol. — 1989. — 91. — P. 964—701.
11. Eimert K., Siegemund F. Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) — an experimental survey // Plant Mol. Biol. — 1992. — 19. — P. 485—490.
12. Kuvshinov V., Koivu K., Kanerva A., Pehu E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of greenhouse-grown *Brassica rapa* ssp. *oleifera* // Plant Cell Rep. — 1999. — 18. — P. 773.
13. Boulter M.E., Croy E., Simpson P., Shields R., Croy R.R.D., Shirsat A.H. Transformation of *Brassica napus* L. (oilseed rape) using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* — a comparison // Plant Sci. — 1990. — 70. — P. 91—99.
14. Radchuk V.V., Klocke E., Ryschka U., Neumann M. Optimierung des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers bei verschiedenen *Brassicaceae* // Vortr. Pflanzenzucht. — 1998. — 42. — P. 107—109.
15. Schröder M., Dixelius C., Rahlen L., Glimelius K. Transformation of *Brassica napus* by using the *aadA* gene as selectable marker and inheritance studies of the marker genes // Physiol. Plant. — 1994. — 92. — P. 37—46.
16. Moloney M.M., Walker J.M., Sharma K.K. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors // Plant Cell Rep. — 1989. — 8. — P. 238—242.
17. Kuvshinov V., Koivu K., Pehu E. Biotechnology and genetic resources applied in oil-seed and vegetative *Brassica* improvement // Plant Biotechnology and Plant Genetic Resources for Sustainability and Productivity / Eds K. Watanabe, E. Pehu, 1997. — P. 197—207.
18. Damgaard O., Jensen L.H., Rasmussen O.S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* cultivars // Transgen. Res. — 1997. — 6. — P. 279—288.
19. Гурич А.М., Череп Н.Н., Скаржинская М.В., Головки А.Э., Глеба Ю.Ю. Генетическая трансформация *Brassica napus* L. с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Цитология и генетика. — 1995. — 29. — С. 20—25.
20. Ралдугина Г.Н., Горелова С.В., Кожемякин А.В. Стабильность и наследование перенесенных генов в растениях рапса // Физиология растений. — 2000. — 47, № 3. — С. 386—393.
21. Радчук В.В., Блюм Я.Б., Рышка У., Шуманн Г., Кло-

- ке Э. Изучение регенерации и получение трансгенных растений у различных сортов белокочанной капусты // Физиология растений. — 2000. — 47, № 4. — С. 453—460.
22. Metz T., Dixit R., Earle E.D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*) // Plant Cell Rep. — 1995. — 15. — P. 287—292.
 23. Tzukaazaki H., Kuginuki Y., Aida R., Suzuki T. *Agrobacterium*-mediated transformation of a double haploid line of cabbage // Plant Cell Rep. — 2002. — 21. — P. 257—262.
 24. Bhalla P.L., Smith N. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis* // Mol. Breed. — 1998. — 4. — P. 531—541.
 25. Gupta V., Sita G.L., Shaila M.S., Jagannathan V. Genetic transformation of *Brassica nigra* by *Agrobacterium* based vector and direct plasmid uptake // Plant Cell Rep. — 1993. — 12. — P. 418—421.
 26. Jun S.I., Kwon S.Y., Paek K.Y., Paek K.H. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Spring Flavor') // Plant Cell Rep. — 1995. — 14. — P. 620—625.
 27. Pental D., Pradhan A.K., Sodhi Y.S., Mukhopadhyay A. Variation amongst *Brassica juncea* cultivars for regeneration from hypocotyl explants and optimization of conditions for *Agrobacterium* mediated genetic transformation // Plant Cell Rep. — 1993. — 12. — P. 462—467.
 28. Babic V., Dalta R.S., Scoles G.J., Keller W.A. Development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system for *Brassica carinata* // Plant Cell Rep. — 1998. — 17. — P. 183—188.
 29. Chaudhary S., Parmenter D.L., Moloney M.M. Transgenic *Brassica carinata* as a vehicle for the production of recombinant proteins in seeds // Plant Cell Rep. — 1998. — 17. — P. 195—200.
 30. Малышенко С.И., Тюлькина Л.Г., Зверева С.Д., Радугина Г.Н. Трансгенные растения *Brassica campestris*, экспрессирующие gfp протеин // Физиология растений. — 2003. — 50. — С. 276—281.
 31. Topfer D. Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives / Eds T. Kosuge, E.W. Nester. — New York : McGraw-Hill Publ., 1989. — P. 294—342.
 32. Beclin C., Chalot F., Botton E., Jouanin L., Dore C. Potential use of the *aux2* gene from *Agrobacterium rhizogenes* as a conditional negative marker in transgenic cabbage // Transgen. Res. — 1993. — 2. — P. 48—55.
 33. Christey M.C., Sinclair B.K., Braun R.H., Wyke L. Regeneration of transgenic vegetable brassicas (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation // Plant Cell Rep. — 1997. — 16. — P. 587—593.
 34. Berthomieu P., Jouanin L. Transformation of rapid cycling cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) by *Agrobacterium rhizogenes* // Plant Cell Rep. — 1992. — 11. — P. 334—338.
 35. David C., Tempe J. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by *Agrobacterium rhizogenes* // Plant Cell Rep. — 1988. — 7. — P. 88—91.
 36. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants // C.R. Acad. Sci. Paris. — Life Sci. — 1993. — 316. — P. 1194—1199.
 37. Радчук В.В. Ко-интеграция генов при одновременной трансформации растений *Arabidopsis thaliana* методом *in planta* различными векторами // Биополимеры и клетка. — 2001. — 17, № 3. — С. 237—241.
 38. Radchuk V.V., Van D.T., Klocke E. Multiple gene co-integration in *Arabidopsis thaliana* predominantly occurs in the same genetic locus after simultaneous *in planta* transformation with distinct *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Sci. 2005 (submitted).
 39. Qing C.M., Fan L., Lei Y., Bouchez D., Tourneur C., Yan L., Robaglia C. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration // Mol. Breed. — 2000. — 6. — P. 67—72.
 40. Wang W.C., Menon G., Hansen G. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants // Plant Cell Rep. — 2003. — 22. — P. 274—281.
 41. Potrykus I. Gene transfer to plants — assessment of published approaches and results // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1991. — 42. — P. 205—225.
 42. Kooter J.M., Matzke M.A., Meyer P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control // Trends Plant Sci. — 1999. — 4. — P. 340—347.
 43. Vamling K., Glimelius K. Regeneration of plants from protoplasts of oilseed *Brassica* crops / Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 10: Legumes and Oilseed Crops I. / Ed. Y.P.S. Bajaj — Berlin; New York : Springer Verlag, 1990. — P. 385—417.
 44. Mukhopadhyay N., Tupfer R., Pradhan A.K., Sodhi Y.S., Steinbiss H.-H., Schell J., Pental D. Efficient regeneration of *Brassica oleracea* hypocotyl protoplasts and high frequency genetic transformation by direct DNA uptake // Plant Cell Rep. — 1991. — 10. — P. 375—379.
 45. Radchuk V.V., Ryschka U., Schumann G., Klocke E. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) by direct DNA uptake into mesophyll protoplasts // Physiol. Plant. — 2001. — 114. — P. 429—438.
 46. Karesch H., Bilanz R., Scheid O.M., Potrykus I. Direct gene transfer to protoplasts of *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Rep. — 1991. — 9. — P. 571—574.
 47. Bergman P., Glimelius K. Electroporation of rapeseed protoplasts — transient and stable transformation // Physiol. Plant. — 1993. — 88. — P. 604—611.
 48. Guerche P., de Almeida E.R.P., Schwarztein M.A., Gander E., Krebbers E., Pelletier G. Expression of the 2S albumin from *Bertholletia excelsa* in *Brassica napus* // Mol. Gen. Genet. — 1987. — 221. — P. 306—314.
 49. Jones-Villeneuve E., Huang B., Prudhomme I., Bird S.,

- Kemble R., Hattori J., Miki B. Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rapeseed // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* — 1995. — **40**. — P. 97—100.
50. Neuhaus G., Spangenberg G., Scheid O.M., Schweiger H.G. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids // *Theor. Appl. Genet.* — 1987. — **75**. — P. 30—36.
51. Chen J.L., Beversdorf W.D. A combined use of microprojectile bombardment and DNA imbibition enhances transformation frequency of canola (*Brassica napus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* — 1994. — **88**. — P. 187—192.
52. Bogorad L. Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products // *Trends Biotechnol.* — 2000. — **18**. — P. 257—263.
53. Daniell H., Vivekananda J., Nielsen B.L., Ye G.N., Tewari K.K., Sanford J.C. Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1990. — **87**. — P. 88—92.
54. McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco // *Biotechnol.* — 1995. — **13**. — P. 362—365.
55. Svab Z., Haidukewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1990. — **87**. — P. 8526—8530.
56. Koop H.U., Steinmüller K., Wagner H., Rossler C., Eibl C., Sacher L. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation // *Planta.* — 1996. — **199**. — P. 193—201.
57. O'Neill C., Horvath G.V., Horvath E., Dix P.J., Medgyesy P. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems // *Plant J.* — 1993. — **3**. — P. 729—738.
58. Knoblauch M., Hibberd J.M., Gray J.C., van Bel A.J.E. A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes // *Nature Biotechnol.* — 1999. — **17**. — P. 906—909.
59. Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.-Z., Hajdukewicz P.T.J., Staub J.M., Nehra N.S. Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production // *Plant J.* — 1999. — **19**. — P. 209—216.
60. Khan M.S., Maliga P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants // *Nature Biotechnol.* — 1999. — **17**. — P. 910—915.
61. Sikdar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Rep.* — 1998. — **18**. — P. 20—24.
62. Scott S.E., Wilkinson M.J. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa* // *Nature Biotechnol.* — 1999. — **17**. — P. 390—392.
63. Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S.-B. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome // *Nature Biotechnol.* — 1998. — **16**. — P. 345—348.
64. Flavell R.B. Plant biotechnology R- and D- — the next 10 years // *Trends Biotechnol.* — 1995. — **13**. — P. 313—319.
65. Downey R.K., Rakow G.F.W. Principles of Cultivar Development / Ed. W.R. Fehr. — New York : Mac Millan Publ. Com, 1987. — **2**. — P. 437—486.
66. Chavadej S., Brisson N., McNeil J.N., de Luca V. Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1994. — **91**. — P. 2166—2170.
67. Voelker T.A., Worrel A.C., Anderson L., Bleibaum J., Fan C., Hawkins D.J., Radke S.E., Davies H.M. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants // *Science.* — 1992. — **257**. — P. 72—74.
68. Jones A., Maelor H., Voelker T.A. Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases // *Plant Cell.* — 1995. — **7**. — P. 359—371.
69. Knutzon D.S., Thompson G.A., Radke S.E., Johnson W.B., Knauf V.C., Kridl J.C. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1992. — **89**. — P. 2624—2628.
70. Altenbach S.B., Kuo C.C., Staraci L.C., Pearson K.W., Wainwright C., Georgescu A., Townsend J. Accumulation of Brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine // *Plant Mol. Biol.* — 1992. — **18**. — P. 235—246.
71. Kohnomurase J., Murase M., Ichikawa H., Imamura J. Effects of an antisense napin gene on seed storage compounds in transgenic *Brassica napus* seeds // *Plant Mol. Biol.* — 1994. — **26**. — P. 1115—1124.
72. Kohnomurase J., Murase M., Ichikawa H., Imamura J. Improvement in the quality of seed storage protein by transformation of *Brassica napus* with an antisense gene for cruciferin // *Theor. Appl. Genet.* — 1995. — **91**. — P. 627—631.
73. Falco S.C., Guida T., Locke M., Mauvais T., Sanders C., Ward R.T., Webber P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine // *Biotechnol.* — 1995. — **13**. — P. 577—582.
74. Miki B.L., Labbe H., Hattori J., Ouellet T., Sunohara G., Charest P.J., Iyer V.N. Transformation of *Brassica napus* L. canola cultivars with *Arabidopsis thaliana* acetoxyacid synthase genes and analysis of herbicide resistance // *Theor. Appl. Genet.* — 1990. — **80**. — P. 449—458.
75. Downey R.K., Keller W.A. Modifying oil and protein crop plants: new concepts and approaches // *Proc. Int. Crop Sci. Cong.* / Eds D.R. Buxton, R. Shibles, R.A. Forsberg, B.L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen, R.F. Wilson. — Ames (Iowa), 1993. — P. 655—663.
76. Grison R., Grezes-Besset B., Schneider M., Lucante N., Olsen L., Leguay J.J., Toppa A. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene // *Nature Biotechnol.* — 1996. — **14**. — P. 643—646.

77. Broglie K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P., Knowlton S., Mauvais C.J., Broglie R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* // Science. — 1991. — 254. — P. 1194—1197.
78. Wang Y., Nowak G., Culley D., Hadwiger L.A., Fristensky B. Constitutive expression of pea defense DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*) // Mol. Plant Microbe Interact. — 1999. — 12. P. 410—418.
79. Парашина Е.В., Сердобинский Л.А., Калле Е.Г., Лаврова Н.В., Аветисов В.А., Лукин В.Г., Народицкий Б.С. Генетическая инженерия растений рапса, экспрессирующих ген дефензина редиса // Физиология растений. — 2000. — 47, № 3. — С. 417—424.
80. Herve C., Rouan D., Guerche P., Montane P. Molecular analysis of transgenic rapeseed plants obtained by direct transfer of two separate plasmids containing, respectively, the cauliflower mosaic virus coat protein and a selectable marker gene // Plant Sci. — 1995. — 91. — P. 181—193.
81. Zaccarini B., Cellier F., Boyer J.C., Haenni A.L., Tepfer M. Transgenic plants that express genes including the 3' untranslated region of the turnip yellow mosaic virus (TYMV) genome are partially protected against TYMV infection // Gene. — 1993. — 136. — P. 87—94.
82. Metz T.D., Roush R.T., Tang J.D., Shelton A.M., Earle E.D. Transgenic broccoli expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein: implications for pest resistance management strategies // Mol. Breed. — 1995. — 1. — P. 309—317.
83. Cao J., Zhao J.Z., Tang J.D., Shelton A.M., Earle E.D. Broccoli plants with pyramided cryIAC and cryIC Bt genes control diamondback moth resistant to CryIA and CryIC proteins // Mol. Breed. — 1999. — 5. — P. 131—141.
84. Kuvshinov V.V., Koivu K., Kanerva A., Pehu E. Transgenic crop plants expressing synthetic cry9Aa gene are protected against insect damage // Plant Sci. — 2001. — 160. — P. 341—353
85. Ding L.C., Hu C.Y., Yeh K.W., Wang P.J. Development of insect-resistant transgenic cauliflower plants expressing the trypsin inhibitor gene isolated from local sweet potato // Plant Cell Rep. — 1998. — 17. — P. 854—860.
86. Kanrar S., Venkateswari J., Kirti P.B., Chopra V.L. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.) // Plant Cell Rep. — 2002. — 20. — P. 979—981.
87. Misra S., Gedamu L. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants // Theor. Appl. Genet. — 1989. — 78. — P. 161—168.
88. Aziz A., Larher F. Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stresses // Plant Sci. — 1995. — 112. — P. 175—186.
89. Larher F., Rotival-Garnier N., Lemesle P., Plasman M., Bouchereau A. The glycine betaine inhibitory effect on the osmoinduced proline response of rape leaf discs // Plant Sci. — 1996. — 113. — P. 21—31.
90. Denis M., Delourme R., Gourret J.P., Mariani C., Renard M. Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus* // Plant Physiol. — 1993. — 101. — P. 1295—1304.
91. De Block M., Debrouwer D. Engineered fertility-control in transgenic *Brassica napus* L. — histochemical analysis of anther development // Planta. — 1993. — 189. — P. 218—225.
92. Lee Y.H., Chung K.H., Kim H.U., Jin Y.M., Kim H.I., Park B.S. Induction of male sterile cabbage using a tapetum-specific promoter from *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* // Plant Cell Rep. — 2003. — 22. — P. 268—273.
93. Toriyama K., Stein J.C., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. Transformation of *Brassica oleracea* with an S-locus gene from *Brassica campestris* changes the self-incompatibility phenotype // Theor. Appl. Genet. — 1991. — 81. — P. 769—776.
94. Rooijen G.J.H. van, Moloney M.M. Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins // Biotechnol. — 1995. — 13. — P. 72—77.
95. Slater S., Mitsky T.A., Houmiel K.L., Hao M., Reiser S.E., Taylor N.B., Tran M., Valentin H.E., Rodriguez D.J., Stone D.A., Padgett S.R., Kishore G., Gruys K.J. Metabolic engineering of Arabidopsis and Brassica for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production // Nature Biotechnol. — 1999. — 17. — P. 1011—1021.
96. Vandekerckhove J., Damme J.V., Lijsebettens V., Botterman J., Block M. de, Vandewiele M., Clercq A.D., Leemans J., Montague M. van, Krebbers E. Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins // Biotechnol. — 1989. — 7. — P. 929—932.
97. Metz P.L.J., Nap J.P. A transgene-centred approach to the biosafety of transgenic crops: overview of selection and reporter genes // Acta Bot. Neerl. — 1997. — 46. — P. 25—50.
98. Ruibal-Mendieta N.L., Lints F.A. Novel and transgenic food crops: overview of scientific versus public perception // Transgen. Res. — 1998. — 7. — P. 379—386.
99. Yzhan S., Firek S., Draper J. Can elimination of the protein products of selectable marker genes in transgenic plants allay public anxieties? // Trends Biotechnol. — 1993. — 11. — P. 219.
100. Puchta H. Marker-free transgenic plants // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 2003. — 74. — P. 123—134.
101. Goldsbrough A.P., Lastrella C.N., Yoder J.I. Transformation system for generating marker-free transgenic plants // Biotechnol. — 1993. — 11. — P. 1286—1292.
102. 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. — 17. — P. 489—496.
103. Новожилов О.В., Блом Я.Б. Критерії оцінки екологічного ризику вертикального переносу генів при використанні трансгенних рослин // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть / Під.

- ред. В.В. Моргуна. — К.: Логос, 2001. — Т. I. — С. 501—519.
104. Kling J. Agricultural ecology — could transgenic supercrops one day breed superweeds? // Science. — 1996. — **274**. — P. 180—181.
 105. James C. Global review of commercialized transgenic crops: 2000. ISAA Briefs, 2000, № 21: Preview. ISAAA: Ithaca, NY.
 106. Chamberlain D., Stewart C.N. Transgene escape and transplastomics // Nature Biotechnol. — 1999. — **17**. — P. 330—331.
 107. Chevre A.M., Eber F., Baranger A., Renard M. Gene flow from transgenic crops // Nature. — 1997. — **389**. — P. 924.
 108. Scheffler J.A., Parkinson R., Dale P.J. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) // Transgen. Res. — 1993. — **2**. — P. 356—364.
 109. Nishiyama I., Inomata N. Embryological studies on cross-incompatibility between 2x and 4x in *Brassica* // Jap. J. Genet. — 1966. — **41**. — P. 27—42.
 110. Johnston S.A., Nijs T.P.M. den, Peloquin S.J., Hanne-man R.E. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses // Theor. Appl. Genet. — 1980. — **57**. — P. 5—9.
 111. Jorgensen R.B., Andersen B. Spontaneous hybridisation between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *Brassica campestris* (*Brassicaceae*) — a rise of growing genetically-modified oilseed rape // Amer. J. Bot. — 1994. — **81**. — P. 1620—1626.
 112. Mikkelsen T.R., Jensen J., Jorgensen R.B. Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RAPD markers in a backcross progeny with *Brassica campestris* // Theor. Appl. Genet. — 1996. — **92**. — P. 492—497.
 113. Morinaga T. On the chromosome number of *Brassica juncea* and *Brassica napus*, on the hybrid between the two and on offspring line of the hybrid // Jap. J. Genet. — 1934. — **9**. — P. 161.
 114. U N., Nagamatu T. On the difference between *Brassica campestris* L. and *B. napus* L. in regard to fertility and natural crossing. 1. Fertility under different modes of pollination // J. Imper. Agric. Stat. Nishigahara (Tokyo). — 1933. — **2**. — P. 113—128.
 115. U N. Genomic analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization // Jap. J. Bot. — 1935. — **7**. — P. 389—452.
 116. Евтушенко Ю.В., Кунах В.А., Блюм Я.Б. Оценка риска вертикального переноса генов при культивировании генетически модифицированных сортов рапса в Украине // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: Материалы II Международ. науч. конф. — М., 2000. — С. 144—145.
 117. Frello S., Hansen K.R., Hensen J., Jorgensen R.B. Inheritance of rapeseed (*Brassica napus*) specific RAPD markers and transgene in the cross *Brassica juncea* × (*Brassica juncea* × *Brassica napus*) // Theor. Appl. Genet. — 1995. — **91**. — P. 236—241.
 118. Roy N.N. Species crossability and early generation plant fertility in interspecific crosses of *Brassica* // SABRAO J. — 1980. — **12**. — P. 43—53.
 119. Rubbelen G. Beobachtungen bei interspezifischen *Brassica* — Kreuzungen, insbesondere über die Entstehung matromorpher F1 — Pflanzen // Angewandte Bot. — 1966. — **39**. — P. 205—221.
 120. Yamagishi H., Takayanagi I. Cross-compatibility of Hakuran (artificially synthesized *Brassica napus*) with *Brassica* vegetables // Cruciferae Newslett. — 1982. — **7**. — P. 34—35.
 121. Fernandez-Escobar J., Dominguez J., Martin A., Fernandez-Martinez J.M. Genetics of the erucic acid content in interspecific hybrids of Ethiopian mustard (*Brassica carinata* Braun) and rapeseed (*B. napus* L.) // Plant Breed. — 1988. — **100**. — P. 310—315.
 122. Heyn F.W. Analysis of unreduced gametes in the *Brassicaceae* by crosses between species and ploidy levels // Z. Pflanzenzucht. — 1977. — **78**. — P. 13—30.
 123. Eber F., Chevre A.M., Baranger A., Vallee P., Tanguy X., Renard M. Spontaneous hybridization between a male-sterile oilseed rape and 2 weeds // Theor. Appl. Genet. — 1994. — **88**. — P. 362—368.
 124. Lefol E., Fleury A., Darmency H. Gene dispersal from transgenic crops. 2. Hybridization between oilseed rape and the wild hoary mustard // Sex. Plant Reprod. — 1996. — **9**. — P. 189—196.
 125. Lefol E., Seguinswart G., Downey R.K. Sexual hybridization in crosses of cultivated *Brassica* species with the crucifers *Erucastrum gallium* and *Raphanus raphanistrum* — potential for gene introgression // Euphytica. — 1997. — **95**. — P. 127—139.
 126. Ringdahl E.A., McVetty P.B.E., Sernyk J.L. Intergenic hybridisation of *Diploaxis* spp. with *Brassica napus* — a source of new cms systems // Can. J. Plant. Sci. — 1987. — **67**. — P. 239—243.
 127. Chrungu B., Verma N., Mohanty A., Pradhan A., Shivann K.R. Production and characterization of interspecific hybrids between *Brassica maurorum* and crop brassicas // Theor. Appl. Genet. — 1999. — **98**. — P. 608—613.
 128. Kerlan M.C., Chevre A.M., Eber F., Baranger A., Renard M. Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species. 1. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization // Euphytica. — 1992. — **62**. — P. 145—153.
 129. Metz P.L.J., Jacobsen E., Nap J.P., Pereira A., Stiekema W.J. The impact of biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa* × *B. napus* hybrids and their successive backcrosses // Theor. Appl. Genet. — 1997. — **95**. — P. 442—450.
 130. Ripley V.L., Amison P.G. Hybridization of *Sinapis alba* L. and *Brassica napus* L. via embryo rescue // Plant Breed. — 1990. — **104**. — P. 26—33.
 131. Chevre A.M., Eber F., Darmency H., Fleury A., Picault H., Letanneur J.C., Renard M. Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions // Theor. Appl. Genet. — 2000. — **100**. — P. 1233—1239.

132. Kuvshinov V.V., Koivu K., Kanerva A., Pehu E. Molecular control of transgene escape from genetically modified plants // *Plant Sci.* — 2001. — **160**. — P. 517—522.
133. Curtis I.S., Nam H.G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method — plant development and surfactant are important in optimising transformation efficiency // *Transgen. Res.* — 2001. — **10**. — P. 363—371.
134. Ponstein A.S., Bade J.B., Verwoerd T.C., Molendijk L., Storms J., Beudeker R.F., Pen J. Stable expression of phytase (*phyA*) in canola (*Brassica napus*) seeds: towards a commercial product // *Mol. Breed.* — 2002. — **10**. — P. 31—44.
135. Cardoso V., Stewart C.N. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyls explants // *Plant Cell Rep.* — 2003. — **21**. — P. 599—604.

Поступила 31.08.04