

Л.А. САХНО, Е.А. ГОЧЕВА,
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины
03143, Киев, ул. Акад. Заболотного, 148
E-mail: iicb@iicb.kiev.ua

СТАБИЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БЕСПРОМОТОРНОГО ГЕНА *bar* В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЯХ РАПСА



Фосфинотрицинустойчивые растения двух промышленных яровых сортов рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) получены путем *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации листовых дисков. Векторные конструкции содержали беспромоторную кодирующую последовательность гена фосфинотрицинацетилтрансферазы (*bar*), которая была размещена между двумя инвертированными *lox*-сайтами (элементы системы *Cre/lox* рекомбинации фага P1), и селективный ген неомицинофосфотрансферазы II (*nptII*). Наличие в геноме полученных растений введенных генов подтверждено с помощью ПЦР. Показано их стабильное и сцепленное наследование в поколениях T₁ и T₂.

© Л.А. САХНО, Е.А. ГОЧЕВА, И.К. КОМАРНИЦКИЙ,
Н.В. КУЧУК, 2008

Введение. Рапс возделывается более чем в 50 странах мира, основные посевные площади сосредоточены в Китае, Канаде, Индии, Германии, Франции. Мировой сбор семян этой культуры в 2003 г. составил 36146 тыс. тонн (FAO).

По количеству производимого растительного масла рапсу принадлежит третье место в мире после сои и хлопчатника [1]. В Украине он является второй по значению масличной культурой (вслед за подсолнечником), посевные площади увеличиваются, начиная с 1997 г., и в 2005 г. составили более 400 тыс. га. Создание новых высокопродуктивных сортов этой культуры не может обойтись без достижений в области генетической инженерии.

Эксперименты по трансформации рапса в мире проводятся в нескольких направлениях.

1. Улучшение качества и соотношения жирных кислот в масле семян. Получены сорта: а) со значительно уменьшенным количеством глюкозинолатов (до 97 % по сравнению с контролем) [2]; б) накапливающие до 50 % только лауриловой кислоты [3]; в) с повышенным (до 30 %) содержанием стеариновой кислоты [4].

2. Улучшение кормовых качеств семян. Получены растения с увеличенным накоплением в семенах лизина [5].

3. Улучшение сельскохозяйственных характеристик. Получены растения, устойчивые к гербицидам [6], грибковым патогенам [7], вирусам [8].

4. Конструирование мужской стерильности и самосовместимости. Получены линии рапса с признаком мужской стерильности [9, 10].

Целью нашей работы было получение растений рапса, устойчивых к фосфинотрицину (действующему веществу гербицида BASTA), с использованием векторов, содержащих элементы системы *Cre/lox* рекомбинации фага P1, поскольку было показано, что при размещении *lox*-сайта в генетических конструкциях в непосредственной близости к правой границе T-ДНК происходит стабильная экспрессия (с частотой до 80 %) следующего за *lox*-сайтом беспромоторного гена *bar* [11].

Материалы и методы. *Растительный материал.* В качестве исходного материала использовали семена ярового рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) двух промышленных сортов — Калиновский селекции Национального аграрного университета, любезно предоставленные

акад. В.Ф. Пересыпкиным, и ВНИС 100, полученные от д-ра биол. наук Ф.Н. Пария.

***Agrobacterium tumefaciens*-опосредованная трансформация рапса.** В экспериментах по трансформации использовали листья 3–4-недельных растений, выращенных в асептических условиях (температура 24 °С, освещенность 4000–5000 лк при 16/8 (свет/темнота) фотопериоде). За 3–4 сут до инфицирования экспланты насаживали и помещали для инициации каллуса на поверхность агаризованной среды MS [12], дополненной 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 0,1 мг/л БАП и 0,1 мг/л кинетина (среда I, табл. 1). Кроме того, среда I содержала 1 г/л тиосульфата натрия в качестве агента, увеличивающего восприимчивость растительных тканей к агробактерии и таким образом повышающего эффективность трансформации [13]. В подготовленной агробактериальной суспензии экспланты нарезали на сегменты размером приблизительно 0,3–0,5 × 0,3–0,5 см и выдерживали, периодически перемешивая, в течение получаса. Затем, подсушив фильтровальной бумагой, переносили их в те же чашки Петри, где проходило прекультивирование. Сокультивирование продолжалось в течение 2 сут на свету в условиях термальной комнаты [14]. После этого экспланты отмывали от избытка агробактерий жидкой средой II, подсушивали и переносили на агаризованную среду II (табл. 1) с тиосульфатом серебра (5 мг/л) и цефотаксими-

мом (500 мг/л) для элиминации бактерий и роста каллуса. Через 5–7 сут культивирования в условиях термостата (24 °С) их пассировали на среду того же состава, но с добавлением 5 мг/л фосфинотрицина (PPT) в качестве селективного агента. Формирование каллуса при этом продолжалось на рассеянном свету в течение последующих 7–10 дней. Для регенерации использовали среду MS с добавлением 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатина, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НУК и 1 мг/л ГК (среда III, табл. 1), 250 мг/л цефотаксима и 5 мг/л PPT. Спустя еще 3 нед сформировавшиеся зеленые побеги пересаживали на безгормональную среду MS, дополненную 5 мг/л PPT, а остальные каллусы пассировали снова на регенерационную среду того же состава. Полученные растения выращивали на безгормональной агаризованной среде MS с 10 мг/л PPT. Формирование корней проходило в этих условиях без дополнительной инициации.

Плазмиды и бактериальный штамм. Для трансформации использовались плазмиды pICH 3744, pICH 3737, pICH 9414. Векторные конструкции были любезно предоставлены компанией Icon Genetics GmbH (Германия). Кроме селективного гена неомицинфосфотрансферазы II (*nptII*), они содержали кодирующую последовательность гена устойчивости к фосфинотрицину (гена *bar*) и независимый 35S промотор, которые были размещены между двумя инвертированными *lox*-сайтами (рис. 1). Общую схему конструкций можно представить как RB-*lox*-*bar*-35S-*lox*-*nptII*. Плазмиды pICH 3744 и pICH 9414 содержали дополнительный *loxA*(*loxP*) сайт, находящийся в прямой ориентации по отношению к другому *loxA*(*loxP*) сайту.

Суспензию *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101) наращивали в 20 мл жидкой среды LB [15], дополненной 50 мг/л карбенициллина и 100 мг/л рифампицина, на качалке (180 об/мин) в течение 24 ч при 24 °С в темноте. Затем агробактериальную суспензию разбавляли в три раза средой II и инкубировали в тех же условиях в течение 3–4 ч. Полученную суспензию использовали для инфицирования.

Анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Интеграцию чужеродных генов в растительный геном определяли с помощью

Таблица 1
Состав сред, использованных в экспериментах по трансформации рапса

Компоненты, мг/л	Среда		
	I	II	III
Сахароза	30 000	30 000	10 000
Инозитол	300	300	100
Гидролизат казеина	300	300	—
2,4-Д	2	2	—
НУК	1	1	1
Кинетин	0,1	0,1	—
БАП	0,1	0,1	2
АБК	—	—	1
Зеатин	—	—	1
ГК	—	—	1
Тиосульфат Na	1000	—	—

Примечание. Основой являлась среда MS.

ПЦР. Тотальную ДНК из предположительно трансгенных растений выделяли из листовой ткани согласно методике, предложенной Cheung et al. [16]. Для реакции использовали 40 нг ДНК растительного образца, по 0,5 мкМ соответствующих праймеров, по 200 мкМ каждого из трифосфатов, 1 ед. *Taq* ДНК-полимеразы, ПЦР реакционный буфер, который содержал 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 9 при 25 °C), 0,1 % Triton X-100 и 2 мМ MgCl₂. Общий объем смеси равнялся 20 мкл. Для идентификации гена *nptII* использовали праймеры 5'-GAGGC TATTCGGCTATGACTG-3' и 5'-CAAGCTCTT CAGCAATATCACG-3', амплифицирующие фрагмент величиной 622 п.н. [17]. Наличие в геноме регенерантов кодирующей последовательности гена *bar* подтверждали, используя праймеры 5'-ATGAGCCCAGAACGACGCCG CC-3' и 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGG AC-3', дающие фрагмент величиной 551 п.н. Изолированная ДНК из нетрансформированных растений (отрицательный контроль) и 1 нг плазмидного вектора pICH 3744 (положительный контроль) были амплифицированы с теми же праймерами и при тех же условиях. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик ИМ02» (фирма «ДНК-технология», Москва). Использовали следующие профили: для гена *nptII* – 94 °C – 1 мин, 35 циклов: 94 °C – 1 мин, 60 °C – 1 мин, 72 °C – 45 с, затем 4 мин при 72 °C; для гена *bar* – 94 °C – 1 мин, 35 циклов: 94 °C – 1 мин, 60 °C – 1 мин, 72 °C – 30 с, затем 4 мин при 72 °C. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле в трис-ацетатной буферной системе.

Статистическая обработка результатов. Частоту трансформации определяли как отношение числа полученных растений к общему количеству эксплантов, эффективность транс-

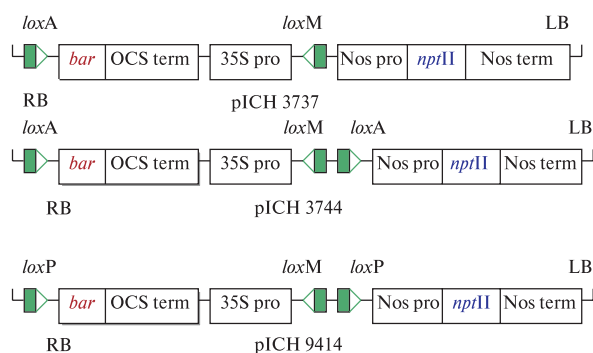


Рис. 1. Схемы конструкций, использованных в экспериментах: LB – левая граница Т-ДНК, RB – правая граница Т-ДНК, *bar* – кодирующая часть гена фосфинотрицинацетилтрансферазы, *nptII* – ген неомизинфосфотрансферазы II, *loxA*, *loxM*, *loxP* – сайты специфической рекомбинации

формации рассчитывали как отношение числа трансгенных растений к общему количеству растений, полученных при трансформации.

Для определения достоверности расщепления в первом поколении трансформантов использовали стандартный критерий χ^2 .

Результаты исследований и их обсуждение. В результате экспериментов получено 88 независимых, устойчивых к фосфинотрицину линий рапса двух промышленных яровых сортов (табл. 2).

В качестве эксплантов мы использовали прекультивированные листовые пластинки растений рапса, выращенных в асептических условиях. Регенерация наблюдалась спустя 4–5 нед после начала эксперимента (рис. 2) в условиях селективного давления фосфинотрицина (5 мг/л). Спустя еще 7–14 сут устойчивые побеги формировались полностью (рис. 3). При переносе на безгормональные среды укоренение регенерантов происходило без дополнительной индукции в течение последующих 2–3 не-

Таблица 2

Эффективность регенерации и трансформации листовых эксплантов рапса

Сорт	Вектор	Количество				Частота трансформации	Эффективность трансформации
		эксплантов	регенерантов	устойчивых к РРТ	трансгенных (ПЦР+)		
Калиновский	pICH 3744	210	22	19	19	9	86,3
ВНИС 100	pICH 3737	640	70	51	50	8	72,8
ВНИС 100	pICH 9414	200	24	18	18	9	75,0

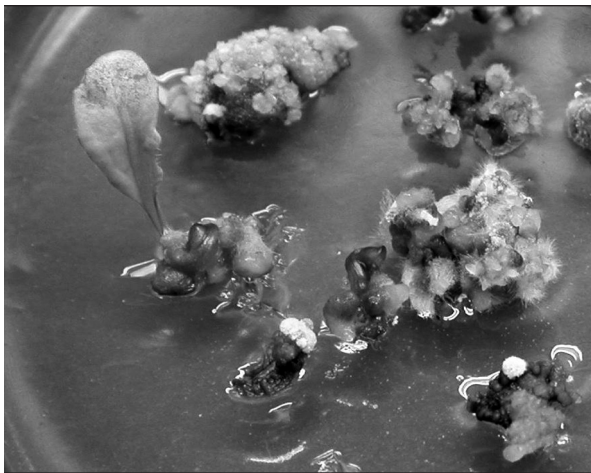


Рис. 2. Начало регенерации из листовых дисков рапса сорта ВНИС 100, инфицированных *A. tumefaciens* pICH 3737

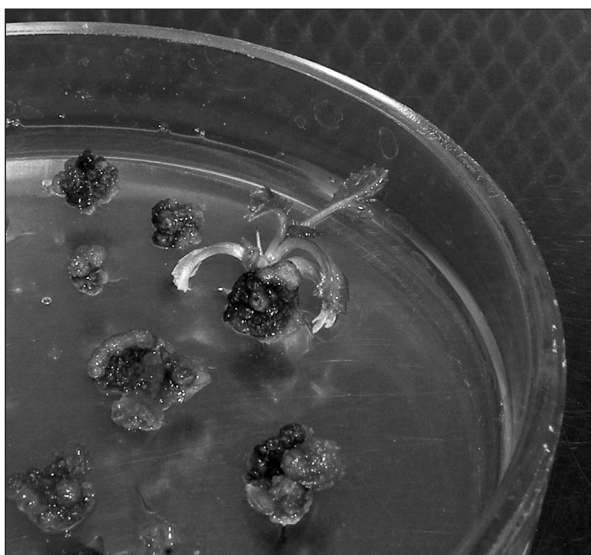


Рис. 3. Сформированный побег рапса на селективной регенерационной среде (10 мг/л фосфинотрицина)

дель. Наблюдаемые различия в эффективности регенерации и трансформации у использованных сортов были незначительными (табл. 2).

В экспериментах по трансформации рапса используют различные виды эксплантов. Чаще всего инфицировали гипокотили проростков, поскольку они имеют высокий регенерационный потенциал и их легко получать в достаточном количестве [18–24]. Высокой эффективности трансформации рапса, используя в качестве эксплантов черешки 4–6-суточных

котиленонов, добились Moloney et al. [25], Hong et al. [26], Damgaard et al. [20], Li et al. [27]. Микроспоры как экспланты для трансформации привлекали возможностью получения гомозиготных трансформантов, у которых можно изучать рецессивные аллели [28–30]. Сокультивированию с агробактерией подвергали междоузлия растений, выращенных в теплице и достигших стадии формирования соцветий [18, 31], а также протопласты, выделенные из гипокотилей [32] и мезофилла [33]. Использование нами листовых дисков культивируемых *in vitro* растений позволило получить трансформанты рапса с приемлемой частотой (~ 9 %) и эффективностью (~70–85 %) за довольно короткое время (появление первых регенерантов наблюдали спустя 7–8 нед с момента начала экспериментов, на получение основного количества укорененных растений затрачивалось 3–3,5 мес). К преимуществам указанного подхода можно отнести исключение необходимости стерилизации исходного материала перед постановкой каждого опыта и возможность работы с более однородной в генетическом отношении популяцией клеток, чем в случае использования гипокотилей проростков.

Одним из определяющих моментов в проведении экспериментов мы считаем прекультивирование эксплантов на среде для каллусообразования, что приводит к подготовке растительной ткани к инфицированию и в то же время позволяет ей легче пережить обработку агробактерией. Как показали наши предварительные исследования, использование листовых дисков без прекультивирования либо прекультивирование их в течение 1–2 сут было неэффективным и приводило к практически полной гибели растительных тканей. Прекультивирование эксплантов давало положительные результаты и в экспериментах Mukhopadhyay et al. [34], Radke et al. [35], Радчук и др. [22]. В некоторых работах авторы указывают на нецелесообразность такого шага, отмечая, что хотя и усиливается образование каллуса на эксплантах, но полностью ингибируется морфогенез [36]. Возможно, такая ситуация характерна только для определенного вида эксплантов (были использованы междоузлия 6–8-недельных растений рапса из асептической культуры),

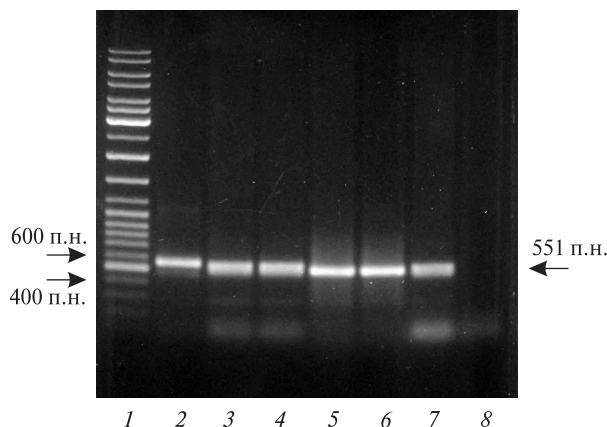


Рис. 4. ПЦР-анализ totalной ДНК рапса с праймерами, комплементарными гену *bar* (размер фрагмента – 551 п.н.): 1 – маркер; 2–3 – линии 2 и 15, трансформированные вектором pICN 3744; 4 – линия 22, трансформированная конструкцией pICN 9414; 5, 6 – линии 57 и 66, трансформированные вектором pICN 3737; 7 – положительный контроль, ДНК плазмиды pICN 3744; 8 – отрицательный контроль, ДНК исходного растения

либо на конечный результат повлияло и выращивание самих исходных растений на среде, содержащей регуляторы роста.

Наличие генов *nptII* (результаты не представлены) и *bar* (рис. 4) в регенерированных линиях подтверждено с помощью ПЦР-анализов.

Листовые диски полученных растений тестировали на устойчивость к канамицину

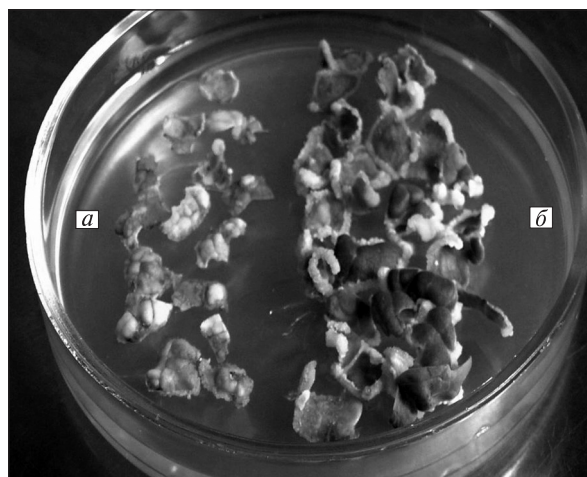


Рис. 5. Тест на устойчивость к канамицину листовых дисков рапса сорта Калиновский (три недели после начала тестирования): а – контроль, б – линия 3744/2

(100 мг/л в среде для каллусообразования) (рис. 5). Результаты тестирования коррелировали с результатами ПЦР.

Растения-трансформанты легко адаптировались к условиям закрытого грунта. Девять линий растений T_0 сорта Калиновский, полученные в результате экспериментов с векторной конструкцией pICN 3744, были высажены в почву в условиях теплицы. Они имели нормальную морфологию вегетативных и, в подавляющем большинстве, генеративных орга-

Таблица 3

Характеристика T_1 и T_2 поколений трансформированных линий рапса (сорт Калиновский, вектор pICN 3744)

Линия	Масса 100 семян, мг	Всхожесть <i>in vitro</i> , %	Количество растений		Расщепление	χ^2
			устойчивых к РРТ	не устойчивых к РРТ		
Vn5/44/1, T_1	278	94	72	22	3 : 1	0,13
Vn5/44/2, T_1	284	88	69	19	3 : 1	0,55
Vn5/44/5, T_1	280	84	66	18	3 : 1	0,57
Vn5/44/11, T_1	278	100	78	22	3 : 1	0,48
Vn5/44/15, T_1	281	98	72	26	3 : 1	0,12
Vn5/44/17, T_1	276	81	62	19	3 : 1	0,15
Vn5/44/19, T_1	280	90	68	22	3 : 1	0,01
Vn5/44/1, T_2	279	90	90	–	–	–
Vn5/44/2, T_2	284	86	86	–	–	–
Калиновский (контроль)	310	90	–	90	–	–

Примечание. Проращивали по 100 семян каждой линии.

нов. Цветки семи из девяти трансформированных линий рапса не отличались от контрольных, у двух линий было отмечено явление гетеростилии — удлинённый пестик и укороченные тычинки. При самоопылении у линий Вп/44/1, Вп/44/2, Вп/44/5, Вп/44/11, Вп/44/15, Вп/44/17 и Вп/44/19 завязались жизнеспособные семена (табл. 3). Подобные результаты были получены в работах Радчука и др. [22], Cardoza et al. [37], Wang et al. [38, 39]. Следует также отметить, что результаты наших исследований в некоторой степени отличаются от полученных в экспериментах Ралдугиной и др. [36], где все растения T_0 имели аномалии в строении цветков, и только для одного из семи клонов удалось получить четыре нормальных семени при принудительном самоопылении. Авторы предполагали, что наблюдаемая ими комплексная стерильность трансформантов вызвана нарушением гормонального баланса полученных растений. Возможно, в наших опытах условия проведения трансформации не оказали такого мощного дезорганизующего воздействия на растительную систему, либо проявились сортовые особенности генотипов, вовлечённых в эксперименты.

Семена, полученные при самоопылении первичных трансформантов, проращивали в асептических условиях и тестировали на устойчивость к фосфинотрицину. Наблюдаемое расщепление по экспрессии введённого гена *bar* в условиях *in vitro* составило приблизительно 3 : 1 (табл. 3). Это свидетельствует о том, что в указанных растениях находится одна копия перенесённого гена *bar*.

Семена трансформантов отличались всхожестью в условиях *in vitro*, сравнимой с семенами контрольных растений (табл. 3).

В поколении T_2 все потомки сохраняли устойчивость к РРТ. Результаты тестирования на устойчивость к РРТ у проростков T_1 и T_2 коррелировали с результатами ПЦР-анализов. У этих растений сохранялась способность расти на средах с канамицином. Таким образом, введённые гены (*nptII* и *bar*) наследовались стабильно и сцепленно.

В ходе работы были отобраны устойчивые к фосфинотрицину линии рапса, которые характеризовались наличием в своем геноме кодирующей последовательности гена *bar*. Подобные

результаты при трансформации табака [40] и сахарной свеклы [41] были получены ранее. Кроме того, было показано, что беспромоторный ген *bar* экспрессируется благодаря оригинальному расположению в конструкции, а именно между двумя инвертированными *lox*-сайтами в непосредственной близости к правой границе T-ДНК [11]. Введённые в геном рапса гены *nptII* и *bar* сохраняют свою активность в последующих поколениях (T_1 , T_2). Полученные растения могут быть вовлечены в селекционные программы, а предложенную методику трансформации можно использовать в последующих экспериментах. При замене в конструкции кодирующей последовательности гена *bar* на соответствующую последовательность другого необходимого гена можно ожидать экспрессии последнего с достаточно высокой частотой.

SUMMARY. Phosphinothricin resistant plants of two rapeseed (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) spring industrial cultivars were obtained by *Agrobacterium tumefaciens* leaf disk transformation. Vector constructions contained the promoterless coding sequence of phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) gene located between two inverted *lox*-sites (elements of Cre/*lox* recombination system of P1 phage) and selective neomycinphosphotransferase II gene (*nptII*). Integration of the alien genes was confirmed by the PCR analyses. Stable and linked inheritance of foreign genes in T_1 and T_2 progeny was shown.

РЕЗЮМЕ. Рослини двох промислових сортів ріпака (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.), які є стійкими до фосфінотрицину, отримано шляхом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації листових дисків. Векторні конструкції несли безпромоторну кодуючу послідовність гена фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*), яка була розташована між двома інвертованими *lox*-сайтами (елементи системи Cre/*lox* рекомбінації фага P1), і селективний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*). Наявність в геномі отриманих рослин введених генів підтверджено за допомогою ПЛР. Показано їх стабільне та зчеплене успадкування у поколіннях T_1 і T_2 .

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Production of selected agricultural commodities, Group II* (2003) — <http://faostat.fao.org/faostat>
2. Chavadej S., Brisson N., McNeil J.N., Luca V. Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1994. — **91**. — P. 2166–2170.
3. Voeker 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.
4. 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 stearyl-acyl carrier protein desaturase gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1992. — **89**. — P. 2624–2628.
 5. 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.
 6. Carpenter J., Gianessi L. Herbicide use on roundup ready crops [Letter] // Science. — 2000. — **287**, № 5454. — P. 803.
 7. Grison R., Grezes-Beset B., Schneider M., Lucante N., Olsen L., Leguay J.J., Toppan A. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene // Nature Biotechnol. — 1996. — **14**. — P. 643–646.
 8. Herve C., Rouan D., Guerche P., Montane M.H. Molecular analysis of transgenic rapeseed plants obtained by direct gene transfer of two separate plasmids containing, respectively, the cauliflower mosaic virus coat protein gene and a selectable marker gene // Plant Sci. — 1993. — **91**. — P. 181–193.
 9. Denis M., Delourme R., Gourret J.P., Mariani C., Renard M. Expression of engineering nuclear male sterility in *Brassica napus* // Plant Physiol. — 1993. — **101**. — P. 1295–1304.
 10. De Block M., Debrouwer D. Engineered fertility control in transgenic *Brassica napus* L. — histochemical analysis of anther development // Planta. — 1993. — **189**. — P. 218–225.
 11. Щербак Н.Л., Белокурова В.Б., Гецко И.О., Комарницкий И.К., Кучук Н.В. Изучение влияния *lox*-сайтов Cre-*lox* системы рекомбинации на экспрессию беспромоторного *bar* гена в трансгенных растениях // Цитология и генетика. — 2006. — **40**, № 1. — С. 3–9.
 12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473–497.
 13. Olhoft P.M., Lin K., Galbraith J., Neilsen N.C., Somers D.A. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells // Plant Cell Rep. — 2001. — **20**. — P. 731–737.
 14. Zambre M., Terryn N., De Clercq J., De Buck S., Dillen W., van Montagu M., Van Der Straeten D., Angenon G. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells // Planta. — 2003. — **216**. — P. 580–586.
 15. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 521 с.
 16. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // PCR Meth. Appl. — 1993. — **3**. — P. 69–70.
 17. Demeke T., Huel P., Baga M., Caswell K., Leung N., Chibbar R.N. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat // Theor. Appl. Genet. — 1999. — **99**, № 9. — P. 947–953.
 18. Fry J., Barnason A., Horsch K.B. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors // Plant Cell Rep. — 1987. — **6**, № 5. — P. 321–326.
 19. Гурвич А.М., Черен Н.Н., Скаржинская М.В., Головки А.Э., Глеба Ю.Ю. Генетическая трансформация рапса *Brassica napus* L. с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Цитология и генетика. — 1995. — **29**, № 2. — P. 20–25.
 20. Damgaard O., Jensen L.H., Rasmussen O.S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars // Transgen. Res. — 1997. — **6**, № 4. — P. 279–288.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Babwah A.V., Wandell C.S. Cytosine deaminase as a substrate-dependent negative selectable marker in *Brassica napus* // Theor. Appl. Genet. — 2000. — **100**, № 5. — P. 802–809.
 24. Phogat S.K., Burma P.K., Pental D. High frequency regeneration of *Brassica napus* varieties and genetic transformation of stocks containing fertility restorer genes for two cytoplasmic male sterility systems // J. Plant Biochem. and Biotechnol. — 2000. — **9**, № 2. — P. 73–79.
 25. Moloney M.M., Walker J.M., Sharma K.K. High efficiency transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium* vectors // Plant Cell Rep. — 1989. — **8**. — P. 238–242.
 26. Hong H.P., Gerster L.J., Datla R. S. S., Albani D., Scoles G., Keller W., Robert L. S. The promoter of a *Brassica napus* polygalacturonase gene directs pollen expression of β -glucuronidase in transgenic *Brassica* plants // Plant Cell Rep. — 1997. — **16**, № 6. — P. 373–378.
 27. Li X., Qin M., Zhen S., Dong W., Bai R. Transgenic plants of *Brassica napus* and *Brassica juncea* tolerant to pest insects and analysis of the progeny // Abstracts of 5th International Congress of Plant Molecular Biology. — Singapore, 1997. — P. 1421.
 28. Pechan P.M. Successful cocultivation of *Brassica napus* microspores and proembryos with *Agrobacterium* // Plant Cell Rep. — 1989. — **8**. — P. 387–390.

29. Swanson E.B., Eriksson L.R. Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens* // Theor. Appl. Genet. – 1989. – **78**. – P. 831–835.
30. Huang B. Genetic manipulation of microspores and microspore-derived embryos // In Vitro Cell Dev. Biol. – 1992. – **28**. – P. 53–58.
31. Pua E.C., Mehra-Palta A., Nagy F., Chua N.-H. Transgenic plants of *Brassica napus* L. // Biotechnology. – 1987. – **5**, № 8. – P. 815–817.
32. Thomzik J.E., Hain R. Transgenic *Brassica napus* plants obtained by cocultivation of protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. – 1990. – **9**, № 5. – P. 233–236.
33. Sacristan M.D., Gerdemann-Knorck M., Schieder O. Incorporation of hygromycin resistance in *Brassica nigra* and its transfer to *Brassica napus* through asymmetric protoplast fusion // Theor. Appl. Genet. – 1989. – **78**, № 2. – P. 194–200.
34. Mukhopadhyay N., Arumugam N., Nandakumar P.B.A., Pradhan A.K., Gupta V., Pental D. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration // Plant Cell Rep. – 1991. – **11**. – P. 506–513.
35. Radke S.E., Andrews B.M., Moloney M.M., Croch M.L., Kridl J.C., Knauf V.C. Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of reintroduced napin gene // Theor. Appl. Genet. – 1988. – **75**, № 5. – P. 685–694.
36. Ралдугина Г.Н., Горелова С.В., Кожемякин А.В. Стабильность и наследование трансгенов в растениях рапса // Физиология растений. – 2000. – **47**, № 3. – С. 437–445.
37. Cardoza V., Stewart C.N. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants // Plant Cell Rep. – 2003. – **21**. – P. 599–604.
38. Wang Y., Nowak G., Culley D., Hadwiger L.A., Fristensky B. Constitutive expression of pea defence gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*) // Mol. Plant Microbe Int. – 1999. – **12**. – P. 410–418.
39. 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.
40. Щербак Н.Л., Белокурова В.Б., Комарницкий И.К., Кучук Н.В. Генетическая трансформация растений *Nicotiana africana* Мерхт. плазмидами, содержащими сайты рекомбинации *lox* // Цитология и генетика. – 2004. – **38**, № 4. – С. 3–8.
41. Кищенко О.М., Комарницкий И.К., Кучук М.В. Генетично-модифіковані цукрові буряки // Генетичні ресурси для адаптивного рослинництва: мобілізація, інвентаризація, збереження, використання: Тези доп. Міжнарод. наук.-практ. конф. – Оброшино, 2005. – С. 214.

Поступила 30.01.07