

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*, РЕГЕНЕРАЦИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РЫЖИКА ПОСЕВНОГО (*CAMELINA SATIVA*)

Представлены результаты по введению в культуру *in vitro*, регенерации и укоренению побегов у сортообразца Пэрэможець и сорта Мираж рыжика посевного (*Camelina sativa*). Установлены эффективные концентрации стерилизующих агентов, время обработки ими растительного материала при введении в культуру *in vitro*, определено соотношение концентраций регуляторов роста, изучено влияние количества сахарозы, тип и возраст экспланта на индукцию образования побегов *C. sativa*, а также установлена концентрация нафтилуксусной кислоты, вызывающая ризогенез у полученных побегов. Разработан метод *Agrobacterium*-опосредуемой трансформации рыжика с использованием бинарного вектора *pGH217*, несущего репортерный ген β -глюкуронидазы (*gus*) под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и *nos*-терминатора, а также селективный маркерный ген *hpt*, обеспечивающий устойчивость к гигромицину у трансформантов.

Введение. Рыжик посевной (*Camelina sativa* (L.) Crantz) – недостаточно используемый представитель семейства *Brassicaceae*, к которому в последнее время возродился интерес из-за уникального состава жиров, содержащихся в его семенах. Ранее результаты археологических исследований показали, что это растение культивировали в Европе еще во времена бронзового века [1], где его, вероятно, использовали как важную масличную культуру. В основном он был распространен по всей территории Европы как сорняк, и до середины XX века использовался в сельском хозяйстве лишь в незначительных масштабах, в том числе на Балканах и в Украине. Теперь рыжик рассматривается в качестве одного из видов, к которому возрождается интерес как потенциальной альтернативной масличной культуре. Содержание масла в его семенах составляет приблизительно 38–43 %, а подавляющая часть жирных

кислот (> 90 %) представлена ненасыщенными кислотами, включая значительное количество C20:0 эйкозодиеновой кислоты, которая сравнительно редко встречается в растительных маслах, а также линоленовую (36,2–39,4 %), олеиновую (12,8–14,7 %), линолеовую (16,3–17,2 %) и эйкозеновую (14–15,5 %) кислоты [2]. В связи с этим рыжик является очень перспективной культурой для получения биодизеля [3].

Рыжик посевной имеет несколько других привлекательных особенностей в качестве потенциальной масличной культуры. По сравнению с другими крестоцветными в белковом содержимом остаточной массы его семян присутствует очень мало гликозинолатов [1, 4]. Содержание эруковой кислоты также очень низко – всего 3 % [4], поэтому растение имеет важный потенциал для питания человека и животных, а также как индустриальная культура. В питательных целях его можно использовать как корм для животных (птицы, рогатого скота и рыб), в качестве удобрения или белковой фракции. Масло используют для производства биодизеля, а также в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, или же как смазку.

В ходе многолетних испытаний, проведенных в Северной Америке, установлено, что урожайность *C. sativa* сравнима с урожайностью других семенных масличных культур, включая рапс [5]. Рыжик является самоопыляющейся и достаточно неприхотливой культурой к условиям выращивания. От других представителей семейства крестоцветных он отличается более высокой холодо- и засухоустойчивостью, не подвержен болезням и более устойчив к блошкам крестоцветных по сравнению с другими видами *Brassica*; он также обладает устойчивостью к грибам *Leptosphaeria maculans* и *Alternaria brassicae*, вызывающим у крестоцветных фомоз и альтерна-

риоз соответственно [6]. Рыжик имеет короткий вегетационный период и может произрастать на всех типах почв, кроме глинистых, а затраты на его культивирование составляют половину затрат, необходимых при выращивании рапса [7].

Благодаря таким качествам рыжик имеет значительный потенциал для выращивания в Украине. Урожайность этой культуры составляет примерно 30 ц/г [8, 9]. Благоприятные условия для *C. sativa* есть практически во всех областях Украины. Кроме того, развитие получения дизельного биотоплива имеет большую перспективу в районах, загрязненных радионуклидами в результате катастрофы на Чернобыльской АЭС, благодаря способности растений капустных культур очищать почву от радионуклидов, не накапливая их в семенах.

Хотя рыжик и ранее являлся традиционной культурой мелкотоварного сельскохозяйственного производства в Украине, сейчас его коммерческая продукция крайне ограничена, так же как и селекционные программы по созданию новых высокопродуктивных сортов этой культуры. Тем не менее дальнейшее усовершенствование качества зародышевой плазмы рыжика с целью повышения урожайности, увеличения размера семян, повышения содержания масла, улучшения качества питательных характеристик является весьма актуальной проблемой. И для решения этих задач значительный вклад мог бы быть привнесен при помощи генетической инженерии, что требует развития методов, обеспечивающих манипуляции с материалом этого вида в условиях культуры *in vitro*.

Ранее в исследованиях протопласты рыжика уже использовали в качестве партнера для слияния при соматической гибридизации с другими видами *Brassica*, где во всех случаях целью работы было улучшение этих видов [10–13]. Однако до последнего времени опубликовано мало работ по установлению культуры *in vitro* рыжика и регенерации растений. Собственно, решению этой проблемы посвящено всего лишь одно исследование [14]. Совсем недавно описана методика эмбриогенеза из микроспор *C. sativa* [15], параллельно разработано несколько методик трансформации рыжика [16–18].

При этом следует отметить, что подбор условий культивирования *in vitro* и оценка регенерационного потенциала проведены всего

лишь для нескольких генотипов рыжика, культивируемых в Северной Европе [14]. Поэтому задачей настоящего исследования являлся подбор оптимальных условий введения в культуру *in vitro* и регенерации растений из разных типов эксплантов рыжика украинской селекции с последующей разработкой эффективной агробактериальной трансформации этого вида.

Материалы и методы. Для введения в культуру *in vitro* в качестве исходного материала использовали семена *C. sativa* сортообразца Пэрэможець и сорта Мираж, созданных в отделе новых культур Национального ботанического сада им. Н.Н. Гришко НАН Украины. Для этого семена стерилизовали 70%-ным этанолом в течение 1 мин, затем обрабатывали гипохлоритом натрия в концентрациях 1 и 1,5 % на протяжении 5–10 мин [16]. После стерилизации семена трижды промывали стерильной дистиллированной водой в течение 10 мин и помещали в чашки Петри на агаризованную безгормональную среду, содержащую половинный набор макро- и микросолей МС [19], витамины МС, 2%-ную сахарозу, 0,8%-ный агар, рН 5,7–5,8.

Для оценки эффективности регенерации побегов в качестве эксплантов использовали семядольные черешки (петиоли) и сегменты гипокотилей 5-, 7-, 9- и 14-дневных проростков

Состав питательных сред для регенерации растений *C. sativa* сортообразца Пэрэможець и сорта Мираж в условиях *in vitro*

Варианты сред	Макро-, микросоли и витамины МС	Сахароза, г/л	БАП	НУК
			мг/л	
1	+	10	1	–
2	+	20	1	–
3	+	10	2	–
4	+	20	2	–
5	+	10	3	–
6	+	20	3	–
7	+	10	4	–
8	+	20	4	–
9	+	10	1	0,1
10	+	20	1	0,1
11	+	10	2	0,1
12	+	20	2	0,1

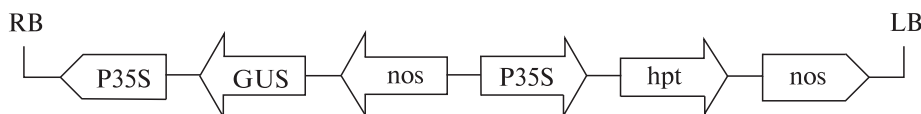


Рис. 1. Схема конструкции рGH217: LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК, P35S – 35S промотор ВМЦК, GUS – ген β-глюкуронидазы, nos – нопалиновый терминатор, hpt – ген устойчивости к гигромицину

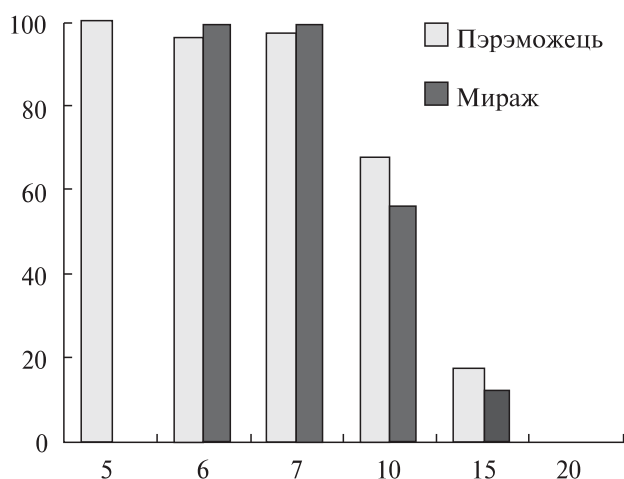


Рис. 2. Эффективность прорастания семян при обработке 1,5%-ным раствором гипохлорита натрия: по вертикали – количество проросших семян, %; по горизонтали – время стерилизации, мин

рыжика. Индукцию побегов с explantов осуществляли, используя нескольких вариантов питательных сред, основу которых также составляла среда МС. Состав питательных сред отличался только по содержанию фитогормонов и сахарозы. В частности, исследовали влияние ряда концентраций бензиламинопурина (БАП), а также нескольких вариантов соотношений БАП и нафтилуксусной кислоты (НУК). Всего для изучения регенерационного потенциала *S. sativa* протестировали 12 вариантов питательных сред (таблица). Explantы инкубировали при 22–24 °С и 16-часовом фотопериоде.

Через каждые три недели материал пассировали на свежеприготовленные питательные среды. Индуцированные побеги отделяли от explantов и пересаживали для дальнейшего роста и укоренения на среду МС либо на ее варианты, содержащие НУК в концентрации 0,1; 0,5 или 1 мг/л.

В эксперименте по генетической трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, содержащий плазмиду рGH217

с репортерным геном β-глюкуронидазы (*gus*) под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) и *nos*-терминатора, а также селективный маркерный ген *hpt*, обеспечивающий устойчивость к гигромицину у трансформантов. Плазмида любезно предоставлена д-ром В.В. Радчуком (Институт генетики растений и исследований культурных растений, Гатерслебен, Германия) (рис. 1).

Ночную культуру агробактерии выращивали в 20 мл жидкой среды LB, дополненной 100 мг/л канамицина и 100 мг/л рифампицина, при температуре 28 °С и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере. Затем агробактерию очищали осаждением при центрифугировании (4000 об/мин) в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок перед инокуляцией разбавляли жидкой средой МС до достижения оптической плотности в интервале от $OD_{600} = 0,01$ до $OD_{600} = 0,5$.

В качестве explantов для трансформации использовали петиоли и гипокотили 5- или 7-дневных проростков. Время кокультивирования explantов с агробактерией составляло от 15 мин до 1 ч. Затем explantы переносили на агаризованную среду для дальнейшего кокультивирования, предварительно промокнув их стерильной фильтровальной бумагой для удаления излишков агробактерии. Через 2–3 дня трансформированные explantы помещали на 7 дней в восстановительную среду МС, содержащую фитогормоны и 400 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерии, а затем – на аналогичную по составу среду, но с добавлением гигромицина в концентрации 5 мг/л для селекции трансгенных линий. Чтобы выбрать оптимальную селективную концентрацию гигромицина, заранее провели эксперименты по изучению влияния разных концентраций (1–10 мг/л) этого селективного агента на жизнеспособность explantов.

Для гистохимического определения экспрессии *gus(uid A)*-гена (гена β-глюкуронидазы) в

тканях растений *C. sativa* после агробактериальной трансформации использовали 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкоронид (X-Gluc). В результате реакции с этим субстратом в области локализации фермента в трансгенных клетках образуется голубой осадок [20].

Результаты исследований и их обсуждение. В начале наших исследований были подобраны оптимальные условия для введения в культуру *in vitro* исходного растительного материала, в частности, определены и установлены эффективные концентрации стерилизующих агентов и время обработки ими семян *C. sativa*. При изучении эффективности стерилизации семян *C. sativa* как для сортообразца Пэрэможець, так и для сорта Мираж установлено, что при использовании гипохлорита натрия в концентрации 1 % независимо от времени обработки семян на 5-й день наблюдали контаминацию материала. Контаминация присутствовала при обработке семян 1,5%-ным гипохлоритом натрия в течение 3 мин у сортообразца Пэрэможець и в течение 5 мин – у сорта Мираж.

Анализ влияния условий стерилизации на прорастание семян позволил установить, что наиболее оптимальным вариантом для сортообразца Пэрэможець является 5–7-минутная обработка 1,5%-ным гипохлоритом натрия. При этом 100%-ное прорастание семян в условиях *in vitro* наблюдали после 5-минутной обработки и 97%-ное при 6- и 7-минутной. Таким образом, семена сорта Мираж необходимо стерилизовать 1,5%-ным гипохлоритом натрия в течение 6–7 мин, так как при этом не наблюдается заражение, и процент прорастания семян составляет 100 % (рис. 2).

При изучении процесса регенерации побегов рыжика в качестве наиболее оптимальных типов эксплантов для инициации органогенеза *in vitro* у многих видов растений семейства крестоцветных обычно используют семядольные и гипокотильные экспланты [21, 22] (рис. 3, б, в, см. вклейку в конце номера). В нашем эксперименте для получения эксплантов использовали 5-, 7-, 9- и 14-дневные проростки *C. sativa*, которые размещали на средах, описанных в «Материалах и методах».

Из литературных данных известно, что у ряда представителей семейства крестоцветных формирование побегов происходит в присут-

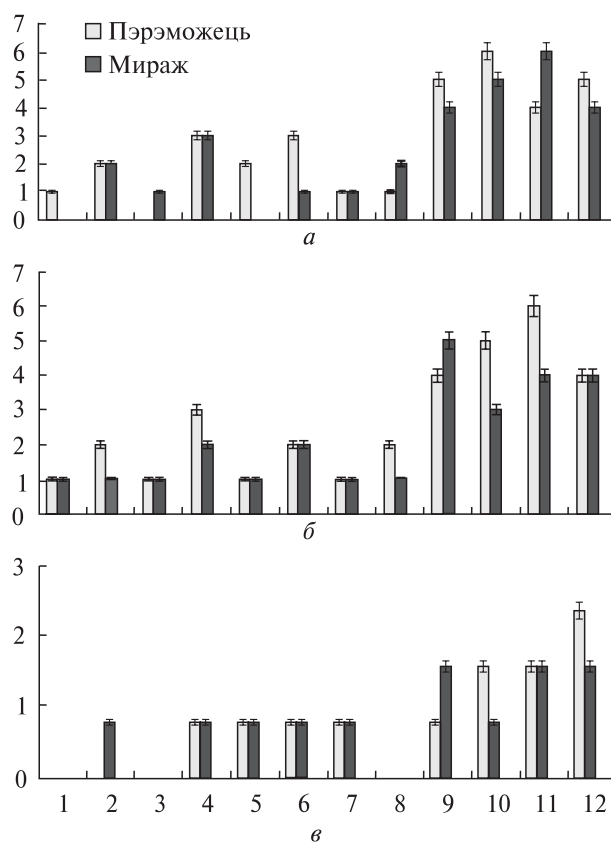


Рис. 4. Эффективность регенерации побегов на срезах черешков семядолей проростков рыжика в разных вариантах сред: а – 5-дневные; б – 7-дневные; в – 9-дневные проростки; по вертикали – количество побегов, шт.; по горизонтали – номера вариантов сред (таблица)

ствии как цитокининов, которые способны вызывать деление клеток и инициировать дифференциацию побегов, так и при совместном добавлении в среду различных комбинаций регуляторов цитокининовой и ауксиновой природы [21–24]. Более эффективно регенерация побегов рыжика происходит на средах, содержащих цитокинины в комбинации с ауксинами [14].

Таким образом, для изучения процессов регенерации побегов у сортообразца Пэрэможець и сорта Мираж нами протестирован ряд концентраций БАП, а также комбинации БАП с НУК (таблица). Необходимо отметить, что некоторое влияние на эффективность каллусогенеза и дальнейшую регенерацию побегов способна оказывать та или иная концентра-

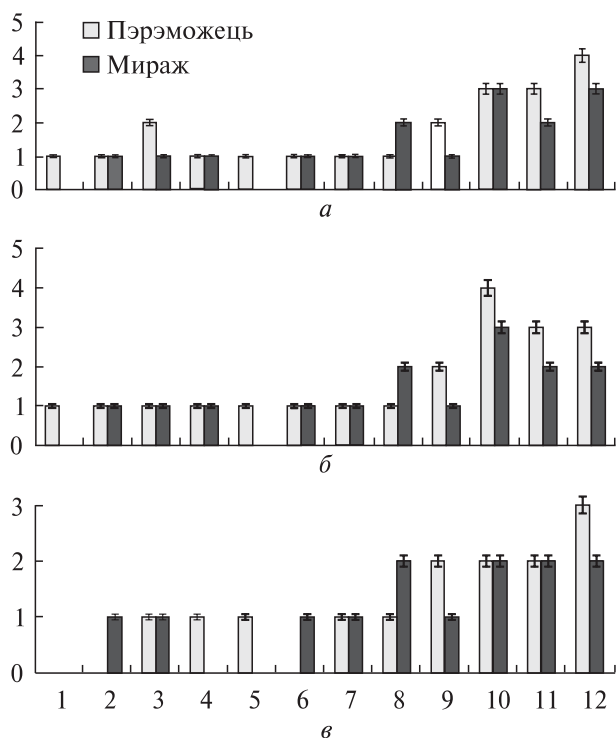


Рис. 5. Эффективность регенерации побегов из эксплантов гипокотилей проростков рыжика в разных вариантах сред: *а* – 5-дневные; *б* – 7-дневные; *в* – 9-дневные проростки; по вертикали – количество побегов, шт.; по горизонтали – номера вариантов сред (таблица)

ция сахарозы в питательной среде. В результате наших исследований были протестированы 12 вариантов сред, отличающихся не только по составу регуляторов роста, но и по содержанию сахарозы. Для этого растительный материал каждые три недели пассировали на свежеприготовленные питательные среды. После трех-четырех недель культивирования на петиолях и сегментах гипокотилей 5-, 7- и 9-дневных проростков рыжика наблюдали формирование желто-зеленого или зеленого каллуса с хорошо заметными точками инициации будущих побегов на всех вариантах сред. На эксплантах 14-дневных проростков формирование каллусных структур происходило более медленно, а формирование зачатков побегов на всех средах вообще отсутствовало. Отсюда следует, что для регенерации побегов рыжика в условиях *in vitro* эффективнее использовать более молодые клетки и ткани. Необхо-

димо отметить, что эффективность регенерации побегов на средах, содержащих БАП и НУК, была выше, чем на средах, содержащих только БАП. Такая тенденция прослеживается для всех типов эксплантов, полученных как из 5-, 7-, так и 9-дневных проростков. При этом большее количество побегов индуцировано из петиолей и эксплантов гипокотилей 5- и 7-дневных проростков (рис. 4 и 5).

Установлено также, что при содержании в среде 10 г/л сахарозы формирование каллуса происходило менее интенсивно, чем при концентрации 20 г/л, однако на формирование побегов это существенно не влияло. Таким образом, в ходе наших экспериментов изучено действие ряда концентраций фитогормонов БАП, соотношение нескольких вариантов концентраций фитогормонов БАП и НУК, а также действие двух концентраций сахарозы (10 и 20 г/л) на процесс формирования побегов из петиолей и сегментов гипокотилей 5-, 7-, 9- и 14-дневных проростков. На рис. 3, *г* показаны сформировавшиеся побеги на срезах черешка семядоли, на рис. 3, *д* – на сегменте гипокотыля.

Если регенерация крестоцветных растений в условиях *in vitro* происходит под влиянием цитокининов или их комбинаций с ауксинами, то укоренение полученных регенерантов – при добавлении в среду ауксинов [25]. Исходя из этого, следующим этапом наших исследований было проведение экспериментов по изучению действия ауксинов, в частности ряда концентраций НУК, на процесс ризогенеза у полученных побегов. Сформировавшийся и отделенный от экспланта побег представлен на рис. 3, *е*. Следует отметить, что перед началом этих исследований регенерировавшие побеги (рис. 3, *г–е*) высаживали на среды МС и на $1/2$ МС, однако образование корней у них не происходило. При добавлении НУК (0,1; 0,5; 1 мг/мл) в среду МС отмечена инициация образования корней лишь при концентрации этого фитогормона 1 мг/мл.

Таким образом, нами установлено, что для индукции побегов у *S. sativa* лучше всего использовать 5- или 7-дневные проростки, поскольку эффективность регенерации на их эксплантах выше, чем у 9-дневных. Что касается типа экспланта, то в одинаковой мере

для регенерации побегов можно использовать и петиоли, и сегменты гипокотилей. Эффективность регенерации растений на петиолях и гипокотильных эксплантах у сортообразца Пэрэможець незначительно выше по сравнению с сортом Мираж на нескольких вариантах сред (рис. 4 и 5). Тем не менее для регенерации побегов нами выбрана среда МС как наиболее эффективная, содержащая в качестве фитогормонов БАП (до 4 мг/мл) и НУК (0,1 мг/мл), а для их укоренения – среда МС с 1 мг/мл НУК.

Кроме того, нами разработан метод *Agrobacterium*-опосредуемой трансформации *C. sativa*. Для этого использовали векторную конструкцию pGH217, содержащую репортерный ген β-глюкуронидазы (*gus*) под контролем 35S промотора ВМЦК и pos-терминатора, а также селективный маркерный ген *hpt*, который обеспечивает устойчивость к гигромицину у отобранных трансгенных растений. Упомянутый вектор с *gus*-геном позволяет быстро (уже через 1 сут) визуализировать экспрессию перенесенного чужеродного гена в растительных клетках по наличию голубого окрашивания в тканях трансгенных линий [20].

Поскольку в качестве эксплантов для трансформации использовали петиоли и гипокотили 5- или 7-дневных проростков *C. sativa*, сначала были проведены эксперименты по изучению влияния гигромицина на их выживаемость с целью установления его селективной концентрации при отборе трансформантов. Гигромицин тестировали в концентрациях от 1 до 10 мг/л, добавляя его в среду для регенерации побегов, и через 30 дней оценивали способность тканевых эксплантов выживать и регенерировать при таких условиях. В результате экспериментов установили, что наиболее эффективной для селекции является концентрация гигромицина 5 мг/л, что совпадает с данными, описанными ранее [16].

После кокультивирования с агробактерией экспланты переносили сначала на восстановительную среду МС, содержащую фитогормоны и 400 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерии, а затем на аналогичную по составу среду, но с добавлением гигромицина в концентрации 5 мг/л для селекции трансгенных линий (рис. 6, а–в, см. вклейку в конце номера). Первое тестирование протрансфор-

мированных эксплантов на GUS-экспрессию проводили через три дня после перенесения их на селективную среду. Результаты этого GUS-теста представлены на рис. 6, г и д. На селективной среде через 2–3 недели после проведения трансформации по краям срезов на некоторых петиолях и сегментах гипокотилей наблюдали формирование каллуса, который давал начало побегам (рис. 6, б). Спустя 2–3 месяца на селективной среде отобрали первые трансгенные растения *C. sativa*. С помощью гистохимического анализа каллуса и листиков регенерировавших побегов обнаружили экспрессию перенесенного *gus*-гена, что подтверждает трансгенную природу полученных линий.

Таким образом, разработанные нами методы введения в культуру *in vitro* и регенерации растений *C. sativa*, а также *Agrobacterium*-опосредуемой трансформации могут служить основой дальнейшего биотехнологического усовершенствования этого вида для улучшения качества получаемого из него биодизеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта «Введение в культуру in vitro и генетическая трансформация рыжика с целью улучшения его продуктивных характеристик для производства биодизеля» целевой комплексной программы научных исследований НАН Украины «Биомасса как топливное сырье» («Биотопливо»).

*A.I. Yemets, Yu.N. Boychuk, E.N. Shysha,
D.B. Rakhmetov, Ya.B. Blume*

Institute of Food Biotechnology and Genomics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: yemets.alla@gmail.com
National Botanical Garden named M.M. Gryshko,
NAS of Ukraine

ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* CULTURE, PLANT REGENERATION AND GENETIC TRANSFORMATION OF *CAMELINA SATIVA*

The results on *in vitro* culture establishment, plantlet regeneration and rooting of *Camelina sativa* cultivar sample Peremozhets and cultivar Mirazh are presented. Effective concentrations of sterilizing agents and duration of plant material treatment were estimated. Phytohormone ratio, sucrose concentration in nutrient medium that induce effective formation of *C. sativa* shoots and NAA concentration for plantlet rooting have been established. The method of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Camelina* by using binary vector pGH217 carrying reporter β-glucuronidase (*gus*)

gene driven under 35S CaMV promoter and nos-terminator, and selective marker *hpt* gene conferring hygromycin-resistance in transgenic plant was elaborated.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Schuster A., Friedt W. *Camelina sativa* : Old face – new prospects // *Crucifer. News.* – 1995. – **17.** – P. 6–8.
2. Gugel R.K., Falk K.C. Agronomic and seed quality evaluation of *Camelina sativa* in western Canada // *Can. J. Plant Sci.* – 2006. – **86.** – P. 1047–1058.
3. Pilgeram A.L., Sands D.C., Boss D., Dale N., Wichman D., Lamb P., Lu C., Barrows R., Kirkpatrick M., Thompson B., Johnson D.L. *Camelina sativa*, a Montana Omega-3 and fuel crop // *Issue in new crops and new uses* / Eds J. Janick, A. Whipkey. – Alexandria : ASHS Press, 2007. – P. 129–131.
4. Zubr J. Oil-seed crop: *Camelina sativa* // *Industr. Crop Prod.* – 1997. – **6.** – P. 113–119.
5. Putman D.H., Budin J.T., Field L.A., Breene W.M. *Camelina*: a promising low-input oilseed *New Crops* / Eds J. Janick, J. Simon. – New York : Wiley – 1993. – P. 314–322.
6. *The Biology of Camelina sativa* (L.) Crantz (*Camelina*) // A companion document to Directive 94-08 (Dir94-08), Assessment Criteria for Determining Environmental Safety of Plant with Novel Traits. – 2012.
7. Moore M. *Camelina* comes in from the cold // *Furrow.* – 1994. – **99.** – P. 20–21.
8. Блюм Я.Б., Гелетуха Г.Г., Григорюк І.П., Дмитрук К.В., Дубровін В.О., Ємець А.І., Забарний Г.М., Калетнік Г.М., Мельничук М.Д., Мироненко В.Г., Рахметов Д.Б., Сибірний А.А., Циганков С.П. Біологічні ресурси і технології виробництва біопалива. – К.: Аграр Медіа Груп, 2010. – 403 с.
9. Мельничук М.Д., Демидась Г.І., Квітко Г.П., Гетман Н.Я. Рижій посівний як альтернатива ріпаку ярому для виробництва біодизеля // *Наук. доп.* – Нац. ун-ту біоресурсів і природокористування України. – 2012. – **31**, № 2.
10. Narasimhula S.B., Kirti P.B., Bhatt S.R., Prakash S., Chopra V.L. Intergeneric protoplast fusion between *Brassica carinata* and *Camelina sativa* // *Plant Cell Rep.* – 1994. – **13.** – P. 657–660.
11. Hansen L.N. Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* L. and *Camelina sativa* (L.) Crantz. // *Euphytica.* – 1998. – **104.** – P. 173–179.
12. Sigareva M.A., Earle E.D. Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea* // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – **98.** – P. 164–170.
13. Jiang J., Zhao X., Tian W., Li T., Wang Y. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Camelina sativa* with high linolenic acid content // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2009. – **99.** – P. 91–95.
14. Tattersall A., Millam S. Establishment and *in vitro* regeneration studies of the potential oil crop species *Camelina sativa* // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 1999. – **55.** – P. 147–149.
15. Ferrie A.M.R., Bethune T.D. A microspore embryogenesis protocol for *Camelina sativa*, a multiuse crop // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2011. – **106.** – P. 495–501.
16. Kuvshinov V., Kanerva A., Koivu K., Pehu E., Kuvshinova S. Transformation system in *Camelina sativa* // *US Patent Application: US 2009/0151023 A1*
17. Lu C., Kang J. Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediate transformation // *Plant Cell Rep.* – 2008. – **27**, № 2. – P. 273–278.
18. Nguyen T., Liu X., Derocher J. Floral dip method for transformation of *Camelina* // *US Patent Application: 2011/0145950 A1*.
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – **15.** – P. 473–497.
20. Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *EMBO J.* – 1987. – **6**, № 13. – P. 3901–3907.
21. Tang G.H., Zhou W.Z., Li H.Z., Mao B.Z., He Z.H., Yoneyama K. Medium, explant and genotype factors influencing shoot regeneration in oilseed *Brassica spp.* // *Agr. Crop Sci.* – 2003. – **189.** – P. 351–358.
22. Zhang Yu., Xu J., Han Lu., Wie Wie, Guan Z., Cong L., Chai T. Efficient shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica juncea* // *Plant Mol. Rep.* – 2006. – **24.** – P. 255a–255i.
23. Koh W.J., Lox C.S. Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering rapid-cycling *Brassica napus* // *Plant Cell Rep.* – 2000. – **19.** – P. 1177–1183.
24. Sparrow P.A.C., Townsend T.M., Morgan C.L., Dale P.J., Arthur A.E., Irwin J.A. Genetic analysis of *in vitro* shoot regeneration from cotyledonary petioles of *Brassica oleracea* // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – **108.** – P. 1249–1255.
25. 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.

Поступила 10.06.12