

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
„ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ“

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БОЙЧУК ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК 633.85: 581.1+581.4: 58.084.

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВІДБІР ТА ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*
ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ ГЕНОТИПІВ ЯРОГО РИЖІЮ (*CAMELINA
SATIVA L.*) З ЇХ ПОДАЛЬШОЮ ГЕНЕТИЧНОЮ ТРАНСФОРМАЦІЄЮ**

03.00.20 – біотехнологія

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Ю.М.Бойчук

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент
НАН України Алла Іванівна Ємець

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Бойчук Ю.М. Відбір та введення в культуру *in vitro* високопродуктивних генотипів ярого рижію (*Camelina sativa* L.) з їх подальшою генетичною трансформацією. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (091 – біологія). ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України”, Київ, 2018.

На сьогоднішній день надзвичайно актуальним у світі є пошук альтернативних джерел для отримання біодизелю. Одним із варіантів збагачення ресурсної бази для отримання цього виду палива є відновлення розширеного культивування рижію посівного (*Camelina sativa*) – традиційної для України, але малопоширеної нині капустиної культури поліфункціонального використання. Створення і використання нових високопродуктивних генотипів рижію ярого української селекції та збільшення його посівів дозволить поліпшити соціально-економічну ситуацію в країні – зменшення енергетичної залежності за рахунок альтернативного відновлювального джерела рослинної сировини. Зважаючи на ці обставини, створення генетично покращених сортів рижію посівного (*C. sativa* (L.) Crantz), зокрема, підвищення його врожайності та збільшення вмісту олії в насінні для виробництва біодизелю в Україні є одним з важливих завдань.

При дослідженні фізіологічних характеристик 12 генотипів рижію посівного було встановлено, що найбільш сприятливим періодом сівби для створення насінних посівів з високою продуктивністю був від III декади квітня до III декади травня. Тривалість вегетаційного періоду *C. sativa* становила від 65 до 90 діб. Вивчення морфологічних особливостей *C. sativa* показали залежність основних морфометричних показників від формового різноманіття, умов вегетації, фази розвитку, строків, способів сівби, площі живлення, удобрення, елементів догляду за посівами. За основними

морфометричними параметрами рослин встановлено суттєву перевагу сортів Перемога та Євро-12. З метою рекомендації для подальшого використання колекційних зразків було проведено порівняльний аналіз за вмістом олії та жирнокислотним складом, так, було підраховано, що нові сортозразки та сорти рижію формують 3-4 т/га насіння із вмістом олії 36-43% при її виході 1000-1300 кг/га. Ці показники урожайності рижію слід оцінювати як достатньо високі для отримання біодизелю. Одночасно за іншими показниками урожайність досліджуваних генотипів ярого рижію сягала 25 т/га біомаси, 5-8 т/га сухих речовин, 0,8-1,0 т/га протеїну, що вказує на перспективність використання цієї культури на кормові цілі як високобілкової та високовітамінної сировини. Результати біохімічного аналізу показали, що насіння рижію вирізняється високим вмістом ліпідів та великим виходом з урожаєм. За вмістом ліпідів у насінні, так і за виходом енергії з олії переважали сорти Перемога та Євро-12. Якість олії та напрям її використання в значній мірі визначаються її жирнокислотним складом. Найбільшу частку в олії насінні рижію мають поліненасичені та мононенасичені жирні кислоти. Аналіз біохімічного складу всіх форм та сортів виявив високий вміст ліноленової, лінолевої, олеїнової, гондоїнової та пальмітинової кислот, а також властивої всім представникам родини *Brassicaceae* ерукової кислоти.

Регенерація пагонів *in vitro* залежить від умов культивування експлантів досліджуваних рослин, складу живильних середовищ і таких параметрів, як освітлення та температура. Вибір типу експланту є головним фактором, що визначає здатність до ефективної регенерації пагонів. Дослідження морфо-генетичного потенціалу різних типів експлантів *C. sativa in vitro* показали, що найвищою здатністю до регенерації характеризувались експланти п'яти- та семиденних проростків, тоді, як у дев'ятиденних ефективність пагоноутворення значно знижувалась. При визначенні типу експланту для регенерації пагонів можна використовувати як сім'ядольні листки, так і сегменти гіпокотилів.

Результати дослідження впливу фітогормонів на індукцію пагоноутворення вказують на те, що процес формування пагонів на середовищі МС, яке містило БАП в поєднанні з НОК для регенерації пагонів відбувався набагато інтенсивніше в порівнянні з середовищем, що містило лише БАП. При цьому, найбільша кількість пагонів на один експлант для сім'ядольних листків становила 2-3 шт., а для гіпокотилів – 1-2 шт. Зокрема, за використання 1-2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК частота регенерації пагонів становила майже 70 % у експлантів сім'ядольних листків та досягала 45 % у експлантів гіпокотилів. Використання 20 г/л сахарози сприяло інтенсивному процесу формування калюсу, ніж за використання 10 г/л сахарози, але істотного впливу на процес пагоноутворення не спостерігали. Утворення коренів відбувалось на середовищі МС з додаванням 1 мг/л НОК, оскільки при додаванні цього фітогормону в концентраціях 0,1 мг/л та 0,5 мг/л формування коренів взагалі було відсутнє.

Аналіз регенераційної здатності всіх досліджуваних сортозразків та сортів рижю показав, що три сорти Перемога, Міраж, Євро-12 та один сортозразок ФЕОРЖЯФ-5 характеризуються досить високим морфогенетичним потенціалом. Отримані нами результати також підтверджують той факт, що вибір певного генотипу є важливим при створенні ефективного методу як для індукції калюсогенезу, так і для регенерації рослин.

Інфікування агробактерією, ко-культивування, селекція на селективному середовищі з одночасним застосуванням реагенту для знищення бактерій після трансформації та подальша регенерація рослин в умовах селективного тиску – є основними етапами, з яких складається процес генетичної трансформації та отримання генетично змінених рослин. Оскільки конструкція для генетичної трансформації містила репортений ген *GUS* та селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину, було протестовано вплив різних концентрацій цього селективного агента на життєздатність експлантів рижю посівного для

встановлення найбільш ефективної селективної концентрації при відборі трансгенних ліній в умовах *in vitro*. У результаті проведених досліджень було встановлено, що селективною концентрацією гігromіцину для селекції трансгенних ліній є 5 мг/л. Для відбору трансгенного насіння рижю після трансформації методом *in planta* було обрано 20 мг/л гігromіцину за результатами дослідів по визначенню впливу цього антибіотика на проростання насіння, ріст та розвиток проростків.

Фактори, що визначають успішну інтеграцію екзогенної ДНК у геном рослини при проведенні *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів в умовах *in vitro*, – це тривалість інокуляції та ко-культивування експлантів з агробактерією, тривалість їх відновлення, а також морфогенетичний потенціал експлантів досліджуваних рослин. Нами встановлено, що найбільш оптимальний період інокуляції як сім'ядольних листків, так і сегментів гіпокотилів агробактерією становить 15 хв., при цьому тривалість ко-культивування з агробактерією становила 2 доби. Збільшення тривалості інокуляції та ко-культивування призводило до негативного впливу на рослинні тканини. Значна частина експлантів набувала білого кольору і відмирала, або взагалі втрачала здатність до регенерації пагонів. Більше того, тривале культивування в умовах *in vitro* пагонів, що були регенеровані у присутності гігromіцину, також призводило до значного інгібування і здатності до коренеутворення. При проведенні гістохімічного аналізу калюсу та листків регенерованих пагонів, спостерігали характерне синє забарвлення, що свідчить про експресію репортерного гена *GUS* та підтверджує трансгенну природу отриманих ліній. За нашими даними частота транз'єнтної трансформації складала 1,6 %.

У результаті генетичної трансформації методом *in planta* рижю посівного були отримані рослини, трансгенну природу яких було підтверджено за допомогою молекулярно-генетичного аналізу за використання полімеразної ланцюгової реакції. Дослідження впливу

температури під час трансформації *in planta* показали, що кількість гігromіцин-стійких проростків на середовищі з гігromіцином за температури трансформації 25 – 27° С була більшою, ніж за температури 20 – 22° С. При порівнянні ефективності двох методів, а саме — (*Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів, проведеної в умовах *in vitro*, та трансформації методом та *in planta*) – трансформація методом *in planta* є більш ефективною, зручною, оскільки вдається запобігти стадій регенерації та укорінення пагонів, які потребують певного часу, спеціального обладнання та відповідних реактивів. Було встановлено, що частота трансформації рижію посівного методом *in planta* становить 2,2 %, що перевищує показники частоти трансформації цього виду рослин, отримані іншими авторами. Отже, отримані нами дані можуть слугувати основою для подальшого біотехнологічного вдосконалення *C.sativa* для поліпшення якості з нього біодизеля.

Ключові слова: *Camelina sativa*, олія, біодизель, регенерація *in vitro*, *in planta* трансформація.

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

Статті:

1. Yemets A.I., Boychuk Yu.N., Shysha E.N., Rakhmetov D.B., Blume Ya.B. Establishment of *in vitro* culture, plant regeneration, and genetic transformation of *Camelina sativa*. Cytology and Genetics. V 47, N 3, p. 138-144. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

2. Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б., Ємець А.І., Бойчук Ю.М., Андрущенко О.Л., Вергун О.М., Рахметова С.О. *Camelina sativa* (L.) crantz – цінна олійна рослина. Інтродукція рослин. – 2014. – Т. 62, 2. – С. 50 – 58.(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

3. Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Бойчук Ю.М., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Фізіологічні та морфометричні характеристики нових форм та сортів ярого рижю (*Camelina sativa*). Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів.– 2014. – Т. 12, № 1. – С. 65–77. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

4. Бойчук Ю.М., Баєр О.О., Баєр Г.Я., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Трансформація *Camelin asativa* методом *in planta*. Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 112–116.(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

5. Блюм Р.Я., Бойчук Ю.М., Ємець А.І., Рахметова С.О., Блюм Я.Б., Рахметов Д.Б. Порівняльна оцінка жирнокислотного складу олій насіння форм та сортів тифону, редьки олійної і рижю як перспективної сировини для отримання біодизелю. Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 18. – С. 61–66.(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

Тези:

6. Шиша О.М., Бойчук Ю.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Введення в культуру *in vitro* рижію посівного (*Camelina sativa*). Матеріали міжнародної наукової конференції присвяченої 75-річчю заснування Національного ботанічного саду ім. Гришка НАНУ «Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках», Київ, 15-17 вересня. –2010. – С. 627-630.

7. Бойчук Ю., М Шиша О.М., Ємець А.І., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Введення в культуру *in vitro* та розробка методу генетичної трансформації рижію посівного (*Camelina sativa*). Матеріали конференції «Современные аспекты генетической инженерии растений». – г. Киев, 30 мая-1 июня. – 2011. – С. 18.

8. Шиша, Е.Н., Бойчук Ю.Н., Емец А.И., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и генетическая трансформация Рыжика посевного (*Camelina sativa L.*). Фактори експериментальної еволюції організмів. – г.Алушта,19-23 сентября 2011. – Т. 11. – С. 442-445.

9. Бойчук Ю.Н., Шиша Е.Н., Емец А.И., Исаенков С.В., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и разработка метода генетической трансформации Рыжика посевного (*Camelina sativa*). Матеріали першої конференції молодих учених (с международным участием) «Биология растений и биотехнология». – г. Белая Церковь, 5-7 октября. – 2011. – С. 107.

10. Бойчук Ю.М., Шиша О.М., Ємець А.І. Регенерація рослин рижію посівного (*Camelina sativa*) культурі *in vitro*. Матеріали XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів». –м. Київ, 15-16 листопада. – 2012. – С. 228-229.

11. Бойчук Ю.М., Шиша О.М., Ємець А.І. Генетична трансформація рижію посівного (*Camelina sativa*). Міжнародна конференція «Геноміка рослин та біотехнологія» та друга конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». –м. Київ, 23-24 грудня. – 2013. – С. 73.

12. Бойчук Ю.Н., Рахметов Д.Б., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Изучение жирнокислотного состава рижика посівного (*Camelina sativa*) української селекції // Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія як інструмент збереження біорізноманітності рослинного світу (фізіолого-біохімічні, ембріологічні, генетичні та правові аспекти)». –г. Ялта, Крим, 12 – 17 жовтня. – 2014. – С. 188.

13. Бойчук Ю.М., Ємець А.І., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б. Селекційно-генетичний потенціал рижію колекції НБС ім.М.М.Гришка НАН України як перспективний ресурс для виробництва біодизелю // Матеріали наукової конференції в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України – Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії «Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив». – м. Київ, 9-10 вересня. – 2014. – С. 90 – 94.

14. Бойчук Ю.М., Баєр О.О., Баєр Г.Я., Ємець А.І. Трансформація рижію посівного (*Camelina sativa*) методом *in planta* // Матеріали третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія». –м. Київ, 16 – 18 травня. – 2017. – С. 61.

SUMMARY

Boychuk Yu.M. Selection and *in vitro* culture establishment of highly productive genotypes of spring false flax (*Camelina sativa* L.) for their genetic transformation. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences on a specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

Nowadays the search for alternative sources for biodiesel fuels production is extremely important worldwide. Among options available for enriching the resource base to obtain this type of fuel is the restoration of the enhanced sowing false flax (*Camelina sativa*) crop cultivation. Sowing false flax is traditional for Ukraine, but not widely distributed *Brassicaceae* crop of multifunctional use. Creation and use of new high-yielding spring false flax genotypes of Ukrainian selection and increase of its cultivation areas is considered as complementary strategy for improvement of the socio-economic situation in the country and is aimed to reduce energy dependence by using alternative renewable sources of plant origin. Thus the creation of genetically improved varieties of seed false flax (*C. sativa* (L.) Crantz), and in particular increase their productivity as well as oil content in seeds for biodiesel production in Ukraine is of great importance now.

The study of physiological characteristics of 12 sowing false flax genotypes revealed that the most favorable sowing period to produce seed crops with high productivity lasted from the third decade of April to the third decade of May. The duration of the *C. sativa* growing season varied from 65 to 90 days. The study of *C. sativa* morphological characteristics showed the dependence of the basic morphometric features on the form diversity, vegetation conditions, developmental phases, timing, sowing methods, feeding area, fertilization, and care elements applied. According to the plants key morphometric parameters, the essential advantage of the varieties of Peremoga and Euro-12 has been established. To determine recommendations on further use of selected plant samples, a comparative

analysis of the oil and fatty acid composition content was carried out. For example, it was calculated that new varieties and forms of false flax yielded 3-4 t/ha of seed with oil content of 36-43% at its out put of 1000-1300 kg/ha which is sufficiently high productivity for biodiesel production from false flax. Simultaneously, other yield parameters for studied spring false flax genotypes reached 25 t/ha for biomass, 5-8 t/ha for dry matter, 0.8-1.0 t/ha for protein, indicating the prospects of using the crop for feeds production as high-protein raw materials. The results of biochemical analysis showed that false flax seed stands high in lipids and high yield of the harvest. The content of lipids in seeds and the release of energy from oil varieties prevailed in Peremoga and Euro-12 varieties. The quality of the oil and the direction of its use are largely determined by its fatty acid composition. The largest fraction in false flax seed oil is composed of polyunsaturated and monounsaturated fatty acids. Analysis of biochemical composition of all new varieties and forms showed high content of linolenic, linoleic, oleic, palmitic, hondoyinic acids and erucic acid which is known to be found in all plants of the *Brassicaceae* family.

Regeneration of shoots *in vitro* depends on the conditions of explants cultivation, the composition of nutrient media and other parameters such as illumination and temperature. The choice of the explant type is the main factor which determines effective shoots regeneration. Study of various types of *C. sativa* explants *in vitro* morpho-genetic potential showed that explants of five- and seven-day sprouts had the highest regeneration ability, where as in nine-day sprouts the shoots formation ability was significantly reduced. For determining which type of the explant is more efficient in shoots regeneration both cotyledon leaves and segments of hypocotyls could be used. The results of the study of phytohormones effect on the induction of shoots formation indicated that the shoots were formed more efficiently on the medium MS with BAP and NAA, in comparison with shoots formation efficiency observed on MS with single BAP only. At the same time, the largest number of shoots per explant for seminal leaves was 2-3 pcs., and for hypocotyls – 1-2 pcs. The use of 1-2 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA was associated with the frequency of shoots regeneration at 70% in the seminal leaflets explants and reached 45% in

hypocotyls explants. The addition of 20 g/l sucrose in medium contributed to more intensive formation of the callus, than the use of 10 g/l sucrose, but no significant effect on the process of rooting was observed. The formation of the roots occurred on the MS medium with the addition of 1 mg/l NAA, while the addition of this phytohormone at concentrations of 0.1 mg/l and 0.5 mg/l was associated with absence of the roots formation.

Analysis of the regenerative capacity of all studied varieties and forms of false flax showed that the three varieties Victory, Mirage, Euro-12 and one form FEORJJAF-5 had rather high morphogenetic potential. Our results also confirm the fact that the choice of a certain genotype is important in creating an effective method for both induction of callogenesis and for the regeneration of plants.

Infection with agrobacteria, co-cultivation, selection on a selective medium with the simultaneous application of a reagent for the destruction of bacteria after transformation and subsequent regeneration of plants under selective pressure are the main steps of the genetic transformation process and production of genetically modified plants. Since the DNA used for genetic transformation contained the *GUS* reporter gene and the selective *hpt* resistance marker that provides resistance to hygromycin, the effects of various concentrations of this selective agent on the viability of sowing false flax explants were tested to establish the most effective selective concentration for the selection of transgenic lines *in vitro*. As a result, it was found that the selective concentration of hygromycin which allowed selection of transgenic lines was 5 mg/l. To select transgenic false flax seeds after transformation *in planta* hygromycin concentration of 20 mg/l was used based on the previous results to determine the effect of this antibiotic on seeds germination, growth and development of seedlings.

Factors that determine successful integration of exogenous DNA into a plant's genome during *Agrobacterium*-mediated transformation of explants *in vitro* are the duration of inoculation and co-cultivation of explants with agrobacteria, the duration of their recovery, as well as the morphogenetic potential of investigated plants' explants. We have found that the optimal period of inoculation of cotyledon

leaves and segments of hypocotyl with agrobacteria was 15 minutes, while the duration of co-cultivation with agrobacteria was 2 days. An increase in the duration of inoculation and co-cultivation led to a negative effect on plant tissues. In this case explants lost the ability to regenerate shoots, acquired a white color and died. Moreover, prolonged *in vitro* cultivation of shoots regenerated in the presence of hygromycin also resulted in significant inhibition of root-forming ability. During histochemical analysis of callus and leaves of regenerated shoots a characteristic blue color was observed, which indicated the expression of the *GUS* reporter gene and confirmed the transgenic nature of the received lines. According to our data, the frequency of transient transformation was 1.6%.

As a result of *in planta* genetic transformation sowing false flax plants were obtained with their transgenic nature confirmed by molecular-genetic analysis using a polymerase chain reaction. Study of the temperature role on the transformation *in planta* efficiency showed that the number of hygromycin-resistant seedlings on a medium with hygromycin at temperature of 25-27 °C was greater than at temperature of 20 - 22 °C. If comparing the effectiveness of two methods, namely *Agrobacterium*-mediated transformation of explants conducted in *in vitro* and transformation by the method *in planta* – the transformation *in planta* is more efficient, convenient, since it's use eliminates time, efforts and supplies needed for the regeneration and rooting phases for shoots present in *Agrobacterium*-mediated transformation. It has been found that the frequency of transformation of the false flax seeds by method *in planta* is 2.2%, which exceeds the transformation frequency of this plant species reported by other authors. Consequently, received data can serve a basis for further biotechnological modification of *C. sativa* to improve the quality of biodiesel.

Key words: *Camelina sativa*, oil, biodiesel, *in vitro* regeneration, *in planta* transformation.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ХРЕСТОЦВІТИХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	25
1.1. <i>C. sativa</i> та перспективи використання.....	26
1.2. Рижій як альтернативне джерело біодизельного палива	30
1.3. Особливості введення та регенерація представників родини <i>Brassicaceae</i> в культуру <i>in vitro</i>	36
1.4. Перенесення чужорідної ДНК в рослини хрестоцвітів.....	38
1.5. Біотехнологічні розробки для <i>Camelina sativa</i>	43
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	52
2.1. Рослинний матеріал.....	52
2.2. Характеристика реактивів, які використовували в роботі.....	52
2.3. Вивчення фізіологічних, морфометричних та біохімічних характеристик різних сортозразків та сортів <i>C. sativa</i>	53
2.3.1. Польові дослідження.....	53
2.3.2. Біохімічний аналіз сортозразків та сортів рижію.....	53
2.4. Введення в культуру <i>in vitro</i> рижію посівного.....	54
2.4.1. Стерилізація насіння.....	54
2.4.2. Живильні середовища та умови культивування.....	54
2.5. <i>Agrobacterium</i> – опосередкована трансформація <i>C. sativa (in vitro)</i>	56
2.5.1. Конструкція для трансформації рижію посівного.....	56
2.5.2. Вибір селективної концентрації гігromіцину	56
2.5.3. Умови культивування <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	57
2.5.4. Ко – культивування з <i>A. tumefaciens</i> , селекція та регенерація трансгенних рослин.....	58
2.6. Трансформація рослин рижію посівного методом <i>in planta</i>	58
2.6.1. Умови інокуляції рослин.....	58

2.7. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних ліній рижюю.....	59
2.8. Статистична обробка отриманих даних.....	60
РОЗДІЛ 3. МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОРТІВ ТА СОРТОЗРАЗКІВ РИЖЮЮ ПОСІВНОГО.....	61
3.1. Дослідження тривалості вегетаційного періоду.....	61
3.2. Вивчення морфологічних особливостей <i>C. sativa</i>	63
3.3. Біохімічний аналіз сортозразків та сортів рижюю посівного.....	77
РОЗДІЛ 4. ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН РИЖЮЮ ПОСІВНОГО.....	82
4.1. Оптимізація протоколу стерилізації насіння.....	82
4.2. Дослідження морфо-генетичного потенціалу різних типів експлантів..	86
4.3. Дослідження впливу фітогормонів на індукцію пагоноутворення та укорінення <i>C. sativa</i>	88
4.4. Оцінка морфогенетичного потенціалу у досліджених сортозразків та сортів рижюю.....	94
РОЗДІЛ 5. ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТА АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ ЛІНІЙ <i>CAMELINA SATIVA</i>	97
5.1. Підбір селективних концентрацій гігроміцину.....	97
5.2. <i>Agrobacterium</i> – опосередкована трансформація в умовах <i>in vitro</i>	101
5.3. Трансформація <i>C. sativa</i> методом <i>in planta</i>	110
5.4. Молекулярно – генетичний аналіз трансгенних рослин рижюю	117
РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	120
ВИСНОВКИ.....	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	129

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАП – 6-бензиламінопурин

ВМЦК – вірус мозаїки цвітної капусти

МС – солі за Мурасіге і Скугом (Murashige & Skoog, 1962)

НОК – нафтилоцтова кислота

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

п.о. – пар основ

GUS – ген β -глюкуронідази

hpt – ген гігромаціцинофосфотрансферази

nos – нопаліновий термінатор

Ті-плазмід – пухлиноутворююча плазмід

X-Gluc – 5-бром-4-хлор-3-індоліглюкуронід

ВСТУП

Рід *Camelina* включає 15 видів рослин, в Україні росте 6 видів, серед яких найбільш широко культивують рижій посівний (*Camelina sativa*), який є найменш вибагливий до умов вирощування порівняно з іншими олійними культурами, який вирощують майже в усіх областях України. Ця однорічна рослина здавна використовується як олійна культура в косметичній, хімічній та харчовій галузях [1, 2]. Серед родичів рижій посівний вирізняється коротким вегетаційним періодом, високою адаптаційною здатністю до абіотичних стресових факторів, підвищеною стійкістю до хвороб та шкідників [3]. Він також характеризується високою холодостійкістю і водночас посухостійкістю [4]. Однією з основних біологічних особливостей рижію є короткий вегетаційний період [5], який у більшості регіонів вирощування культури становить 70-85 днів, що дає змогу після його збирання вирощувати інші культури. Окрім цього, на відміну від інших культур родини хрестоцвітих (*Brassicaceae*), він практично не заселяється шкідниками та не уражується хворобами, що дає можливість значно знизити рівень витрат на його вирощування в період постійного збільшення цін на енергоносії та пестициди [6]. Рижій достатньо врожайна культура: його потенційна врожайність може складати 20-30 ц/га [7-9]. Насіння рижію містить понад 40-50% олії та 25-32% сирого протеїну. Олія рижію широко використовується в багатьох галузях народного господарства, а саме завдяки унікальному співвідношенню жирних кислот, має великі перспективи для використання в енергетичній галузі, харчовій промисловості та в медицині. Макуха рижію багата на азотисті речовини та олії, що дає змогу відносити її до високопоживних кормів. У нинішній час інтерес до рижію в значній мірі поновлюється саме завдяки його перевагам як олійної культури для виробництва біодизеля [10-16]. Для України надзвичайно актуальним є збільшення посівів нових високопродуктивних сортів *Camelina sativa* для комплексного використання як енергетичної (основна продукція), кормової (побічна

продукція), сидеральної культури. Саме тому у відділі нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка було створено цінний генофонд рижію, який нараховує близько 20 таксонів [9].

Відомо, що використання методів культури клітин та тканин в умовах *in vitro* є важливою передумовою для подальших клітинно- і генно-інженерних маніпуляцій з сільськогосподарськими видами. Біотехнологічні прийоми дозволяють отримувати рослини з підвищеним вмістом олії та її поліпшеними харчовими характеристиками, підвищеною стійкістю до різних захворювань та інших абіотичних факторів. На сьогоднішній день є дві роботи, що стосуються введенню в культури *in vitro* і регенерації рослин *C. sativa* [17, 18]. Щодо генетичного вдосконалення цієї культури, то опубліковано лише кілька робіт та два патенти по генетичній трансформації рижію посівного [19-23].

Актуальність теми. Як наслідок глобальної залежності від викопного палива в світі постало питання пошуку нових джерел біопалива. Серед основних шляхів вирішення даної проблеми є широке застосування технологій виробництва біодизеля із рослинної олії [24-27]. Розробка методів отримання палива із відновлюваних ресурсів та покращення його технологічних характеристик та екологічних параметрів на сьогодні є особливо актуальною, у зв'язку із виснаженням джерел дешевого викопного палива, з одного боку, та загостренням проблеми антропогенного впливу і, як наслідок, виникненням глобальних кліматичних змін, з іншого боку [12]. На сьогоднішній день ринок біодизелю в Україні знаходиться на початковому етапі розвитку: його виробництво здійснюється в експериментальних цілях, проводяться тестові випробування техніки, що працює на біодизелі; розробляються регіональні програми, що включають плани по будівництву заводів.

На сьогодні значну частку серед поновлюваних моторних палив складає біодизель, який виробляється в основному з ріпакової олії. Інтерес до біопалива спонукав дослідників критично оцінити альтернативні джерела сировини для виробництва біодизеля. Один із способів подолати попит на олії є використання неїстівних олійних рослин. Серед таких культур особливий інтерес представляє рижій посівний *Camelina sativa*, який вирощують майже в

усіх областях України. Останнім часом, саме рижій розглядають як об'єкт для виробництва біодизелю, оскільки він є перспективною та дешевою олійною культурою. До того ж властивості *C. sativa* для виробництва біодизеля вже добре досліджено [11, 12; 28-31]. Понад 10 років тому було отримано багатообіцяючі результати у випробуваннях двигуна з використанням біодизеля з рижію в якості палива [28], а на сьогоднішній день ряд авіакомпаній вже використовують дане паливо для літаків. Вміст олії в його насінні складає приблизно 38-43%, а переважна частина вмісту жирних кислот (>90%) представлена ненасиченими жирними кислотами, включаючи значну кількість С20:0 ейкозадієнової кислоти, котра порівняно рідко зустрічається в рослинній олії, а також ліноленову (36,2-39,4%), олеїнову (12,8-14,7%), лінолеву (16,3-17,2%) та ейкозенову (14-15,5%) кислоти [32].

Рижій є досить врожайною культурою: його потенційна врожайність може складати 20-30 ц/га [8, 9, 30]. Вихід олії, який можна отримати із рижію, за різними оцінками складає від 400 до 850 кг/га та є співставним із відповідними показниками для *Brassica juncea* та *Brassica rapa*, і вищим за показники для сої [12, 33]. Порівняно із канолою, маючи дещо нижчий вихід за кількісним показником, олія із рижію за собівартістю потенційно є вдвічі дешевшою через значно менші витрати на добрива і зрошування, потрібні для вирощування рижію [34-36]. Рижій, як скоростигла культура, вирізняється коротким вегетаційним періодом, високою адаптивною здатністю до абіотичних стресових факторів, стійкістю до хвороб та різних шкідників [4, 6, 37].

Загалом факторами, сприятливими для використання рижію у сучасних біотехнологічних розробках та інженерії рослин-продуцентів цільових сполук ліпідної природи, є ряд наступних характеристик: високий вміст олії у насінні, надзвичайно велика різноманітність жирних кислот та широкі можливості метаболічної інженерії, зокрема шляхом редагування генома, короткий життєвий цикл, що дає можливість подвійного вирощування за сезон, наявність весняних та зимових різновидів для оптимізації сільськогосподарського циклу сівозміни, невибагливість до умов, здатність

зростати на неродючих землях з малою кількістю опадів без суттєвого зниження продуктивності, низька потреба у добривах.

Традиційно покращення певних господарських характеристик олійних культур досягається шляхом селекції або ж з використанням біотехнологічних підходів. Відомо, що різноманітні біотехнологічні методи дозволяють створювати нові високопродуктивні форми та сорти, маніпулювати складом певних компонентів, в тому числі і жирних кислот. Коли в 2009 р. нами були розпочаті дослідження по використанню цих методів по відношенню до певних сортів і сортозразків *C. sativa*, на той момент існувала лише невелика кількість подібних робіт по рижію [17, 19, 20].

Отже, для більш ефективного використання даної культури у якості альтернативного джерела біодизеля важливим є використання сучасних біотехнологічних методів, які дозволяють отримувати рослини з новими заданими ознаками, зокрема, підвищення врожайності та збільшення вмісту олії в насінні. Тому, введення в культуру *in vitro* та створення генно-інженерним шляхом генетично покращених ліній рижію посівного було і залишається надзвичайно важливим завданням біотехнологічного вдосконалення цього виду рослин, зокрема і його певних високопродуктивних генотипів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота була виконана в рамках бюджетних тем відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи „Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України“: „Введення в культуру *in vitro* та генетична трансформація рижію з метою покращення його продуктивних характеристик для виробництва біодизелю“ цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України „Біомаса як паливна сировина“ („Біопаливо“), 2010-2012рр.; НТП „Розробка та промислове випробування дослідної технології отримання дизельного біопалива на основі сировини рижію як альтернативної олійної культури. “ 2012 р (№ д/р 0112U001999); „Завершення розробки технологічного циклу

отримання біодизелю з рижію та його промислове випробування“, 2013 р. (№ д/р 0113U001872).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було проаналізувати морфологічні та біохімічні характеристики нових ярих сортів і сортозразків рижію української селекції з метою введення в культуру *in vitro*, розробити ефективний метод регенерації рослин рижію з різних типів експлантів та здійснити генетичну трансформацію досліджуваних зразків за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* в умовах *in vitro* та за використання методу *in planta*, порівнюючи ці два методи. Згідно з поставленою метою до завдань експериментальної роботи входило:

1. Провести порівняльний аналіз морфологічних та біохімічних характеристик 12 досліджуваних ярих сортів і сортозразків рижію посівного та відібрати найбільш перспективні з них.

2. Підібрати оптимальні умови для введення в культуру *in vitro* перспективних сортів і сортозразків рижію посівного.

3. Визначити тип експлантів, а також дослідити вплив регуляторів росту на ефективне пагоноутворення та укорінення рослин рижію в умовах *in vitro*.

4. Провести порівняльну характеристику регенераційної здатності різних сортів і сортозразків рижію в культурі *in vitro* для відбору генотипів, найбільш придатних для подальшої генетичної трансформації.

5. Провести генетичну трансформацію *C. sativa*, опосередковану *Agrobacterium tumefaciens*, в умовах *in vitro* та *in planta* з метою порівняння ефективності використання обох методів для перенесення чужорідних генів.

6. Провести гістохімічний і молекулярно-генетичний аналіз трансформованих ліній *C. sativa* та порівняти частоту генетичної трансформації *C. sativa*, опосередкованої *A. tumefaciens*, в умовах *in vitro* та *in planta*.

Об'єкт дослідження. Біотехнологічні підходи щодо удосконалення рижію посівного *Camelina sativa* сортозразків та сортів української селекції.

Предмет дослідження. Морфофізіологічні та біохімічні особливості 12 сортів і сортозразків рижію посівного, особливості введення їх в культуру *in vitro* та генетичної трансформації рослин *C. sativa*.

Методи дослідження. Морфологічні та біохімічні методи; методи культури органів і тканин *in vitro*; методи генетичної трансформації; молекулярно-генетичний аналіз (метод полімеразної ланцюгової реакції); методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено порівняльний аналіз морфофізіологічних та біохімічних характеристик високопродуктивних генотипів *C. sativa* української селекції, а саме: сортозразків ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ, ФЕОРЖЯФЧП, сортів: Перемога, Євро-12, Міраж, Клондайк. Встановлено, що всі сортозразки та сорти рижію характеризуються високим продукційним потенціалом та вирізняються за морфологічними особливостями та урожайними характеристиками, серед них два сорти Перемога та Євро-12 та один сортозразок ФЕОРЖЯФ-4 мають суттєву перевагу. Підібрано оптимальні умови для введення в культуру *in vitro* досліджуваних сортозразків і сортів *C. sativa*, а також для ефективного пагоноутворення та укорінення рослин рижію. Встановлено, що для індукції пагоноутворення рижію посівного найкраще використовувати експланти як сім'ядольних листків, так і сегменти гіпокотилів 5- або 7-денних проростків. Продемонстровано, що генетична трансформація методом *in planta* є більш ефективним методом перенесення цільових генів в геном рижію посівного.

Практичне значення одержаних результатів. Здійснено біохімічний аналіз 12 досліджуваних сортозразків та сортів рижію ярого української селекції, який може зайняти важливе місце у виробництві олії та створення високобілкових кормів. За результатами жирнокислотного

складу визначено сортозразки та сорти, які можуть бути використані, як сировина для виробництва біодизелю. Розроблено методи введення в культуру *in vitro* та ефективної регенерації рослин досліджуваних сортозразків і сортів *C. sativa*, які можуть бути рекомендовані для використання в різних біотехнологічних програмах цього виду. Визначено особливості здійснення агробактеріальної трансформації рижію посівного, які можуть слугувати основою для подальшого генетичного удосконалення цього виду та підвищення ефективності використання його для продукції біодизелю.

Особистий внесок здобувача. Постановку наукових завдань досліджень, наступну інтерпретацію отриманих результатів, підготовку матеріалів до публікацій та розробку структури дисертаційної роботи було здійснено спільно з науковим керівником. Під час виконання дисертації здобувач користувалась консультаціями та практичною допомогою д.с.-г.н., проф. Рахметова Д. Б., к.б.н. Шиші О.М. і к.б.н. Баєр Г.Я.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на: Міжнародній науковій конференції „Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках” (м. Київ, Україна, 15-17 вересня, 2010 р.); Міжнародна наукова конференція „Современные аспекты генетической инженерии растений“. (м. Київ, Україна, 30 травня-1 червня, 2011 р.); VII Міжнародній науковій конференції „Фактори експериментальної еволюції організмів“, присвяченій 110-річчю від дня народження Л.М.Делоне. (м. Алушта, Крим, Україна, 19-23 вересня, 2011 р.); I-й конференції молодих вчених „Біологія рослин та біотехнологія“ (м. Біла Церква, Україна, 5-7 жовтня, 2011 р.); XII конференції молодих вчених „Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів“ (м. Київ, Україна, 15-16 листопада, 2012 р.); Міжнародній конференції „Геноміка рослин та біотехнологія“ та II-й конференції молодих учених „Біологія рослин та біотехнологія“ (м. Київ, Україна, 23-

24 грудня, 2013 р.); Материалы VI Международной научно-практической конференции „Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)“ (м. Ялта, Крым, Україна, 12 – 17 жовтня, 2014 р.); Науковій конференції в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України – Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії „Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив“, (м. Київ, Україна, 9-10 вересня, 2014 р.); X Міжнародній науковій конференції „Фактори експериментальної еволюції організмів“ (м. Умань, Україна, 14-18 вересня, 2015 р.); XI Міжнародній науковій конференції „Фактори експериментальної еволюції організмів“ (м. Одеса, Україна, 12-16 вересня, 2016 р.); III конференції молодих учених „Біологія рослин та біотехнологія“, (м. Київ, Україна, 16 – 18 травня, 2017 р.).

Публікації. За результатами роботи опубліковано 14 наукових праць, у тому числі п'ять статей у фахових наукових виданнях.

Структура і обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 128 сторінках комп'ютерного тексту, яка складається зі анотації, вступу, 6 розділів, висновків, списку використаної літератури (314 найменувань) та містить 21 таблицю і 33 рисунки.

Подяки. Автор висловлює щирі подяки науковому керівнику зав. відділу клітинної біології та біотехнології д.б.н., професору, чл.-кор. НАН України Ємець А.І. та д.б.н., проф., академіку НАН України Блюму Я.Б. Автор дякує за підтримку і практичну допомогу у проведенні досліджень д.с-г.н., проф. Рахметову Д.Б., к.б.н. Баєр Г.Я. та к.б.н. Шиші О.М.

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ХРЕСТОЦВІТИХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Родина хрестоцвітих (*Brassicaceae*) налічує близько 338 родів і близько 3700 видів [38], більшість з цих таксонів розповсюджені в помірних широтах Північної півкулі [39]. До складу родини входять широко відомі олійні, овочеві, кормові і медоносні культури, основна роль серед яких належить роду *Brassica*. На сьогоднішній день найважливішим видом цієї родини є ріпак (*Brassica napus*), який посідає друге місце у світі по валовому збору рослинної олії [40]. З ріпаку виробляють харчову й технічну олії, а отриманий після переробки насіння шрот використовують як цінний корм у тваринництві. В останні роки ріпакова олія набула великого значення як сировина для виробництва біодизельного пального. Для отримання олії вирощують та постійно збільшують посіви й інших видів цього роду: *B. nigra*, *B. juncea*, *B. carinata*. А такі види як, наприклад, *Crambe abyssinica*, *Camelina sativa* та *Eruca vesicaria* розглядаються як перспективні для виробництва харчових олій з новими властивостями для різних сфер, біодизельного палива та біопродуктів в сільському господарстві [32, 41, 42].

Багато представників цієї родини є цінними овочевими культурами, зокрема *B. oleracea*, *Raphanus sativus*, *Armonica rusticana*. Як столові або кормові культури використовують також пекінську (*B. pekinensis*) та китайську (*B. chinensis*) капусти, чорну (*B. nigra*) та білу (*Sinapis alba*) гірчиці, редьку та редиску (*Raphanus sativus*). Площі посівів рослин-представників цієї родини постійно зростають, нові види вводяться у вирощування. Таке поширення стало наслідком продуктивної селекції хрестоцвітих з активним залученням у процес

створення нових сортів результатів досліджень як в області класичної селекції, так і генетичної інженерії [43-46]. Родина також відома своїми більш ніж 120 бур'яновими видами, деякі з них є важливими багатофункціональними сільськогосподарськими бур'янами (наприклад, гірчиця польова (*Sinapis arvensis*)) та талабан польовий (*Thlaspi arvense*). Деякі з цих споріднених видів можуть горизонтально обмінюватися генами, зокрема генами стійкості до гербіцидів, в природних польових умовах [47, 48], потенційно збільшуючи засміченість. Іншим представником родини хрестоцвітих, котрий в останні роки набув важливого значення в наукових дослідженнях є *Arabidopsis thaliana*. Ця рослина стала модельним об'єктом в експериментальній біології та інших дослідженнях рослин, завдяки невеликому розміру геному, який було повністю секвеновано, та короткому життєвого циклу [49].

1.1. *C. sativa* та перспективи її використання

Рижій належить до порядку каперсоцвіті (*Capparales*), роду *Camelina*. Рід *Camelina* включає 15 видів, в Україні зустрічається 6 видів, з них широко культивується у виробництві рижій посівний ярий (*Camelina sativa*), рідше – рижій озимий (*Camelina pilosia*) [50].

Рижій посівний з'явився в культурі з бур'янистих форм. У його еволюції основне значення зіграв несвідомий відбір таких форм, які цілком пристосувалися в засміченнях льону й згодом були взяті в чисту культуру [51]. На території України на початку ХХ століття рижій вирощувався в Полтавській, Чернігівській, Київській та Херсонській губерніях. Рижій був відомий і в Європі ще з часів бронзового віку [52], коли його вирощували та використовували як олійну культуру в районах Центральної Європи. Практикували посіви рижію і в Середній Азії, головним чином, отримання олії для освітлення та фарбування та

харчових потреб. Донедавна рижій належав до переліку культур, використання яких історично було відсунуте на другорядний план у зв'язку із уніфікацією підходів господарювання та концентруванням на екстенсивному вирощуванні кількох основних олійних культур, таких як олійна пальма, соя, соняшник [53]. Проте на сьогодні, у зв'язку із диверсифікацією потреб промисловості і необхідністю створення відновлювальних ресурсів для виробництва палива і багатьох цінних сполук, використання рижію набуває нової популярності у світі [12]. Він успішно культивується у США, Канаді, Франції, Німеччині та Росії позаяк він залишається невинувато забутою культурою в Україні. Варто зазначити, що дослідження показують значну генетичну варіацію за рядом важливих ознак у генотипах рижію, що створює основу для проведення селекції. Селекційна робота, що проводиться у світі, спрямована здебільшого на покращення таких якостей рижію як стійкість до захворювань та абіотичних стресів, підвищення врожайності [16, 54]. Водночас, використання методів генетичної інженерії спрямоване на перетворення рижію у ефективну рослину-продуцента цінних промислових та харчових олій та їх окремих компонентів [55].

Рижій посівний – однорічна рослина з розгалуженими гладенькими або ворсистими стеблами, які стають деревоподібними у зрілих рослин, досягаючи висоти 30–100 см. Листя – ланцетовидної форми з короткими черешками, суцільнокраї або зубчасті. Насіння представляє собою невеликі капсули 0,7-2,5 мм в діаметрі від помаранчевого до коричневого кольору [1].

Це самозапильна, ранньостигла культура, маловибаглива до умов вирощування порівняно з іншими олійними культурами. Характеризується високою холодостійкістю (насіньний матеріал проростає за температури +1 °С, а сходи легко витримують заморозки до –12°С) і, водночас, посухостійкістю [4]. Добре росте на всіх типах ґрунтів, окрім глинистих. Однією з основних біологічних особливостей

рижію є короткий вегетаційний період, який у більшості регіонів становить 70–85 днів [5, 56], завдяки чому його можна вирощувати в усіх регіонах України. Короткий вегетаційний період рижію дає змогу після його збирання вирощувати інші культури, а його використання для зайнятого пару дає змогу добре підготувати ґрунт та накопичити вологу до посіву озимих.

Основний продукт, який отримують з насіння рижію – олія. Насіння рижію містить понад 40-50% олії, яка збагачена багатьма корисними для людини та тварин компонентами [57-59] та 25-32 % сирого протеїну. Олія рижію широко використовується в багатьох галузях, зокрема має великі перспективи застосування в енергетичній галузі, харчовій промисловості та медицині.

Макуха рижію багата на азотисті речовини та олії, що дає змогу відносити її до високопоживних кормів. Солома рижію є відмінною сировиною для виробництва паперу низьких сортів тощо, може використовуватися як кормова сировина для введення в раціон овець і птиці, а також – як підстилка для худоби. Зі стебел рижію також виготовляють пензлі, пакувальні матеріали і тимчасові покрівлі для будинків. Солома може служити альтернативним джерелом енергії при спалюванні її у формі брикетів у спеціальних теплових установках [60].

Однією з головних причин інтересу до *Camelina sativa* є склад рижієвої олії, яка багата на незамінні жирні кислоти і характеризується високим вмістом поліненасичених жирних кислот, порівняно з поширеними рослинними оліями, такими як соєва, соняшникова, ріпакова, оливкова олії тощо [57, 61-63]. Близько 54 % жирних кислот – поліненасичені (лінолева (18:02) і ліноленова (18:03)), 34 % – мононенасичені, переважно олеїнова (18:01) і ейкозенова (20:1) [1, 64], які є природними антиоксидантами [65-69] та виявляють регенераційні властивості [70, 71]. Останнім часом проводяться дослідження ефективності застосування олії рижію в медицині для профілактики та

лікування ряду захворювань. Лінолева кислота, що є попередниками ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот – основний будівельний матеріал для синтезу простагландину E-1. Останній є головним серед ейкозаноїдів, що забезпечує захист організму від раку, артриту, алергії, астми, передчасного старіння. Арахідонова та α -ліноленова кислоти є засобами для профілактики імунних порушень, серцево-судинних захворювань, а також важливими компонентами для лікування хронічних захворювань нирок, нефропатій, хронічної ниркової недостатності [72-74].

Олеїнова кислота перешкоджає утворенню холестеринових бляшок на стінках судин. Вона має нижчу активність, ніж омега-3 і омега-6 кислоти, але краще засвоюється організмом. Споживання даної жирної кислоти позитивно впливає на стан здоров'я людини та тварин, сприяє зниженню вмісту холестерину у крові [75]. Цінною промисловою сировиною є ерукова кислота. Сорти рослин з високим вмістом ерукової кислоти в олії широко використовуються для виробництва біопалива [3, 70, 76]. У Північній Америці та Європі *S. sativa* дедалі ширше використовується для виробництва біодизелю [10].

Також олія рижю характеризується високим вмістом жиророзчинних вітамінів [71, 77, 78]. Зокрема вона містить значно більше каротиноїдів, ніж соняшникова, соєва та інші олії (0,5-2,0 мг %). Олія рижю також може бути цінним джерелом вітаміну E, який також присутній у ній в значній кількості – 104,9 мг %. Із мікроелементів найкраще представлений магній, який є важливим у харчуванні людини, оскільки входить до складу ферментів і важливий для процесу синтезу білків. Окрім того показано, що використання насіння рижю як добавки до кормів для птиці, або великої рогатої худоби значно підвищує вміст омега-3-ненасичених жирних кислот у яйцях, та молоці, відповідно, отриманих від цих тварин [79, 80]. Таким чином, за рахунок

використання кормів із рижію, існує можливість підвищення харчової цінності цих продуктів для людини.

У ході багаторічних досліджень, проведених в Північній Америці, встановлено, що урожайність рижію можна порівняти з урожайністю інших насінневих олійних культур, включаючи ріпак [1, 81]. Від інших представників родини хрестоцвітих він відрізняється тим, що менше вражається хворобами та більш стійкий до блішок хрестоцвітих, у порівнянні з іншими видами *Brassica*. Рижій також володіє стійкістю до грибів *Leptosphaeria maculans* і *Alternaria brassicae*, що викликають у хрестоцвітих фомоз та альтернаріоз, відповідно [82-85]. Це, в свою чергу, за умов зростання цін на енергоносії та пестициди, дає можливість значно знизити рівень витрат на вирощування рижію [6]. Окрім того, виявлено генотипи рижію зі стійкістю до білої гнилі (склеротиніозу), бурої оперізуючої гнилі, несправжньої борошнистої роси [86], і ці генотипи можна використовувати для поширення корисних ознак серед промислових сортів.

Рижій є досить врожайною культурою: його потенційна врожайність може складати 20-30 ц/га [7-9]. Вихід олії, який можна отримати із рижію, за різними оцінками складає 1000-1300 кг/га та є співставним з відповідними показниками для *Brassica juncea* та *Brassica rapa*, і вищим за показники для сої [12, 33]. Порівняно із канолою, маючи дещо нижчий вихід за кількісним показником, олія із рижію за собівартістю потенційно є вдвічі дешевшою через значно менші витрати на добрива і зрошування, потрібні для вирощування рижію [32, 34-36, 87].

1.2. Рижій як альтернативне джерело біодизельного палива

Біодизель – це екологічно чистий вид палива, який одержують із жирів рослинного та тваринного походження та використовують для

заміни нафтового дизельного палива [88]. Це пальне, яке є сумішшю метилових та/або етилових ефірів насичених і ненасичених жирних кислот [24]. Популярність біодизелю як альтернативного виду палива зросла за останні десятиліття [89]. В залежності від регіону світу сировиною для виробництва біодизелю слугують жирні, рідше ефірні олії різних рослин або водоростей: у США – сої, в Європі – ріпаку, в Канаді – каноли, в Індії – ятрофи, на Філіппінах – кокосової олії, в Бразилії – касторової олії, в Африці – сої, ятрофи. Як вже згадувалося, одним із найбільш перспективних видів рослин для отримання біодизелю є рижій посівний (*Camelina sativa* (L.) Crantz), який вже використовують з цією метою у Північній Америці та Європі [29-31]. Варто зазначити, що розробка методів отримання палива із відновлюваних ресурсів та покращення його технологічних характеристик і екологічних параметрів на сьогодні є особливо актуальною, у зв'язку із виснаженням джерел дешевого викопного палива, з одного боку, та загостренням проблеми антропогенного впливу і, як наслідок, виникненням глобальних кліматичних змін, з іншого боку [12].

Біодизель при потраплянні у навколишнє середовище не чинить такого негативного впливу на екосистеми, як традиційні види палива [90-92]. Крім того, він піддається практично повному біологічному розпаду: у ґрунті або у воді мікроорганізми за 28 днів переробляють 99 % біодизеля, що усуває можливість накопичення забруднень у екосистемах при вивільненні даного пального. При згорянні біодизеля виділяється така ж кількість вуглекислого газу, яку було спожито з атмосфери рослиною, що є вихідною сировиною для виробництва олії, за весь період її життя. Біодизель у порівнянні зі звичайним дизельним паливом майже не містить сірки, що є позитивним аспектом з точки зору екології. Температура займання біодизеля перевищує 100 °С, що

дозволяє назвати це біопаливо відносно безпечною речовиною. За його використання викиди в атмосферу CO₂ знижуються у 2 рази.

У ряді країн світу вже застосовуються бензини з 10-15 % різних паливних домішок [93-97]. Зокрема, суміш бензину з етанолом (10-12%), особливо успішно використовується у США і Канаді, а також у Бразилії, де її виробництво здійснюється на основі національної програми. У США 80 % виробленого етанолу використовується як паливо. Використання біопалива з відновлювальних ресурсів в країнах членів ЄС становить 2 % в рік і до 2010 року збільшилась до 6 %.

За попередніми даними, потреба України в біопаливі становила понад 200 тис. т у 2006 р., а в 2010 р. – понад 500 тис. т. Лідером по виробництву біопалива є Німеччина. Об'єм виробництва біопалива в 2010 р. становив близько 1,2 млн. т або до 3,5 % від загального споживання дизельного палива в країні. Прогнозні розрахунки виробництва біодизельного пального свідчить, що в 2020 році обсяг цього виробництва може становити близько 6 млн. т. [98].

Вважається, що найбільш перспективною для України сировиною для виробництва біодизеля є хрестоцвіті культури, особливо ріпак. В меншому обсязі застосовується соняшникова та соєва олії.

Державним Університетом Монтани було проведено багаторічний дослід, що включав вивчення дев'яти різних олійних культур (соняшника, сафлору, сої, рапсу, гірчиці, льону, крамбе, каноли та рижію) [99]. За результатами дослідження рижій (*C. sativa*) було охарактеризовано як дуже перспективну та дешеву олійну культуру для виробництва біодизелю [7, 11, 28]. У результаті вивчення можливості використання олії рижію як вихідної сировини для виробництва біодизельного палива було показано, що отриманий з олії рижію метиловий ефір мав такі ж властивості, як і метиловий ефір, отриманий з олії ріпаку. Винятком був високий вміст йоду, який покращує якість

мастила. Також за даними, що наведені в табл. 1.1, за вмістом ерукової кистоти *Camelina* займає друге місце після ріпаку [13].

Таблиця 1.1

Склад жирних кислот в оліях з різних культур, %

Джерело олії	Рижій	Соя	Соняшник	Ріпак
Пальмітинова	7,5	11,6	6,1	3,3
Стеаринова	4,0	4,6	6,4	1,7
Олеїнова	14,9	23,9	24,8	18,1
Лінолева	21,4	52,0	61,7	14,1
Ліноленова	31,7	6,8	0,1	7,7
Арахінова	5,1	0,3	0,4	2,8
Гондоїнова	11,8	0,2	0,2	8,2
Ерукова	3,3	0,4	0,3	44,2

Протягом останніх десятирічь основними олійними культурами є олійна пальма (*Elaeis guineensis*), соя (*Glycine max*), ріпак (*Brassica napus*) та соняшник (*Helianthus annuus*) [26]. Водночас, швидке зростання потреб у цій сфері стимулює залучення нових або нереалізованих сільськогосподарських олійних культур, здатних рости на землях з пониженою родючістю, в аридних та напіваридних кліматичних зонах, непридатних для вирощування найбільш поширених перерахованих олійних рослин. Важливим аспектом також є розширення хімічної функціональності олій, оскільки основні сьогоденні олійні культури мають досить одноманітний жирнокислотний склад, а ряд альтернативних культур дозволяють синтезувати олії із різними властивостями та для широкого кола застосувань [100].

Окрім того, поширення набуває позиція, згідно якої виробництво неїстівних олій та незвичайних жирних кислот для промисловості має

здійснюватися за використання рослин, що не є поширеними харчовими культурами, з метою зменшення ризику включення неїстівних продуктів у харчові ланцюги в результаті аут-кросингу. Серед альтернативних культур, що володіють розширеними можливостями синтезу жирних кислот та сприятливими агрономічними характеристиками, часто розглядають ефіопську гірчицю (*B. carinata*), крамбе (*Crambe abyssinica*), рижій (*C. sativa*), а також представника родини *Euphorbiaceae* – ятрофу (*Jatropha curcas*) [14]. При цьому, саме рижій розглядається як найбільш перспективна культура для метаболічної інженерії. Нещодавно геном рижію було секвеновано та показано, що надзвичайно велику його частку складають гени, які регулюють метаболізм ліпідів, – 217 % у порівнянні із арабідопсисом, що, у свою чергу дозволяє припускати наявність складного механізму регуляції біосинтезу олій та можливостей для його спрямованої зміни [29].

Водночас, підходи метаболічної інженерії, розроблені для арабідопсису можуть бути значною мірою екстрапольовані на рижій, оскільки аналіз геномних послідовностей показав, що більше 90 % генів арабідопсису, задіяних у метаболізмі ліпідів, також присутні у геномі рижію [101, 29]. Схожі результати отримано при транскриптому аналізі насіння рижію, який показав, що близько 80 % експресованих генів, пов'язаних із ліпідним метаболізмом, були на 80 % та більше ідентичні до ортологів арабідопсису [102].

Загалом факторами, сприятливими для використання рижію у сучасних біотехнологічних розробках та інженерії рослин-продуцентів цільових сполук ліпідної природи є ряд наступних характеристик: високий вміст олії у насінні, надзвичайно велика різноманітність жирних кислот та широкі можливості метаболічної інженерії, зокрема шляхом редагування генома, короткий життєвий цикл, що уможливорює подвійне вирощування за сезон, наявність весняних та зимових різновидів для оптимізації сільськогосподарського циклу сівозміни,

невибагливість до умов, здатність зростати на неродючих землях з малою кількістю опадів без суттєвого зниження продуктивності, низька потреба у добривах [27, 102-104]. При цьому, рижій здатний забезпечувати врожайність на рівні із провідними олійними культурами, особливо при вирощуванні у субоптимальних умовах [12, 36]. Таким чином, вирощування рижію для потреб промисловості не обов'язково асоційоване зі заміщенням площ, що раніше використовувалися для вирощування харчових культур, площами для технічних культур. Навпаки, невибагливість рижію до умов вирощування дозволяє вирощувати його на площах, непридатних для вирощування харчових рослин. Водночас, як уже згадувалося раніше, на родючих площах, рижій, завдяки короткому вегетаційному циклу, можна комбінувати із вирощуванням інших культур протягом одного сезону [103, 105]. Так, показано, наприклад, що при вирощуванні протягом сезону на одній площі послідовно двох культур рижій-соя та рижій-соняшник загальний економічний ефект був вищими, ніж при вирощуванні відповідних монокультур (соя та соняшник, відповідно) [103]. При цьому, варто зазначити, що за існуючими оцінками біодизель, отриманий із рижію, потребує при виробництві менших затрат невідновлюваних ресурсів та асоційований із зниженням викиду парникових газів при виробництві майже вдвічі, порівняно із виробництвом дизельного пального або біодизелю з інших олійних рослин [81, 106, 107]. Таким чином, завдяки значному потенціалу у продукції сполук ліпідної природи для багатьох галузей, зокрема виробництва біопалива, біотехнологічні розробки із використанням рижію є одним із пріоритетних напрямків сучасних досліджень [26]. Окрім того, зважаючи на невибагливість, скоростиглість та невисоку собівартість рижію, існують підстави на масштабне вирощування його в Україні для переробки на біодизель.

1.3. Особливості введення та регенерація представників родини *Brassicaceae* в культуру *in vitro*

Для хрестоцвітих, як і взагалі для рослин, не існує універсального підходу для отримання високоефективної системи органогенезу. Більшість представників цієї родини є зручним об'єктом для маніпуляцій *in vitro* [108]. Перші роботи по регенерації рослин хрестоцвітих розпочалися ще у 70-х роках минулого століття [109]. На сьогоднішній день розроблено ефективні методики органогенезу для багатьох видів та сортів цієї родини.

Дослідження Murata & Orion, 1987 [110] вперше показали, що регенерацію пагонів в культурі *in vitro* найпростіше отримати у *B. napus*, *B. oleracea*, а найскладніше – у *B. rapa*. Протоколи регенерації рослин *in vitro* були розроблені для різних експлантів і тканин, зокрема таких, як сім'ядолі [111-115], гіпокотилі [116-119], квітконоси [120, 121], листові сегменти [122], сегменти стебла [123], пиляки і мікроспори [124], корені [125] та протопласти [126-129].

З літературних даних відомо, що тип та вік експланту відіграє важливу роль для індукції калюсо- та пагоноутворення. Було показано, що найбільшою регенераційною здатністю в культурі *in vitro* володіють сегменти гіпокотилів [117, 43], та сім'ядольні листки [111, 130, 131], які мають високий морфогенетичний потенціал. Cardoza & Stewart, 2006 [132] у своїй роботі показали, що сегменти гіпокотилів з 8-10-денних проростків *B. napus* є найбільш оптимальними для отримання більшої кількості експлантів, ніж 3-денні проростки. В той же час Gasic & Korban, 2006 [133] виявили, що для *B. juncea* найкращим джерелом експлантів є 3-4-денні проростки. В обох випадках вирішальним значенням мала довжина сегментів гіпокотилів. Оптимальними виявились невеликі сегменти (5-10 мм), тоді як довгі сегменти мали

тенденцію скручуватись, а отже втрачали контакт з поживним середовищем [134, 135].

Важливу роль у здатності багатьох видів *Brassica* до морфогенезу в культурі *in vitro* відіграє генотип [136-138], оскільки всі клітини є тотипотентними та зберігають генетичну інформацію, необхідну для регенерації цілої рослини. Частота регенерації значно варіює між різними видами і навіть сортами одного виду [139]. При дослідженні семи видів – *B. oleracea*, *B. campestris*, *B. nigra*, *B. hirta*, *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus* – було відзначено, що калюсо-, пагоно- та коренеутворення з сім'ядольних експлантів істотно відрізнялися [110]. Наприклад, ефективність індукції калюсогенезу в *B. juncea*, *B. napus* була значно нижчою, ніж в інших п'яти видів. Оно & Takahata, 2000 [140], а пізніше Sparrow et al. [141] спостерігали регенерацію поганів з сім'ядольних черешків, використовуючи схрещування *B. napus* та *B. oleracea*. Вони показали, що регенерація пагонів визначається особливостями генотипу. Велика варіація частоти регенерації спостерігалася серед 51-го генотипу *B. carinata* [142]. Серед 123-ох генотипів *Chinese cabbage* (китайська капуста) також відмічали істотне варіювання частоти регенерації, в межах від 0 до 95 % [143] Таким чином, генетична мінливість є потужним інструментом для дослідження основних механізмів переходу з диференційованого і недиференційованого зростання [144].

Гормональний склад живильного середовища є одним з ключових факторів, що впливає на індукцію калюсо- та органогенезу [145-147]. Кількісне співвідношення ауксинів та цитокінінів у середовищі відіграє важливу роль у процесі диференціювання клітин. У ряду представників родини хрестоцвітих формування пагонів відбувається в присутності як цитокінінів, що стимулюють поділ клітин та ініціюють диференціацію пагонів, так і при сумісному додаванні в середовище різних комбінацій регуляторів цитокінінової та ауксинової природи. Зазвичай, для

отримання культури *in vitro* найчастіше використовують бензиламінопурин (БАП) та нафтилоцтову кислоту (НОК) [131, 134, 141, 142, 148-151]. Khan et al. [145] дослідили, що серед різних комбінацій і концентрацій регуляторів росту рослин, які використовуються для індукції калюсу *B. napus* 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота) в концентрації 0,5 - 2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК виявились найбільш ефективними. Раніше аналогічні результати були отримані Ali et al., 2007 [152], в той час як деякі інші автори повідомляли про успішні результати, використовуючи лише БАП та НОК [153-155, 135] для *B. juncea*.

Відомо, що на морфогенез, окрім регуляторів росту істотно впливають й інші компоненти живильного середовища. Серед них часто використовують різні вуглеводи, такі як глюкоза, мальтоза, сахароза та крохмаль [131]. При додаванні їх у середовище відбувається модулювання морфогенетичних реакцій і додаткова взаємодія ауксину з вуглеводом [156]. Hildebrandt & Riker [157] показали, що кращим джерелом вуглецю для регенерації пагонів є сахароза. Використання інших компонентів, таких як нітрат срібла та тіосульфат срібла збільшувало частоту регенерації для *B. campestris* [143, 158, 159], *B. juncea* [160]. З іншого боку, група вчених [161] при додаванні нітрату срібла до живильного середовища не спостерігали істотного впливу на частоту регенерації у *B. oleracea*.

1.4. Перенесення чужорідної ДНК в рослини хрестоцвітів

Наявність різних інструментів генетичної інженерії відкриває широкі можливості для введення нових корисних генів агротехнічного значення до геному цінних культур. Застосування таких технологій вимагає розробки надійних і відтворюваних методів привнесення чужорідної ДНК у рослинні клітини та регенерації нормальної фертильної трансгенної рослини в культурі *in vitro*. Важливим методом біотехнології рослин є генетична трансформація, яка передбачає

введення цільових генів [162, 163] що відповідають за підвищення врожайності культур [164-166], поліпшення таких характеристик як стійкість до гербіцидів [167-171], солестійкості [172, 173], комах [174-176], призводять до змін складу олії [119,177-180].

Перші повідомлення про успішну трансформацію представників роду *Brassica* з'явилися наприкінці 80-х – на початку 90-х років для шести економічно важливих видів, таких як *Brassica juncea* [115, 181], *B. napus* [111], *Brassica rapa* [182], *B. oleracea* [117], *Brassica nigra* [183], та *Brassica carinata* [184, 185]. У багатьох наступних публікаціях повідомлялося про вдосконалення умов культивування тканин і використання репортерних генів для визначення ефективності трансформації. Тим не менш, основним обмежуючим чинником, як і раніше, залишалась відповідь тканинної культури та слабка чутливість до *Agrobacterium* багатьох генотипів *Brassica spp.* Пізніше було розроблено протоколи трансформації, застосовні для більш широкого діапазону генотипів рослин-представників різних видів цього роду [186-189]. Найпростіші підходи за використання гіпокотилів та сім'ядолей для трансформації хрестоцвітих культур описано різними авторами у різний час, приклади деяких наведено в Табл. 1.2.

Таблиця 1.2.

Частота *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації деяких видів *Brassicaceae* за використання різних типів експлантів

Вид	Максимальна частота трансформації, %		Посилання
	гіпокотилі	сім'ядолі	
<i>B. oleracea</i>	30	9,5	[117, 189]
<i>B. napus</i>	30	68,1	
<i>B. rapa</i>	1	9	[190, 191]
<i>B. juncea</i>	16	16,2	[133, 192]
<i>B. nigra</i>	33	—	[183]
<i>B. carinata</i>	14	50	[193]

З усіх культивованих видів роду *Brassica*, найбільш складно піддається трансформації *B. rapa*. Проте, було опубліковано кілька успішних робіт, у яких використовували сегменти гіпокотилів [182], сім'ядольні черешки [190; 194], сегменти сім'ядольних листків [195], міжвузля [196], вакуумну інфільтрацію цілої рослини [197] та мікроін'єкцію квіткових бутонів [198, 199].

У більшості інших дослідженнях для трансформації використовували експланти гіпокотилів [119, 161, 200-208], а також сім'ядольні листки [209-211], сім'ядольні черешки [212] або, листові диски [213].

Як альтернативний шлях отримання трансгенних рослин є пряме перенесення генів в реципієнтні клітини. Відсутність посередника між вектором та реципієнтом є головною перевагою, оскільки сконструйована ДНК потрапляє безпосередньо в геном рослинної клітини. Як реципієнтні клітини для перенесення ДНК у більшості робіт використовуються протопласти. Найчастіше джерелами отримання протопластів слугували гіпокотилі, сім'ядольні листки або мезофільні тканини листка [214-216].

Пряме перенесення чужорідної ДНК у мезофільні протопласти з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ) було використане для трансформації *A. thaliana* [217]. Mukhopadhyay et al. [218] розробили ефективний протокол ПЕГ-індукованої трансформації протопластів, ізольованих із гіпокотилів цвітної капусти, в той час як Eimert & Siegemund, 1992 [219] використовували мезофільні протопласти. У 2002 р. було розроблено ефективний протокол трансформації за допомогою ПЕГ та показано високу частоту трансформації цвітної капусти [220].

Ще одним методом прямого перенесення генів у геном рослин є бомбардування мікрочастинками [221] або, так звана, біобалістична трансформація. Суть методу полягає в тому, що на часточки металу (золота чи вольфраму) осаджують ДНК, потім часточки розганяють в установці з використанням тиску гелію і спрямовують в рослини

тканини [222]. Через відносну легкість отримання трансгенних рослин у хрестоцвітих при застосуванні традиційних методів, можливість перенесення генів за допомогою біобалістичної трансформації майже не вивчалась. Лише Chen & Beversdorf, 1994 [223] отримали трансгенні рослини *B.napus* з частотою трансформації 0,6 % при застосуванні даного методу.

Однією із проблем генетичної трансформації є химерність отриманих трансгенних ліній та соматоклональна варіабельність. Оскільки етап регенерації вимагає спеціальних навичок, є трудомістким, потребує витрат часу та реактивів, то розроблялися методи, націлені на вилучення цього етапу із процесу отримання трансгенних рослин. До таких, зокрема, належить трансформація *in planta*. На даний час метод *in planta* трансформації арабідопсису є поширеною практикою і базується на зануренні суцвіття в суспензію *A. tumefaciens* [224-226]. Об'єктом для трансформації агробактерією є насінний зачаток [227]. Тому види, у яких зав'язь залишається відкритою протягом тривалого періоду можуть бути хорошими кандидатами для успішної трансформації *in planta* [228, 229]. Принцип методу залежить від того, на якому етапі розвитку рослини відбувається трансформація.

Так групою вчених [230] було проведено *in planta* трансформацію за допомогою вакуумної інфільтрації дорослих рослин *B. rapa*. Встановлена ефективність трансформації була низькою, проте результат продемонстрував можливість використання даного методу для отримання трансгенних рослин роду *Brassica*. З метою трансформації *B. napus*, Wang et al. [231] використовували метод подвійної інфільтрації. Були проведені також дослідження по трансформації за допомогою методу занурення квіток (суцвіття) для *B. carinata*, *B. napus* [232] та *Raphanus sativus* [233]. Деякі дані щодо ефективності використання різних модифікацій методів трансформації *in planta* наведені в табл. 1.3.

У дослідженні [225] проводили інокуляцію квіткових бруньок *A. thaliana* з суспензією агробактерії, а у дослідженні [233] аналогічний підхід використовували для трансформації *Raphanus sativus*. Для трансформації генеративних тканин арабідопсису було також розроблено вдосконалені методики, засновані на зануренні квіткових бруньок (до розкривання) в суспензію агробактеріальних клітин („floral dip”) без застосування вакууму [234] або на розпилюванні суспензії на суцвітті у вигляді аерозолу („floral spray”) [235].

Таблиця 1.3

**Частота *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації
представників хрестоцвітих методом *in planta***

Модифікація	Вид рослин	Частота, %	Джерело літератури
Вакуумна інфільтрація суцвітть	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,5 – 1,8	[224, 225, 235, 236]
	<i>Arabidopsis lasiocarpa</i>	0,02 – 0,7	[237]
	<i>Brassica rapa</i>	0,01	[230]
	<i>Brassica napus</i>	0,2	[231]
Занурення суцвітть в суспензію агробактерій	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,1 – 3,0	[228 ,235; 238]
	<i>Raphanus sativus</i>	1,4	[233]
	<i>Arabidopsis lasiocarpa</i>	0,03 – 0,5	[237]
Нанесення краплі суспензії на квіткову бруньку	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,3 – 1,0	[234]
Нанесення суспензії агробактерії у вигляді аерозолу на суцвітття	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,3 – 2,4	[235]

1.5. Біотехнологічні розробки для *Camelina sativa*

Хоча рижій раніше був традиційною культурою дрібнотоварного сільгоспвиробництва в Україні, зараз селекційні програми по створенню нових високопродуктивних сортів цієї культури, а також його комерційне виробництво стрімко розвивається [239]. У зв'язку з цим актуальним є вдосконалення методів культури *in vitro* в поєднанні з розробкою ефективних підходів генетичної трансформації рижію для створення цінних ліній та сортів цієї рослини з підвищеною врожайністю, збільшеним розміром насіння, підвищенням вмісту та спрямованою модифікацією складу олії для застосування у харчуванні, виробництві кормів, медицині та енергетичній галузі.

У ряді досліджень для проведення соматичної гібридизації з іншими видами *Brassica* з метою надання покращених властивостей гібридам використовували протопласти рижію [215, 240-242]. Зокрема, Jiang et. al. [242] отримали соматичні гібриди між *Brassica napus* та *Camelina sativa* для підвищення вмісту ліноленової кислоти у *C. sativa*. Ці гібриди були отримані шляхом електрозлиття протопластів. Гібридна природа регенерантів була визначена за допомогою проточного цитометричного аналізу вмісту ядерної ДНК та аналізу маркерів повторення простої послідовності (SSR). Три гібриди між *B. napus* та *C. sativa* продемонстрували специфічний фенотип. Вони мали проміжну за формою морфологію листків, квіток та насіння у порівнянні з двома вихідними видами. Насіння цих трьох гібридів містило модифіковані жирні кислоти та характеризувалося підвищеним рівнем ліноленової та ейкозенової кислоти, порівняно із *B. napus*. Отримані авторами результати вказують на те, що соматичну гібридизацію можна використовувати для передачі геному від *B. napus* до *C. sativa* з метою покращення характеристик рижію.

Як вже згадувалося, рижій демонструє підвищену стійкість до ураження грибами роду *Alternaria*, які спричинюють захворювання на альтернаріоз або чорну гниль у таких представників родини хрестоцвітих, як *B. carinata* та *B. oleracea* [16]. З метою перенесення стійкості від рижію проводили злиття протопластів *C. sativa* та *B. oleracea* за допомогою ПЕГ для подальшого отримання соматичних гібридів [240]. Описано також індукцію утворення ембріодів рижію із мікроспор для отримання подвійних гаплоїдів з метою підвищення цінності сировини рижію для продукції біопалива [243].

На сьогоднішній день опубліковано кілька робіт по введенню в культуру та регенерації рослин рижію *in vitro*. Вперше, у 1999 р. Tattersall & Millam у своїй роботі описали успішне введення рижію в культуру *in vitro*, ними було встановлено оптимальні умови регенерації пагонів з листових експлантів [17]. Методи, які були використані для поверхневої стерилізації насіння [244], дали 95 % його проростання, хоча ріст пагонів в культурі *in vitro* не дав змоги отримати культуру впродовж 28 діб. Показано, що відповідь на коренеутворення з експлантів було підвищено з контрольного рівня 26,4 % до 46,7 % при додаванні 5,4 мкМ ауксину (НОК). Авторами встановлено, що з експлантів листків більш ефективно відбувалася регенерація пагонів і коренеутворення, ніж з експлантів гіпокотилів. Для отримання коренів чи калюсу з листової тканини [245] використовували середовище тільки з ауксином, концентрація якого була вищою за 0,54 мкМ. Показано було також, що на середовищі, яке містило лише цитокінін (БАП) регенерація з експлантів була відсутня, тоді як у комбінації з НОК разом з БАП сприяв регенерації пагонів з утворенням в середньому 10 пагонів на експлант. Регенеровані пагони були успішно пересажені в ґрунт та укорінені для подальшого збору насіння.

Нещодавно опубліковано дві роботи, в яких за результатами досліджень встановлено оптимальні умови регенерації пагонів із різних

типів експлантів рижію [18], та описано результати впливу умов культури *in vitro* на параметри росту *C. sativa* (cv. *Calena*) для проведення генетичної трансформації [23].

Оскільки *C. sativa* та *A. thaliana* являються представниками однієї родини *Brassicaceae* [246, 247], то для генетичної трансформації рижію можна використовувати аналогічні протоколи, що зазвичай використовуються для трансформації *A. thaliana*. Так, Lu & Kang у 2008 р. опублікували роботу, присвячену отриманню трансгенних рослин *C. sativa* методом занурення квітів у суспензію клітин агробактерії [19]. Для покращення якості олії та інших агрономічних характеристик рослин *Camelina*, було використано ефективний метод трансформації *in planta*, розроблений раніше для *Arabidopsis thaliana* [225]. Метод включав інокуляцію агробактерією на початку цвітіння рослин разом з процедурою вакуумної інфільтрації. Частоту трансформації оцінювали шляхом детекції сигналу флюоресцентного білка (DsRed) у зрілому насінні. Цей маркер раніше був розроблений для відбору трансгенного насіння *Arabidopsis thaliana*, який дозволив зручно демонструвати трансгенне насіння з великої кількості нетрансформованого насіння [248, 249]. За допомогою описаного методу, було одержано понад 1 % трансгенного насіння. З метою підтвердження здатності рижію виступати продуцентом жирних сполук, було проведено його трансформацію геном *FAH12*, за використання гена *DsRed* як репортерного маркерного гена. Аналіз метилових ефірів жирних кислот за допомогою газової хроматографії виявив, що усе насіння акумулювало нові жирні кислоти, які до цього були виявлені у трансформованому геном *FAH12* арабідопсисі. Генетичний аналіз показав, що більша частина трансгенних рослин містила одну копію чужорідного гена, а всі рослини, що демонстрували експресію репортерного гена, містили також ген *FAH12*. Загалом, на основі отриманих результатів автори підкреслили значний потенціал рижію як

рослину-продуцента цільових сполук для харчової, паливної та фармацевтичної промисловостей [19].

Нещодавно тако було розроблено методику трансформації рижію *in planta*, яка базувалась на зануренні квіток (до розкриття) в суспензію агробактеріальних клітин без використання вакуумної інфільтрації [22]. Авторами у дослідженні було використано чотири сорти рижію Ames 26665, Calena A3U7761, Ames 1043 і Celine та три штами *A. tumefaciens* (GV3101, ЕНА105, At503). Так, два сорти (Ames 1043 і Celine) з чотирьох відрізнялись за частотою трансформації, яка знаходилась в межах 0,17 – 0,75 %. У результаті було показано, що використання штаму ЕНА105 виявилось менш ефективним, оскільки частота трансформації за його використання була нижчою, ніж при використанні штамів GV3101 та At503. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу було встановлено, що близько 78 % трансгенних рослин містило одну копію чужорідного гена.

Метою сучасних біотехнологічних розробок по генетичній трансформації рижію є оптимізація жирнокислотного складу для паливної і харчової промисловостей. Проте, робіт у цій сфері досі небагато. У 2009 р. опубліковано американський патент по трансформації *S. sativa* за допомогою *A. tumefaciens* [20], в якому описується технологія отримання трансформованих рослин рижію з можливістю подальшої продукції гомологічних та гетерологічних рекомбінантних продуктів, таких як білки, ферменти, олії тощо. Описано трансформацію листових експлантів рижію та отримання регенерантів на середовищі МС, що містило 0,7 мг/л БАП, 0,25 мг/л НОК, а також 200 мг/л карбеніциліну або цефотаксиму та 15 мг/л карбеніциліну. Основними етапами розробки були стерилізація насіння, вибір експлантів, підбір умов культивування отриманих рослин з експлантів, розробка методу регенерації трансформованих рослин, підбір штаму агробактерії та вектору для трансформації.

Основним обмеженням використання рослинних олій в паливно-мастильній промисловості, наприклад виготовлення біодизеля є окислювальна стійкість, яка страждає від високого вмісту поліненасичених жирних кислот у олії. Kang et al. [250] отримали трансгенні лінії *C. sativa*, які накопичували до 50 % олеїнової кислоти у загальній фракції та мали знижений, у порівнянні з диким типом, вміст поліненасичених жирних кислот на рівні 17 %, використовуючи сайт-специфічну супресію гена *FAD2* (ген десатурази жирних кислот) у насінні рижію. Окрім того, було відмічено відсутність зниження вмісту жирних кислот з кількістю атомів карбону у ланцюзі C20 та C22. Для експресії генів *FAD2* та *FAEI* (ген елонгази жирних кислот) у насінні рижію використовували також метод РНК інтерференції (РНКі), що дозволило досягти накопичення олії із вмістом олеїнової кислоти у загальній фракції жирних кислот на рівні 70 % [102]. У олії з насіння із подвійним вектором генів *FAD2/FAEI* містилося лише 12 % поліненасичених жирних кислот, у порівнянні із 53-ма % від загальної фракції жирних кислот у олії з насіння дикого типу. Найбільш важливим було те, що також знижувався вміст жирних кислот з кількістю атомів карбону у ланцюзі C20 та C22 із 17 % до 4 % у дикого типу.

Також важливими компонентами, при виробництві біодизелю, у рослинному насінні є омега-7-мононенасичені жирні кислоти. Оскільки вони підвищують стабільність до окиснення, покращують показники згорання та ряд інших характеристик. Окрім того цю групу кислот використовують як сировину для виробництва поліетилену. У дослідженні [15] було досягнуто підвищення вмісту омега-7-жирних кислот у насінні до 17 % від загальної фракції жирних кислот шляхом переспрямування метаболічних процесів за рахунок ко-експресії двох мутантних генів ($\Delta 9$ -acyl-ACP(носій ацил-протеїну) і acyl-CoA (коензим А) desaturase) з високою специфічністю до 16:0- субстратів ACP та CoA, відповідно. При цьому, здійснена додаткова супресія генів *KASII* (3-keto-

acyl-ACP synthase II) та *FatB* (16:0-ACP thioesterase) зумовила підвищення рівнів омега-7 жирних кислот у насінні до 60-65 %.

Створення відновлюваних джерел гідроксижирних кислот для промисловості також є одним із найбільш актуальних питань на сьогодні. Зазвичай джерелом цих жирних кислот серед рослин є *Ricinus communis*. Водночас, широкомасштабне використання цієї рослини є ускладненим, оскільки вона містить токсин рицин та алергенні 2S альбуміни у насінні. З огляду на це, розглядається можливість спрямованої модифікації інших олійних культур для перетворення їх у продуцентів гідроксижирних кислот. У вже згаданому вище дослідженні [19] описано трансформацію рижю генотипом *FAH12*, ключовим у продукції гідроксижирних кислот, що знаходився під контролем насіння-специфічного промотору, що в свою чергу дозволило отримати насіння з вмістом рицинолеїнової кислоти у 6 %. У результаті досліджень, за допомогою експресії привнесеного гена *RcFAH* Snapp et al. [251] отримали насіння рижю, олія якого містила 14 % гідроксижирних кислот. Цей показник був нижчим за відповідний показник касторової олії. Проте, за рахунок ко-експресії генів *RcFAH* та *LfKCS3* (ген фермента із *Physaria fendleri*) автори досягли накопичення гідроксижирних кислот у насінні рижю на рівні 19 %.

Отримано також трансгенні рослини рижю, насіння яких накопичує ряд цінних для харчування омега-3 довголанцюгових поліненасичених жирних кислот, що природньо містяться у морепродуктах [252-254].

Рижій генетично змінюють з метою продукції таких комерційно важливих сполук, як воскові ефіри та жирні спирти для медицини, косметичної та харчової промисловості, виробництва змащувальних матеріалів тощо. У природі можливість отримання цих сполук обмежена (із малопродуктивних рослин жожоба *Simmondsia chinensis*). Тому на сьогодні основним джерелом цих сполук є обробка мінеральних олій

імобілізованими ліпазами [255]. Такий процес є технічно складним та коштовним, тому існує виражена потреба у створенні відновлюваних продуцентів названих речовин. Нещодавно було показано можливість виробництва жирних ефірів у великих масштабах за використання трансгенного рижю, який експресував гени *FAR* (редуктази жирних кислот) та *WS* (синтази воску). Перша група ферментів у клітині здійснює відновлення жирних кислот до жирних спиртів, тоді як друга – естерифікує утворені жирні спирти до жирних кислот із необхідними властивостями [26].

Метою іншого дослідження [27] було створення продукції відновлюваних джерел промислових олій. За допомогою генетичної інженерії було поєднано біосинтетичний шлях синтезу воскових ефірів жожоба із власним шляхом синтезу триацилгліцеролів у насінні *Camelina sativa*, *Crambe abyssinica* та *Brassica carinata*. Було створено кілька векторів, що містили гени *FAR* (*ScFAR*) (ген ацетил-КоА редуктази), *WS* (*ScWS*) (ген синтази восків) та (*ScFAE1*) (ген 3-кетואцил-КоА-синтазо-залежної елонгази жирних кислот). Після проведення трансформації та селекції регенерантів було показано накопичення воскових ефірів у насінні вказаних рослинних культур. Насіння рижю, при цьому містило найбільше різноманіття жирних кислот та жирних спиртів.

Рижій також було трансформовано геном *EaDAcT*, клонованим із послідовності, знайденої у геномі бруслини крилатої *Euonymus alatus*, здатної синтезувати рідкісні ацетил-триацилгліцероли із зниженою в'язкістю [256, 257]. У свою чергу, висока в'язкість рослинних олій перешкоджає їх ефективному використанню у виробництві палив, мастильних матеріалів тощо. У свою чергу, рослинні олії із пониженою в'язкістю розглядаються у якості перспективного вихідного продукту для створення вдосконалених видів біопалива [258]. Трансформацію даним геном було поєднано із супресією гена рижю *DGAT1*

(диацилгліцерол ацилтрансфераза) за допомогою РНК інтерференції. У результаті було показано накопичення у насінні трансгенних ліній більше ніж 85 % ацетил-триацилгліцеролів зі зниженою в'язкістю. При цьому, було підтверджено стабільність ознаки у ряді поколінь нащадків трансформованих рослин, а також відсутність негативного впливу привнесених генів на проростання, морфологічні і біохімічні показники трансгенних рослин.

З удосконаленням методів біотехнології рослин з'являються нові дані щодо молекулярно-генетичних, біохімічних та фізіологічних особливостей рижю та розширюються можливості спрямованої зміни його геному. Так, геном рижю є недиференційованим поліплоїдним [29], що ускладнює його метаболічну інженерію. За цих умов активність ферментів може кодуватися 3-ма генами-гомологами, що стосується, за оцінками, близько 80 % генів ліпідного метаболізму рижю [29, 250, 259]. Водночас, результати використання явища РНК інтерференції для пост-трансляційного сайленсингу генів підтверджує те, що гомологічні гени у геномі рижю можуть бути мішенями однієї РНКі конструкції [102, 259]. Нещодавно показано ефективність використання новітньої системи редагування геному CRISPR/Cas9/sgRNA у рослин на прикладі арабідопсису та продемонстровано високу специфічність та вибірковість цього методу [104, 260, 261]. Застосування цієї системи у рижю асоціюють із можливістю вносити зміни до гомологічних генів в усіх трьох суб-геномах даної рослини одночасно [12].

Загалом результати численних досліджень рижю показують перспективність даної культури для біотехнологічного створення ефективних рослин-продуцентів олій різного складу і властивостей для застосування у харчовій, паливній, медичній, фармацевтичній промисловості, виробництві мастильних матеріалів тощо [15, 32, 36, 250, 256, 262-268]. Водночас, варто зазначити, що у порівнянні з іншими олійними культурами, кількість робіт по методикам культивування *in*

in vitro та генетичного вдосконалення цього виду є меншою. Тому, зважаючи на перспективність даної культури, розробка підходів отримання нових продуктивних ліній рижю з підвищеним вмістом та модифікованими властивостями насінневої олії є надзвичайно актуальним завданням. Широкі можливості для цього надає використання сучасного біотехнологічного інструментарію.

Тому, метою даного дослідження було встановити продуктивний, енергетичний, інтродукційний потенціал та проаналізувати морфологічні та фізіологічні характеристики нових сортозразків та сортів рижю української селекції з подальшим введенням в культуру *in vitro*, розробити ефективний метод регенерації рослин рижю та здійснити генетичну трансформацію цих ліній за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* в умовах *in vitro* та методом *in planta*, порівнюючи ці два підходи.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал

У роботі використовували насіння високопродуктивних сортів і сортозразків рижию посівного *C. sativa*, люб'язно надане відділом нових культур Національного ботанічного саду (НБС) ім. М.М. Гришка НАН України, а саме: сортозразки ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ, ФЕОРЖЯФЧП, сорти: Перемога та Євро-12, а також сорти Міраж та Клондайк селекції Інституту олійних культур НААН України.

2.2. Характеристика реактивів, які використовували в роботі

В роботі використовували реактиви виробництва фірм:

1. "Serva" (Німеччина): 6-бензиламінопурин (БАП), нафтилоцтова кислота (НОК).
2. "Sigma" (США): тіамін-НСІ (вітамін В1), піридоксин-НСІ (вітамін В6), нікотинова кислота (вітамін РР), гліцин, мезо-інозитол, диметилсульфоксид (ДМСО), цефотаксим, рифампіцин, спектиноміцин, дріжджовий екстракт, Plant DNA Isolation Kit. дНТФ.
3. "Merck" (Німеччина): D-сахароза, мікробіологічний агар.
4. "Duchefa" (Німеччина): солі МС [245], гігроміцин.
5. «Roche» (Швеція): Таq-ДНК полімер аза.
6. «Amersham» (Великобританія): Rediprime II kit, нейлоновий фільтр Hybond-NX.
7. «Fermentas» (Литва): ендонуклеази. Таq-полімераза.

Усі інші реактиви, які використовували в дослідженнях, були вироблені в країнах СНД і мали кваліфікацію ч.д.а. і о.с.ч.

2.3. Вивчення фізіологічних, морфометричних та біохімічних характеристик різних сортозразків та сортів *C.sativa*

2.3.1. Польові дослідження. Польові дослідження рижію посівного проводили на дослідних ділянках НБС ім. М.М. Гришка НАН України, фенологічні спостереження за онтогенезом рослин проводили згідно методики [269], для визначення біометричних показників використовували методи, описані раніше [270]. Для вивчення морфологічних особливостей досліджуваних рослин застосовували загальноприйнятую морфологічну термінологію [271-273]. Для визначення однорідності насіння, життєздатності, енергії проростання, маси 1000 шт. використовували методичні вказівки з насінництва та міжнародні правила визначення якості насіння. Схожість насіння перевіряли методом пророщування в чашках Петрі на зволоженому папері [274].

2.3.2. Біохімічний аналіз сортозразків та сортів. Вміст ліпідів у насінні визначали методом знежиреного залишку за допомогою апарата Сокслета. Ліпіди одержували з подрібненого насіння екстракцією петролейним ефіром. Тригліцеридний склад олії визначали методом неводної обернено-фазової рідинної хроматографії. Аналіз проводили за допомогою рідинно-хроматографічної системи Agilent 1100, оснащеної 4-канальним насосом, автосамплером, термостатом колонок та UV-VIS детектором з діодною матрицею. Застосовували ізократичний елюент складу IPA:ACN (1:1). Ліпідні компоненти розділяли на колонці ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 4.6×150 мм, 5 мм за температури 20 °С. Детектування

здійснювали на довжини хвилі 206 нм. Визначення енергетичної цінності зразків проводили на калориметрі «ИСО - 200».

2.4. Введення в культуру *in vitro* рижію посівного

2.4.1. Стерилізація насіння. Насіння рижію стерилізували в 70%-му етиловому спирті протягом 1 хв, потім обробляли гіпохлоритом натрію в концентраціях 1 та 1,5%-и протягом 5-10 хв [20]. Після стерилізації насіння тричі по 10 хв старанно промивали стерильною дистильованою водою.

2.4.2. Живильні середовища та умови культивування. Для пророщування стерильного насіння використовували середовище МС (Murasige & Skoog, 1962) з половинним набором макро- та мікросолей, 2%-ю сахарозою, 0,8%-м агаром, рН 5,7-5,8. Культивування вихідного матеріалу *in vitro* здійснювали за таких умов: інтенсивність освітлення – 1,5-2 клк, світловий фотоперіод – 16 год, температура – 22-24⁰С, вологість повітря – 60-80 %.

Для індукції калюсоутворення та регенерації рослин використовували сім'ядольні листки та сегменти гіпокотилів 5-, 7-, 9- та 14- денних проростків рижію. Для вивчення впливу віку експланту на калюсогенез та регенерацію використовували гіпокотилі.

Для дослідження впливу фітогормонів на регенерацію *C. sativa* використовували 12 варіантів живильних середовищ (табл. 2. 1), які відрізнялися співвідношенням фітогормонів – бензиламінопурину (БАП) та нафтилоцтової кислоти (НОК), а також різною концентрацією сахарози. До складу середовищ входили стандартний набір макро- та мікро солей середовища МС [245], мезо-інозитол (100 мг/л), нікотинова кислота (0,5 мг/л), тіамін-НСІ (0,05 мг/л), піридоксин-НСІ (0,5 мг/л),

гліцин (10 мг/л) а також 0,8%-й агар, рН 5,8 (вимірювали перед автоклавуванням). Середовища стерилізували протягом 20 хв за температури 121 °С і тиску 1,2 кПа.

Таблиця 2.1.

Склад живильних середовищ для регенерації рослин *C.sativa*

Варіанти середовищ	Макро-, мікросолі та вітаміни МС	Концентрація фітогормонів, мг/л		Сахароза, г/л
		БАП	НОК	
1	+	1	-	10
2	+	1	-	20
3	+	2	-	10
4	+	2	-	20
5	+	3	-	10
6	+	3	-	20
7	+	4	-	10
8	+	4	-	20
9	+	1	0,1	10
10	+	1	0,1	20
11	+	2	0,1	10
12	+	2	0,1	20

Ефективність кожного середовища оцінювали через 3-4 тижні після розміщення експлантів на середовище по наявності на них утворення калюсу з регенераційними структурами. Частоту регенерації рослин визначали як співвідношення числа експлантів, на яких утворилися рослини-регенеранти до загальної кількості висаджених експлантів.

Кожний дослід повторювали тричі, загальна кількість експлантів в одному досліді становила не менше 100 шт.

2.5. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *C. sativa* (*in vitro*)

2.5.1. Конструкція для трансформації рижію посівного. Для генетичної трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* штам AGL1, що містив векторну конструкцію pGH217 з репортерним геном β -глюкуронідази (*gus*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК) і *nos*-термінатора, а також селективним маркерним геном *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину у трансгенних рослин (Рис. 2.1).

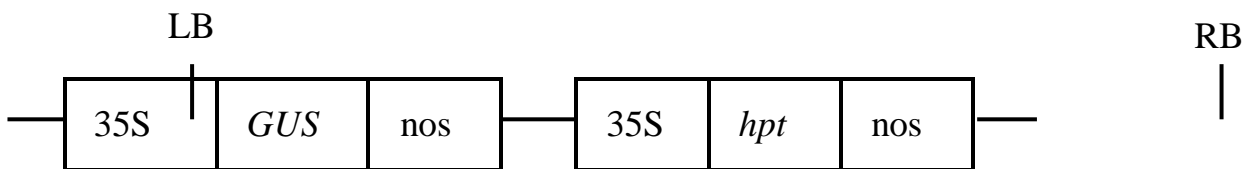


Рис. 2.1. Схема конструкції pGH217: LB та RB – ліва та права границі T-ДНК, 35S – промотор ВМЦК, *GUS* – ген β -глюкуронідази, *nos* – нопаліновий термінатор, *hpt* – ген стійкості до гігromіцину.

2.5.2. Вибір селективної концентрації гігromіцину.

Оскільки конструкція містила ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину, для визначення ефективної концентрації гігromіцину як селективного агента досліджували вплив його різних концентрацій (0-15 мг/л) на калюсоутворення та регенерацію пагонів, отриманих з експлантів сім'ядольних листків та гіпокотилів 5-7-денних проростків. Для цього експланти розміром 3-5 мм поміщали на чашки Петрі з відповідними концентраціями антибіотика в середовищі (по 20-25 експлантів на чашку) і інкубували в умовах розсіяного світла за температури 24-26 °С. Вивчення впливу досліджуваних концентрацій гігromіцину проводили через 4 тижні після початку культивування експлантів.

Також досліджували вплив гігроміцину на проростання насіння, розвиток і морфологію проростків контрольної лінії. Для цього насіння поміщали в чашки Петрі на фільтрувальний папір, зволожений водним розчином гігроміцину в концентраціях 0-20 мг/л та пророщували за температури + 23 °С з 16-ти годинним фотоперіодом. Для кожного досліджу використовували не менше 30 насінин, дослідження проводили в трьох повторностях.

2.5.3. Умови культивування *A. tumefaciens*. Культуру *A. tumefaciens* штам AGL1 вирощували на агаризованому середовищі LB (5 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л пептону, 10 г/л NaCl, 15 г/л агару, рН 7.0), до якого додавали 100 мг/л спектиноміцину та 100 мг/л рифампіцину. Для отримання суспензії агробактерії брали з одиночної колонії та інкубували протягом ночі у 20 мл рідкого середовища LB, що містило 100 мг/л спектиноміцину та 100 мг/л рифампіцину при +28°C у темряві на орбітальному шейкері. Далі 0,5 мл суспензії з вирощеної культури клітин агробактерії переносили у 250-мл колби, що містили по 50 мл рідкого середовища LB, в яке попередньо додавали 50 мг/л спектиноміцину. Подальше інкубування проводили при постійному хитанні на орбітальному шейкері за температури +28°C впродовж 24 год.

По закінченні часу наростання агробактерії з метою запобігання негативного впливу бактеріальних метаболітів на процес трансформації, культуру очищали наступним чином: рідке середовище з агробактерією розливали по 1 мл в пробірки "Eppendorf" і осаджували шляхом центрифугування протягом 5 хв при швидкості 4000 обертів/хв. Супернатант видаляли, осад розбавляли рідким середовищем МС [245] до досягання оптичної щільності $OD_{600} = 0,5$ бактеріальної культури.

2.5.4. Ко-культивування з *A. tumefaciens*, селекція та регенерація трансгенних рослин. Для інфікування сім'ядольні листки та сегменти гіпокотилів 5-, 7- та 9- денних проростків рижію переносили в чашки, які містили культуру агробактерії та залишали в умовах ламінарного боксу протягом 15-60 хв. Далі експланти переносили на агаризоване середовище МС для ко-культивування, попередньо видаливши залишки агробактерії за допомогою стерильного фільтрувального паперу. Після чого трансформовані експланти переносили на середовище МС, що містило фітогормони (БАП та НОК) для регенерації пагонів і 350 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії, а через тиждень – на аналогічне за складом середовище, але із додаванням 5 мг/л гігроміцину для селекції трансгенних клітин. Далі кожні 2 тижні експланти субкультивували на аналогічному за складом середовищі. Впродовж усіх етапів експерименту культуру інкубували за температури +24-26°C та 16-ти годинним фотоперіодом.

Для гістохімічного визначення глюкуронідази (*GUS*), як результат експресії *gus(uid A)*-гена (гена β -глюкуронідази) в тканинах ліній рослин *C. sativa* використовували 5-бром-4-хлор-3-індолілглюкоронід (X-Gluc). У результаті реакції з даним субстратом в області локалізації фермента в трансгенних клітинах утворювався блакитний осад [275].

2. 6. Трансформація рослин рижію посівного методом *in planta*

Для здійснення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методом *in planta* як вихідний матеріал використовували рослини рижію посівного (*C. sativa*) сорту Перемога. Рослини вирощували до стадії цвітіння. Інокуляцію здійснювали шляхом занурення квіток („floral dip”) у суспензійну культуру агробактерії на 10-15 сек [22]. Після інокуляції рослини покривали поліетиленовими плівками для створення умов з підвищеною вологістю та витримували протягом 24 год. Трансформовані

рослини знаходилися на дослідних ділянках до повного дозрівання насіння.

Для відбору ймовірно трансгенних ліній зібране насіння (T_1) пророщували на фільтрувальному папері з гігromіцином у концентрації 20 мг/л. Через 7-10 діб відбирали зелені, нормально розвинені проростки для їх подальшого молекулярно-генетичного аналізу.

2.7. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних ліній рижю

Трансгенну природу отриманих рослин встановлювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів до репортерного гена *GUS*. Для цього рослинну ДНК виділяли за допомогою ЦТАБ - методу [18]. Ампліфікацію проводили з такими праймерами: uideA1 (5'- CAGGAAGTGATGGAGCATCAG - 3') та uideA2: 5'-TCGTGCACCATCAGCACGTTA -3', що були люб'язно надані к.б.н. В.В. Радчуком (Інститут генетики рослин і досліджень культурних рослин, Гатерслебен, Німеччина). Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 50 нг геномної ДНК, по 0,2 мкМ кожного з праймерів, 200 мкМ суміші dNTP, 2,5 од. Таq-полімерази (Реплікон, Росія). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 ("Applied Biosystems" США) за наступною схемою: початкова денатурація при 94°C, 5 хв; ампліфікація – 30 циклів (94°C – 30 с, 62°C – 90 с, 72°C – 2хв. 30 с); кінцева елонгація - 72°C, 7 хв [276]. Продукти ампліфікації ДНК розділяли за допомогою електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі в 1xTBE-буфері в присутності етидію броміду та візуалізували в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркер (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use, "Fermentas" – Литва).

2.8. Статистична обробка отриманих даних

Статистичну оцінку отриманих результатів проводили шляхом розрахунку довірчих інтервалів і відносної помилки для альтернативного розподілу з використанням критерія Ст'юдента для 5%-ного рівня вірогідності згідно методики Лакіна [277]. Побудову графіка здійснювали за допомогою програми Microcal™ Origin™ (Version 8.0), Microcal Software, Inc. Набір тексту проведено у програмі Microsoft Word XP.

РОЗДІЛ 3

МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОРТІВ ТА СОРТОЗРАЗКІВ РИЖІЮ ПОСІВНОГО

3.1. Дослідження тривалості вегетаційного періоду

Для дослідження тривалості вегетаційного періоду було взято 8 сортозразків рижію посівного, а саме: ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ, ФЕОРЖЯФЧП; 2 сорти: Перемога та Євро-12, а також 2 сорти Міраж та Клондайк селекції Інституту олійних культур НААН України.

Оскільки насіння рижію може проростати при достатньо низьких позитивних температурах, сівбу проводили в самі ранні строки весни (III декада березня – I декада квітня). Було виявлено, що останні строки сівби можна проводити в кінці серпня, зважаючи на те, що ця рослина має дуже короткий період вегетації. За цих умов рослини рижію розвивалися до фази цвітіння і початку плодоношення та формували повноцінну надземну масу, але фаза досягання насіння у них не наставала. Варто зазначити, що насіння рижію здатне проростати навіть за умов сівби у пізні осінні строки - до III декади жовтня. За наявності інших умов рослини можуть розвиватися до ювенільного періоду, але після настання сильних морозів вони гинуть. Отже, для створення насінних посівів з високою продуктивністю, рижій можна сіяти у різні строки протягом тривалого періоду: від II декади квітня до кінця червня (рис. 3.1.) [278].



Рис. 3.1. А – *C. sativa* у фазі розетки рослин за сівби у III декаді квітня; Б – *C. sativa* у фазі бутонізації - на початку цвітіння рослин; В – *C. sativa* у фазі масового цвітіння рослин; Г – *C. sativa* у фазі досягання насіння.

Як свідчать результати проведених досліджень, вегетаційний період рижію до досягання насіння залежно від досліджуваної форми чи сорту становив від 65 до 90 діб (результати досліджень для Сорту Євро-12 наведено в табл. 3.1).

За умов ранніх та пізніх строків сівби тривалість початкових фаз розвитку, як і в цілому вегетаційного періоду, затягуються. Якщо при ранніх строках сівби повне досягання насіння у рослин наставало майже у всіх випадках, то за сівби після другої половини літа це відбувалось не в повній мірі. Відсоток недозрілих плодів збільшувався при проведенні сівби в більш пізні строки. Одночасно для таких рослин характерним є проходження всіх генеративних фаз (від формування бутонів до досягання).

Таблиця 3.1.

**Тривалість фаз розвитку рижію залежно від строків сівби (сорт
Євро-12) 2012 р.**

Дата сівби	Тривалість періоду, діб			
	сівба-сходи	сходи-цвітіння	цвітіння	вегетація
15.04.	7-8	40-45	25-30	86-92
25.04.	5-6	36-38	20-24	75-85
07.05.	4-5	34-35	18-22	70-76
17.05.	6-7	29-31	19-20	66-69
28.05.	6-7	27-29	17-19	61-67
07.06.	6-7	28-30	16-18	65-69
18.06.	5-6	29-31	18-19	67-72
27.06.	6-7	27-29	19-22	68-73

Отже, за результатами досліджень було встановлено, що найбільш сприятливий період сівби для створення насінних посівів з високою продуктивністю – від III декади квітня до III декади травня. Також визначено, що тривалість вегетаційного періоду *C. sativa* до досягання насіння залежно від досліджуваного зразка становить від 65 до 90 діб.

3.2. Вивчення морфологічних особливостей *C. sativa*

За даними наших досліджень було встановлено, що нові сорти та сортозразки рижію характеризувались високим продукційним потенціалом та вирізнялись за морфологічними особливостями та урожайними характеристиками (Рис. 3. 2).

Рослини за морфологічними показниками суттєво вирізняються. Основні морфометричні показники рослин залежать від формового різноманіття, фази розвитку, умов вегетації, строків та способів сівби,

площі живлення, елементів догляду за посівами, удобрення тощо (табл. 3.2 – 3.3).

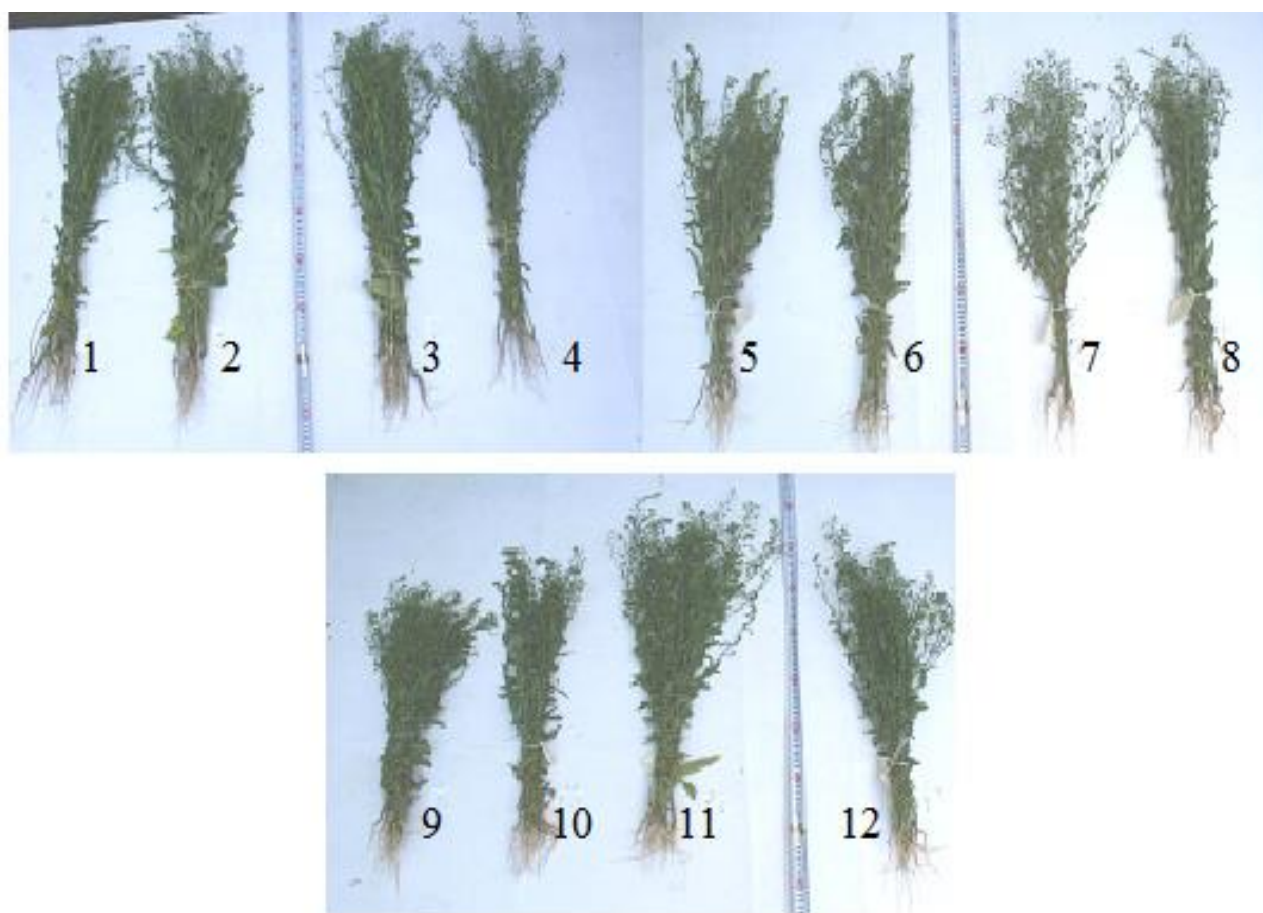


Рис. 3.2. Формове різноманіття рослин *C. sativa*: 1 – ФЕОРЖЯФ-1; 2 – ФЕОРЖЯФ-2; 3 – ФЕОРЖЯФ-3; 4 – ФЕОРЖЯФ-4; 5 – ФЕОРЖЯФ-5; 6 – ФЕОРЖЯФД; 7 – ФЕОРЖЯФЧ; 8 – ФЕОРЖЯФЧП; 9 – Міраж; 10 – Клондайк; 11 – Перемога; 12 – Євро-12.

Так, досліджені сортозразки та сорти до фази цвітіння досягали висоти 55-69 см. В цей час на рослинах формувалось від 6 до 9 бічних пагонів I-го порядку, 8-15 – міжвузлів, 13-16 – листків на пагоні. Діаметр стебла сягав 3,2 - 4,7 мм. Середня довжина листків становила від 7,1 до 9,9, ширина – 1,5 - 2,8 см. На рослині в цей період формувалося від 3 до 6 квітконосних пагонів, середня довжина яких сягала від 10,2 до 23,0 см.

Таблиця 3.2.

**Морфометричні показники різних сортів та сортозразків *C. sativa*
у фазі цвітіння**

№ з/п	Сортозразок, сорт рижію посівного	Висота рослин, см	Бічні пагони на стеблі, шт.	Діаметр стебла, мм	Міжвузля на стеблі, шт.
1	ФЕОРЖЯФ-1	59,5±0,57	6,0± 0,25	4,0±0,09	8,4±0,18
2	ФЕОРЖЯФ-2	49,5±0,67	6,5± 0,25	3,8±0,19	8,7±0,23
3	ФЕОРЖЯФ-3	48,7±0,23	8,5± 0,25	3,2±0,13	14,8±0,19
4	ФЕОРЖЯФ-4	60,2±2,14	7,2±0,38	4,2±0,20	12,8±0,80
5	ФЕОРЖЯФ-5	55,4±1,17	7,8±0,48	4,2±0,28	9,2±0,25
6	ФЕОРЖЯФД	57,5±0,67	5,9±0,25	4,7±0,13	12,9±0,38
7	ФЕОРЖЯФЧ	54,8±1,53	7,4±0,13	3,7±0,28	8,4±0,21
8	ФЕОРЖЯФЧП	54,4±1,83	8,5±0,23	4,7±0,22	12,4±0,17
9	Перемога	65,5±1,51	8,1±0,51	4,5±0,17	12,4±0,17
10	Євро-12	69,2±2,02	8,8±0,50	4,5±0,17	14,4±0,46
11	Міраж	59,4±3,83	6,6±0,22	4,4±0,98	12,2±1,57
12	Клондайк	60,8±0,23	6,5±0,25	4,2±0,10	12,7±0,46

Слід зазначити, що за рядом з цих показників сорти Перемога і Євро-12 та сортозразки ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧП перевищують морфологічні характеристики деяких сортозразків ярого рижію різного регіонального походження, що були проаналізовані раніше [279], або були на рівні створеного матеріалу *C. sativa* шляхом хімічного мутагенезу за допомогою етилметансульфонату (ЕМС) [280-282].

Таблиця 3.3

**Морфометрична характеристика листків та суцвіть різних
сортозразків та сортів *C. sativa* у фазі цвітіння**

№ п/ п	Сортозразок, сорт рижію посівного	Листки			Суцвіття	
		кількість на стеблі, шт.	довжина, см	ширина, см	к-ть к.п.о.с., шт.	довжина, см
1	ФЕОРЖЯФ-1	13,9±0,58	7,1±0,32	1,5±0,72	2,5±0,25	15,5±1,15
2	ФЕОРЖЯФ-2	14,80±0,33	7,7±0,26	1,8±0,83	4,6±0,43	13,8±1,22
3	ФЕОРЖЯФ-3	13,9±0,28	8,3±0,82	2,4±0,20	3,7±0,54	10,2±1,11
4	ФЕОРЖЯФ-4	14,8±0,80	8,8±0,51	2,8±0,12	4,0±0,90	20,4±2,57
5	ФЕОРЖЯФ-5	15,1±0,44	7,5±0,17	2,2±0,08	5,7±0,63	20,2±1,34
6	ФЕОРЖЯФД	13,9±0,42	7,1±0,32	1,9±0,42	5,1±0,38	12,6±1,23
7	ФЕОРЖЯФЧ	13,1±0,42	7,9±0,22	2,5±0,27	3,2±0,20	18,3±1,07
8	ФЕОРЖЯФЧП	14,1±0,28	8,2±0,81	2,3±0,27	3,3±0,37	18,3±1,62
9	Перемога	15,0±0,22	9,4±0,72	2,2±0,13	5,4±0,38	20,1±2,26
10	Євро-12	16,0±0,45	9,9±0,42	2,6±0,12	5,9±0,27	23,0±2,34
11	Міраж	13,2±1,57	8,4±7,57	1,9±0,05	4,8±2,23	21,4±2,12
12	Клондайк	15,0±0,58	8,7±0,47	2,3±0,53	3,9±0,45	19,0±1,45

Примітка: к-ть к.п.о.с. – кількість квітконосних пагонів на основному стеблі.

І хоча, як було показано, обробка 0,05 та 0, 1% ЕМС призводила до збільшення висоти рослин одного з досліджуваних сортів (зокрема, сорту Степовий-1), одночасно простежувалася тенденція до зменшення кількості бічних пагонів у цього та інших сортів та виникнення цілого спектру небажаних мутацій [281]. Раніше було встановлено, що саме кількість пагонів суттєво впливає на врожайність [283, 284].

Стебло *C. sativa* тонке, розгалужене, на рослині формувались численні бічні пагони I-го та II-го порядків (Рис. 3.3). Листки у *C. sativa* ланцетні, дрібні, на коротких черешках або сидячі, суцільнокрайні або зубчасті (Рис. 3.4). Форма, розміри та інші морфологічні показники листків суттєво змінюються залежно від генотипу рослин, а також від



Рис. 3.3. Надземна частина рослин *C. sativa* в період генеративного розвитку: 1 - ФЕОРЖЯФ-1; 2 - ФЕОРЖЯФ-2; 3 - ФЕОРЖЯФ-3; 4 - ФЕОРЖЯФ-4; 5 - ФЕОРЖЯФ-5; 6 – ФЕОРЖЯФД; 7 – ФЕОРЖЯФЧ; 8 – ФЕОРЖЯФЧП; 9 – Міраж; 10 – Клондайк; 11 – Перемога; 12 – Євро-12.

впливу різних факторів зовнішнього середовища. Зміни морфологічних ознак у залежності від генотипу рижю, а також від погодних умов спостерігали й раніше [280, 285].

Суцвіття *C. sativa* – китиця, яка складається з дрібних блідо-жовтих квіток (Рис. 3. 5).

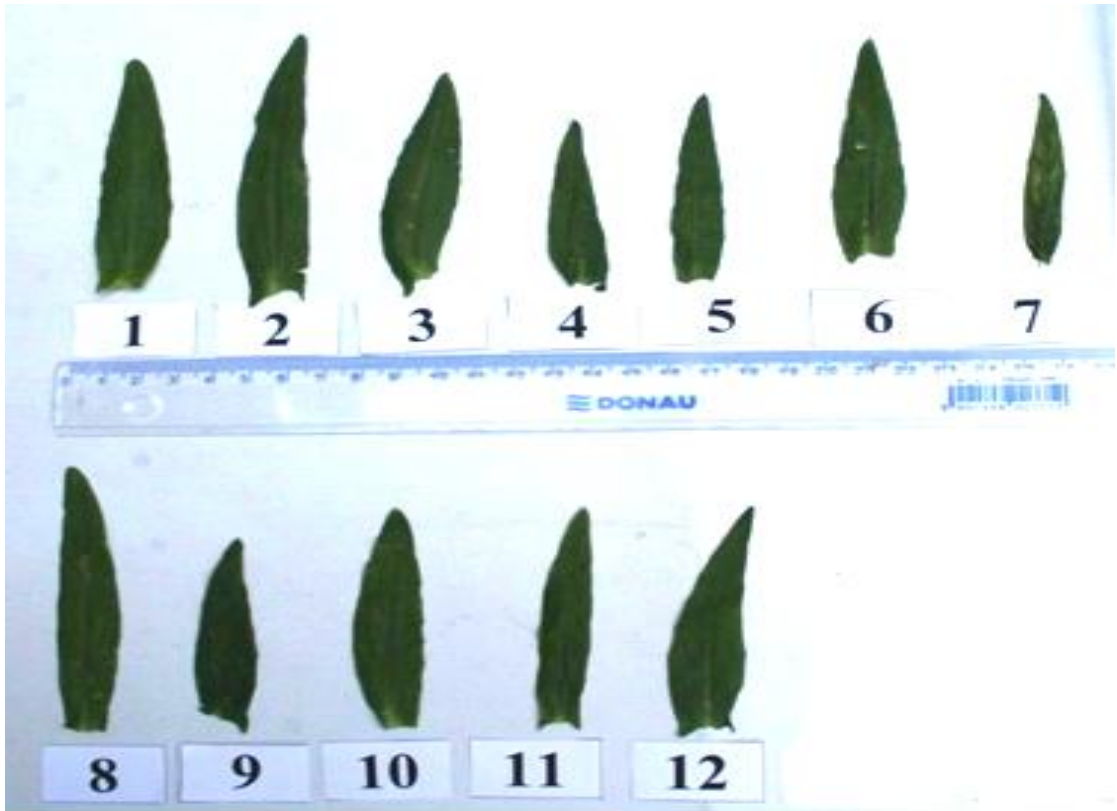


Рис. 3.4. Листки різних сортозразків та сортів *C. sativa*: 1 - ФЕОРЖЯФ-1; 2 - ФЕОРЖЯФ-2; 3 - ФЕОРЖЯФ-3; 4 - ФЕОРЖЯФ-4; 5 - ФЕОРЖЯФ-5; 6 – ФЕОРЖЯФД; 7 – ФЕОРЖЯФЧ; 8 – ФЕОРЖЯФЧП; 9 – Міраж; 10 – Клондайк; 11 – Перемога; 12 – Євро-12.

Основні морфометричні показники по мірі росту та розвитку рослин *C. sativa* змінювались та до кінця вегетації досягали максимальних значень. У період досягання насіння висота рослин залежно від формових особливостей становила від 65 до 97 см. Серед досліджуваних генотипів найбільш виділявся сортозразок ФЕОРЖЯФ-4 і сорти Перемога та Євро-12, у яких ці показники є кращими, ніж у низки сортів, досліджених раніше [263, 279, 281, 282, 284].

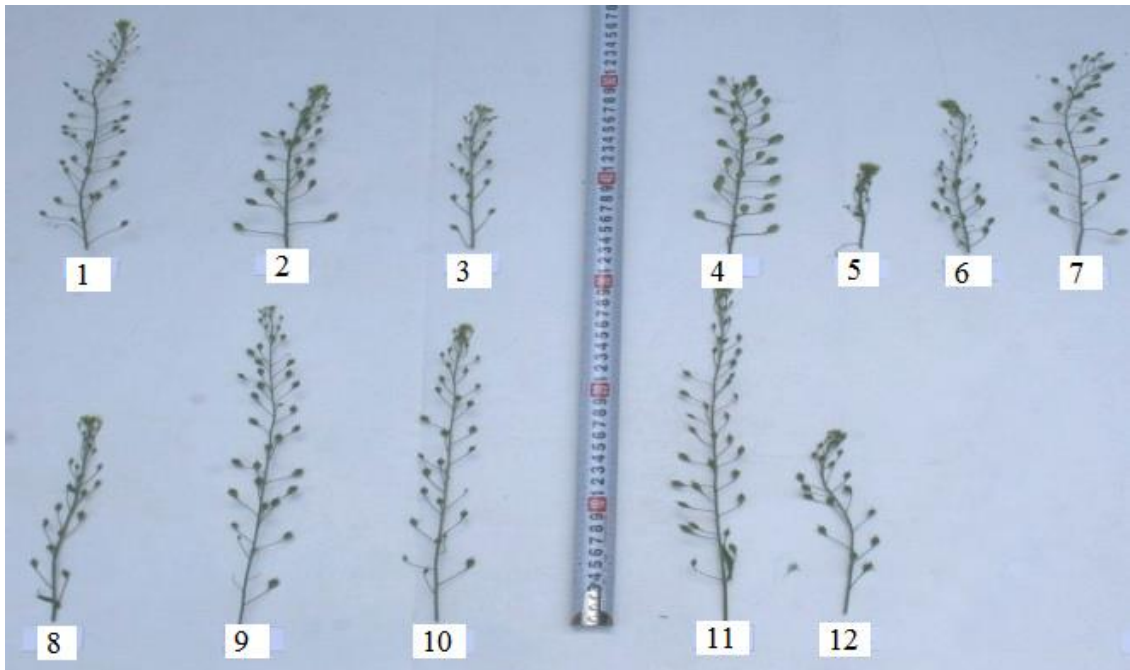


Рис. 3.5. Суцвіття рослин *C. sativa*: 1 - ФЕОРЖЯФ-1; 2 - ФЕОРЖЯФ-2; 3 - ФЕОРЖЯФ-3; 4 - ФЕОРЖЯФ-4; 5 - ФЕОРЖЯФ-5; 6 – ФЕОРЖЯФД; 7 – ФЕОРЖЯФЧ; 8 – ФЕОРЖЯФЧП; 9 – Міраж; 10 – Клондайк; 11 – Перемога; 12 - Євро-12.

За даними, що наведені у табл. 3.4 – 3.5, кількість бічних пагонів на рослині становила 7 – 12, кількість стручків на основному стеблі сягала 26 – 50, на бічних пагонах 18 – 30, що значно перевищує ці показники для досліджуваних раніше сортів [282, 284].

Корінь у рослин *C. sativa* стрижневий. Головний корінь в основному розміщений в орному шарі та розвивається в глибину до 30 см. Крім довжини, залежно від форми та сорту рослин, коріння вирізняється за кількістю бічних корінців, діаметром кореневої шийки та їх масою.

Таблиця 3.4

**Морфометричні показники сортів та сортозразків *C. sativa* у фазі
достигання насіння**

№ п/п	Сортозразок, сорт рижію посівного	Висота рослин, см	Довжина головно-го кореня, см	Кількість бічних пагонів I порядку, шт	Кількість стручків, шт.	
					на основному стеблі	на бічних пагонах I порядку
1	ФЕОРЖЯФ-1	65,0±1,78	11,5±0,56	10,2±1,29	43,3±3,42	26,6±1,41
2	ФЕОРЖЯФ-2	69,6±1,26	12,4±0,89	8,4±1,01	40,5±2,75	26,8±1,89
3	ФЕОРЖЯФ-3	67,0±1,77	11,1±0,75	7,9±0,61	49,0±1,71	25,0±1,45
4	ФЕОРЖЯФ-4	84,6±2,08	11,4±0,67	7,2±0,95	36,2±1,19	27,1±1,55
5	ФЕОРЖЯФ-5	68,2±1,61	12,5±0,75	9,9±1,02	36,9±2,22	22,7±2,52
6	ФЕОРЖЯФД	71,3±1,63	11,1±0,53	10,2±1,32	43,6±3,67	28,1±2,53
7	ФЕОРЖЯФЧ	67,6±2,08	11,8±0,39	10,2±0,95	26,2±2,11	18,1±1,55
8	ФЕОРЖЯФЧ П	68,3±2,06	8,9±0,53	7,3±0,62	39,1±4,61	20,6±1,37
9	Перемога	79,0±1,17	12,1±0,75	11,7±0,29	48,4±1,21	25,0±1,45
10	Євро-12	97,0±1,34	12,5±0,75	10,9±0,35	50,4±1,21	29,0±1,45
11	Міраж	69,2±1,19	11,7±0,68	7,9±1,21	34,7±1,82	27,2±2,25
12	Клондайк	73,7±1,70	12,3±0,94	10,4±0,97	42,2±3,36	29,6±2,89

Розмір стручків та кількість насінин у стручку залежать від формових особливостей та місця розміщення на рослині. Так, найбільшу кількість насіння в стручку на основному стеблі зафіксовано у сорту Євро-12, а найменшу у ФЕОРЖЯФ-1, тоді як за кількістю насіння в стручку на бічних пагонах перевагу мав сортозразок ФЕОРЖЯФ-4. Між дослідженими зразками встановлено суттєву різницю за всіма параметрами.

Розмір плодів та насіння є важливими параметрами, які впливають на якісні показники посівного матеріалу. Плід *C. sativa* – стручечок обернено яйцеподібної форми. Нами було проведено всебічне дослідження

морфометричних показників плодів досліджуваних генотипів рижію посівного.

Таблиця 3.5

Морфометричні показники стручків та насіння сортів та сортозразків *C. sativa* у фазі досягання насіння

№ п/п	Сортозразок, сорт рижію посівного	Розмір стручків на основному пагоні, см		Розмір стручків на бічних пагонах, см		Кількість насіння в стручку, шт.	
		діаметр	довжина	діаметр	довжина	на основному стеблі	на бічних пагонах I пор.
1	ФЕОРЖЯФ-1	0,48±0,13	0,77±0,21	0,40±0,15	0,65±0,22	8,0±0,68	6,0±0,99
2	ФЕОРЖЯФ-2	0,50±0,37	0,74±0,34	0,35±0,17	0,56±0,22	9,5±1,04	8,0±0,83
3	ФЕОРЖЯФ-3	0,50±0,21	0,81±0,38	0,38±0,13	0,69±0,23	9,7±1,06	8,8±0,84
4	ФЕОРЖЯФ-4	0,45±0,03	0,90±0,03	3,90±0,13	0,62±0,20	10,5±1,04	9,8±0,84
5	ФЕОРЖЯФ-5	0,50±0,13	0,75±0,31	0,40±0,30	0,63±0,37	9,4±1,95	7,1±0,91
6	ФЕОРЖЯФД	0,40±0,01	0,90±0,02	0,34±0,01	0,50±0,02	9,4±0,81	6,1±0,78
7	ФЕОРЖЯФЧ	0,50±0,21	0,80±0,30	0,49±0,10	0,83±0,21	8,7±1,13	9,6±0,45
8	ФЕОРЖЯФЧ П	0,48±0,11	0,76±0,13	0,40±0,02	0,50±0,03	10,4±1,35	7,4±0,90
9	Перемога	0,49±0,09	0,82±0,02	4,90±0,10	0,67±0,28	10,3±1,06	8,5±0,45
10	Євро-12	0,46±0,02	0,87±0,01	0,40±0,01	0,73±0,21	11,7±1,13	9,2±0,87
11	Міраж	0,40±0,05	0,80±0,07	3,70±0,17	0,68±0,26	9,0±0,68	7,0±0,83
12	Клондайк	0,40±0,01	0,70±0,05	0,40±0,01	0,60±0,03	9,1±0,98	8,4±0,82

Порівняльна оцінка проведена на 12 зразках щодо визначення довжини, ширини, товщини плодів та довжини носика. Носик плоду апікальний, має шилоподібну форму [286]. Було виявлено, що довжина плоду всіх сортозразків та сортів рижію змінювалась від 7,42 до 9,13 см (табл. 3.6; рис.3.6).

Таблиця 3.6

**Морфометричні показники плодів *C. sativa* залежно від
сортозразкових та сортових особливостей рослин**

№ з/п	Сортозразок, сорт рижію посівного	Довжина плоду, мм	Ширина плоду, мм	Товщина плоду, мм	Довжина носика, мм
1	ФЕОРЖЯФ-1	8,72±0,18	3,82±0,09	3,66±0,04	1,83±0,05
2	ФЕОРЖЯФ-2	8,14±0,13	3,62±0,10	3,63±0,05	1,41±0,04
3	ФЕОРЖЯФ-3	7,42±0,14	3,47±0,08	3,37±0,08	1,87±0,04
4	ФЕОРЖЯФ-4	9,13±0,16	4,07±0,09	4,06±0,09	2,03±0,04
5	ФЕОРЖЯФ-5	7,66±0,12	3,65±0,04	3,81±0,06	1,91±0,03
6	ФЕОРЖЯФД	9,08±0,13	4,19±0,05	4,21±0,06	2,02±0,03
7	ФЕОРЖЯФЧ	8,11±0,30	4,54±0,13	4,04±0,11	1,75±0,08
8	ФЕОРЖЯФЧП	8,74±0,10	3,66±0,02	3,44±0,16	1,83±0,05
9	Міраж	8,82±0,34	4,14±0,13	4,04±0,05	1,34±0,02
10	Клондайк	8,17±0,07	3,83±0,10	3,82±0,03	1,85±0,04
11	Перемога	8,92±0,29	4,26±0,15	3,76±0,11	0,97±0,03
12	Євро-12	9,03±0,17	4,09±0,07	4,02±0,04	2,01±0,04

Найменшу довжину мав плід сортозразку ФЕОРЖЯФ-3, найбільшу – ФЕОРЖЯФ-4. Десять з дванадцяти зразків мали довжину від 8 до 9 мм.

Ширина плоду рижію залежно від форми менша, ніж довжина, та змінювалась в межах 3,47-4,54 мм. Найбільшою шириною вирізнявся плід сортозразка ФЕОРЖЯФЧ, найменшою – ФЕОРЖЯФ-3. Товщина та ширина плодів рижію близькі та в окремих формах переважав один чи інший показник. В цілому спостерігалась невелика перевага ширини плодів порівняно з товщиною, співвідношення між цими показниками становило 1,03-1,35. Товщина плодів рижію посівного була в межах 3,37-4,20 мм. Максимальну товщину мали плоди сортозразка ФЕОРЖЯФД, мінімальну – ФЕОРЖЯФ-3. Таким чином, плоди сортозразка ФЕОРЖЯФ-3 вирізнялись найменшими метричними розмірами.

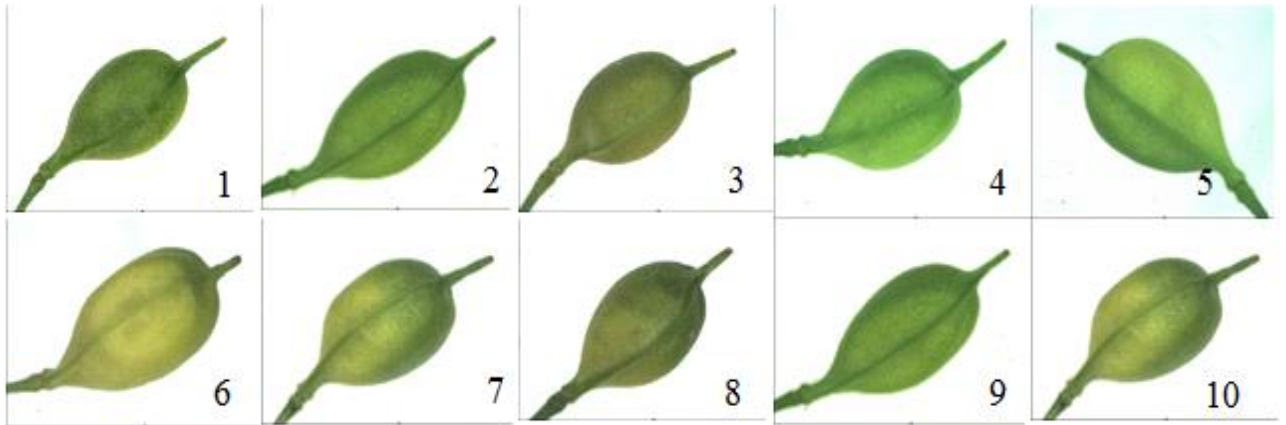


Рис. 3.6. Плоди різних сортозразків та сортів *C. sativa*: 1- ФЕОРЖЯФ-1; 2- ФЕОРЖЯФ-2; 3- ФЕОРЖЯФ-3; 4 - ФЕОРЖЯФ-4; 5 - ФЕОРЖЯФ-5; 6- ФЕОРЖЯФД; 7- ФЕОРЖЯФЧП; 8 - Перемога; 9 - Євро-12; 10 – Міраж.

Довжина носика плоду рижію посівного у досліджених сортозразків рослин була в межах від 0,97 до 2,03 мм. Найдовший носик – у плодів сортозразка ФЕОРЖЯФ-4, найкоротший – у рослин сорту Міраж. Насіння дрібне, червоно-коричневе (руде), видовжено-овальне, по 6-8 насінин у плодику (рис. 3.7). Існує лише одна робота румунських колег, в якій наведено інформацію стосовно кількості насіння в стручку в досліджуваних рослинах рижію [279]. Порівнюючи результати цих досліджень, слід відзначити, що за даним показником отримані нами сортозразки і сорти їх також перевищували.

Цікаві закономірності встановлено і за розмірами насіння різних генотипів *C. sativa* (табл. 3. 7). Результати досліджень 12 зразків свідчать, що довжина насіння знаходилась в межах від 1,71 до 2,1 мм. Лише 4 зразка (ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФД та сорт Євро-12) мали довжину понад 2 мм, 3 зразка – менше 1,75 мм, а інші - понад 1,80, але меншу ніж 2 мм.



Рис. 3.7. Насіння різних сортозразків та сортів *C. sativa*: 1- ФЕОРЖЯФ-1; 2 - ФЕОРЖЯФ-2; 3 - ФЕОРЖЯФ-3; 4 - ФЕОРЖЯФ-4; 5 - ФЕОРЖЯФ-5; 6 – ФЕОРЖЯФД; 7 – ФЕОРЖЯФЧ; 8 – ФЕОРЖЯФЧП; 9 - Міраж; 10 - Клондайк; 11 - Перемога; 12 - Євро-12.

Таблиця 3.7

**Розмір насінин *C. sativa* залежно від сортових особливостей
рослин**

№ п/п	Сортозразок, сорт	Довжина насінини	Ширина насінини
1	ФЕОРЖЯФ-1	1,72±0,03	0,85±0,02
2	ФЕОРЖЯФ-2	1,83±0,04	0,86±0,01
3	ФЕОРЖЯФ-3	2,03±0,04	1,01±0,04
4	ФЕОРЖЯФ-4	2,10±0,04	1,11±0,03
5	ФЕОРЖЯФ-5	1,87±0,05	0,91±0,02
6	ФЕОРЖЯФД	2,04±0,05	1,07±0,05
7	ФЕОРЖЯФЧ	1,84±0,04	0,91±0,02
8	ФЕОРЖЯФЧП	1,91±0,03	0,90±0,03
9	Перемога	1,98±0,02	0,96±0,03
10	Євро-12	2,04±0,05	1,06±0,02
11	Міраж	1,69±0,02	0,99±0,03
12	Клондайк	1,74±0,03	0,82±0,01

За шириною насіння також встановлено суттєві розбіжності між досліджуваними сортами та сортозразками *C. sativa*. Цей показник у досліджуваних зразках змінювався в межах 0,85-1,11 мм. Найширше насіння було у ФЕОРЖЯФ-4, найвужче – у ФЕОРЖЯФ-1. Три зразки з найбільшою шириною насіння мали і найбільшу довжину. Значна частина, тобто 7 зразків, мали ширину від 0,86 до 1 мм.

Залежно від формових особливостей рослин, розмірів насінин *C. sativa*, маса 1000 насінин також вирізнялась і становила 1,5-2,4 г (табл. 3.8). Крупніше насіння *C. sativa* мало масу (1000 шт.) від 2,1 до 2,4 г (ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФД, сорт Євро-12), дрібніше – 1,5-1,67 г (ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФЧП).

Таблиця 3.8.

Маса насінин *C. sativa* залежно від сортозразкових та сортових особливостей рослин

№ п/п	Сортозразок, сорт	Маса 1000 шт. насінин, г
1	ФЕОРЖЯФ-1	1,50
2	ФЕОРЖЯФ-2	1,57
3	ФЕОРЖЯФ-3	2,10
4	ФЕОРЖЯФ-4	2,40
5	ФЕОРЖЯФ-5	1,67
6	ФЕОРЖЯФД	2,19
7	ФЕОРЖЯФЧ	1,82
8	ФЕОРЖЯФЧП	1,69
9	Перемога	1,90
10	Євро-12	2,20
11	Міраж	1,78
12	Клондайк	1,72

Зокрема, маса 1000 шт. насіння деяких сортів (Євро-12) та сортозразків (ФЕОРЖЯФД та ФЕОРЖЯФ-4) була більшою при порівнянні 30 генотипів *C. sativa* [263], рослин рижію [279] та продуктивних зразків рижію, що були отриманні шляхом індукції мутагенезу за допомогою ЕМС сорту Міраж [280, 282].

У результаті проведених нами досліджень було підраховано, що нові сортозразки та сорти рижію можуть формувати 3-4 т/га насіння із вмістом олії 36-43% при її виході 1000-1300 кг/га. Ці показники урожайності рижію слід оцінювати як достатньо високі для отримання біодизелю. Одночасно за іншими показниками урожайності досліджуваних генотипів ярого рижію сягала 25 т/га біомаси, 5-8 т/га сухої речовини, 0,8-1,0 т/га протеїну, що вказує на перспективність використання цієї культури для кормових цілей як високобілкової та високовітамінної сировини. За показниками урожайності насіння описані нами нові форми та сорти рижію перевищують всі досліджувані та описані сорти, що вирощуються в Австрії [263] та Румунії [279], а також сорти і мутанти, досліджені Комаровою [2010] і Лях та Комаровою [2010]. Важливим також є та обставина, що у результаті мінералізації органічної маси рижій залишає у ґрунті понад 70 кг/га азоту, 30 – фосфору, 85 – калію, 35 кг/га – кальцію, значна частина якої повертається з нижніх шарів ґрунту.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про те, що нові сортозразки та сорти рижію української селекції суттєво вирізняються за морфологічними особливостями та характеризуються високим продукційним потенціалом. Основні морфометричні показники рослин залежать від формового різноманіття, умов вегетації, фази розвитку, строків та способів сівби, а також від елементів догляду за посівами. Це дозволяє зробити висновок, що генофонд ярого рижію, створений в Національному ботанічному саду ім. М.М.Гришка НАН України, може зайняти важливе місце у виробництві олії для отримання

біодизелю та створення високобілкових кормів у вигляді шроту та макухи. За основними морфометричними параметрами рослин встановлено суттєву перевагу сортів Перемога та Євро-12.

3.3. Біохімічний аналіз сортозразків та сортів рижію посівного

Характерною особливістю рослин *Camelina sativa* є високий вміст ліпідів у насінні. Порівняльні дослідження біохімічного складу сортозразків та сортів (Табл. 3.9) *C. sativa* показали, що насіння рижію вирізняється високим вмістом ліпідів (36,04 – 43,89 %) та великим виходом з урожаєм (1058 – 1330 кг/га).

Таблиця 3.9

Вміст ліпідів у насінні та його енергетична цінність у досліджуваних сортах та сортозразках *C. sativa*

Сортозразок, сорт	Вміст ліпідів у насінні, %	Вихід ліпідів з насіння, кг/га	Вихід енергії з олії, Гкал/га
ФЕОРЖЯФ-1	38,24	1058	9,80
ФЕОРЖЯФ-2	43,89	1203	11,11
ФЕОРЖЯФ-3	42,64	1093	10,14
ФЕОРЖЯФ-4	39,49	1289	11,86
ФЕОРЖЯФ-5	38,13	1229	11,38
ФЕОРЖЯФД	42,62	1092	10,14
ФЕОРЖЯФЧ	36,56	1097	10,11
Міраж	42,66	1060	9,82
Клондайк	36,04	1105	10,17
Перемога	42,55	1282	11,96
Євро-12	39,35	1330	12,35

Олія *Camelina sativa* має високу теплоємність, що забезпечує великий вихід енергії на одиницю площі (9,80-12,35 Гкал/га). Як за вмістом ліпідів у насінні, так і за виходом енергії з олії мали перевагу сорти Перемога, Євро-12 та сортозразк ФЕОРЖЯФ-4.

Якість та напрям використання олії визначаються її жирнокислотним складом. Найбільшу частку в олії насінні рижію мають поліненасичені та мононенасичені жирні кислоти. Так, найбільший вміст поліненасиченої ліноленової кислоти зафіксовано у сортозразка ФЕОРЖЯФД (38,3 %) та сорту Євро-12 (35,6 %) (Табл. 3.10). Сорт Клондайк та сортозразки ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ відрізнялися вищим вмістом лінолевої кислоти порівняно з іншими зразками.

Таблиця 3.10.

Вміст поліненасичених жирних кислот в олії з насіння *C. sativa* у досліджуваних сортозразків і сортів, %

Сортозразк, рижію посівного	сорт	Лінолева (18:2)	Ліноленова (18:3)
ФЕОРЖЯФ-1		20,094	34,066
ФЕОРЖЯФ-2		20,028	32,496
ФЕОРЖЯФ-3		20,577	32,447
ФЕОРЖЯФ-4		21,860	31,353
ФЕОРЖЯФ-5		20,963	34,967
ФЕОРЖЯФД		20,445	38,271
ФЕОРЖЯФЧ		21,619	33,110
ФЕОРЖЯФЧП		21,981	32,858
Міраж		20,460	32,732
Клондайк		24,646	31,609
Перемога		21,186	32,271
Євро-12		19,762	35,564

Серед насичених кислот за вмістом у складі олії *C. sativa* переважала пальмітинова кислота (Табл. 3.11). Найбільше її містило насіння сорту Клондайк (11,4 %).

Таблиця 3.11.

Вміст насичених жирних кислот в олії з насіння *C. sativa* у досліджуваних сортозразків і сортів, %

Сортозразк, сорт рижю посівного	Міристинова (14:0)	Пентадеканова (15:)	Пальмітинова (16:0)	Маргарінова (17:0)	Стеаринова (18:0)	Арахінова (20:0)	Бегенова (22:0)	Лігноцеринова (24:0)
ФЕОРЖЯФ-1	0,166	-	9,409	-	2,524	1,219	0,230	0,068
ФЕОРЖЯФ-2	0,136	0,048	9,534	0,065	1,649	0,436	0,151	0,099
ФЕОРЖЯФ-3	0,154	0,058	10,483	0,061	3,062	1,043	0,289	0,129
ФЕОРЖЯФ-4	0,160	0,069	11,083	0,061	2,893	0,895	0,287	0,061
ФЕОРЖЯФ-5	0,137	0,055	9,833	0,053	2,401	1,019	0,331	0,062
ФЕОРЖЯФД	0,202	0,111	9,919	0,109	2,090	0,842	0,252	0,054
ФЕОРЖЯФЧ	0,151	0,067	10,774	0,061	2,780	0,871	0,331	0,076
ФЕОРЖЯФЧ П	0,147	0,053	9,105	0,054	1,923	1,030	0,524	0,158
Міраж	0,138	-	9,593	-	2,594	0,980	0,188	0,093
Клондайк	0,169	0,086	11,426	0,057	1,728	0,951	0,221	0,089
Перемога	0,136	0,053	9,780	0,061	1,854	0,708	0,180	0,090
Євро-12	0,174	0,070	9,660	0,063	2,685	1,139	0,490	0,082

З високим вмістом олеїнової кислоти заслуговував на увагу сортозразок ФЕОРЖЯФ-2 (18,5 %), сорти Міраж (17,5 %) і Перемога (17,3 %), які придатні для отримання олії для харчових цілей (Табл. 3.12).

Щодо гондоїнової кислоти (11-ейкозенової), то найбільшим вмістом відзначились сортозразки ФЕОРЖЯФ-3 (12,8 %) та ФЕОРЖЯФ-4 (12,9 %).

Для використання олії для технічних та енергетичних цілей цінними є сортозразки ФЕОРЖЯФЧП, ФЕОРЖЯФ-5 та Євро-12, які характеризувались високим вмістом ерукової кислоти, яка є цінною сировиною для виробництва біодизельного палива [287].

Таблиця 3.12.

Вміст мононенасичених жирних кислот в олії з насіння *C. sativa* у досліджуваних сортозразків і сортів, %

Сортозразк, сорт рижію посівного	Пальміто- леїнова (16:0)	Олеїнова (18:1)	Нервонова (24:1ω9)	Гондоїнова (20:1ω9)	Ерукова (22:1)
ФЕОРЖЯФ-1	0,193	16,717	0,108	10,777	1,466
ФЕОРЖЯФ-2	0,182	18,467	0,187	12,497	1,554
ФЕОРЖЯФ-3	0,188	13,803	0,244	12,837	1,737
ФЕОРЖЯФ-4	0,185	13,188	0,220	12,909	1,845
ФЕОРЖЯФ-5	0,158	11,995	0,224	12,456	2,015
ФЕОРЖЯФД	0,075	14,143	0,182	9,531	1,277
ФЕОРЖЯФЧ	0,183	13,218	0,237	11,738	1,772
ФЕОРЖЯФЧП	0,161	15,276	0,205	11,420	2,368
Міраж	0,177	17,482	0,258	9,951	1,716
Клондайк	0,186	13,515	0,263	10,768	1,702
Перемога	0,149	17,319	0,161	12,050	1,379
Євро-12	0,185	13,046	0,200	11,645	1,861

Отже, встановлено, що для всіх сортозразків та сортів характерним є високий вміст ліноленової, лінолевої, олеїнової, гондоїнової (11-ейкозенової) та пальмітинової кислот, а також властивої всім представникам родини *Brassicaceae* ерукової кислоти [288].

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про те, що нові сортозразки та сорти рижю суттєво вирізняються за морфологічними особливостями та характеризуються високим продукційним потенціалом. З метою рекомендації для подальшого використання колекційних зразків було проведено порівняльний аналіз за вмістом олії та жирнокислотним складом. Для розробки методів подальшого біотехнологічного вдосконалення нами було обрано два сорти рижю Перемога та Євро-12.

Основні наукові результати висвітлені в наступних публікаціях [56, 278].

РОЗДІЛ 4

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН РИЖІЮ ПОСІВНОГО

Добре відомо, що ефективні методи введення в культуру *in vitro* та регенерації пагонів є важливою передумовою для подальшого успішного проведення експериментів по генетичній трансформації. Здатність регенерувати адвентивні пагони у клітин або тканин, що використовуються для генетичної трансформації, значно впливає на успіх трансформації. Привнесення в рослинні клітини генів, що кодують агрономічно цінні ознаки, є марним, якщо неможливо регенерувати трансгенну рослину. Регенерація пагонів *in vitro* залежить від умов культивування експлантів, складу живильних середовищ і таких параметрів, як освітлення та температура. Тип експланту є головним фактором, що визначає регенераційну здатність рослини певного виду. Життєздатність, вік та розмір експланту, а також його походження за типом тканин дуже важливі для регенерування пагонів. Для отримання великої кількості трансгенних рослин рівень регенерації пагонів в культурі *in vitro* має бути настільки високим, наскільки це можливо. Таким чином, до початку робіт з перенесення чужорідних генів необхідно було оптимізувати систему регенерації пагонів з експлантів для кожного сорту/сортозразка *C. sativa*.

4.1. Оптимізація протоколу стерилізації насіння

Одним з основних етапів введення в культуру *in vitro* є стерилізація рослинного матеріалу та вибір типу експланту. Одержання стерильного (асептичного) рослинного матеріалу – складне завдання, тому що, з

одного боку, необхідно позбутися мікроорганізмів, з іншого боку, дана обробка не повинна впливати на життєздатність та регенераційну здатність експлантів, що залежить від концентрації стерилізуючого агенту та тривалості стерилізації [289].

Як правило, для ефективної поверхневої стерилізації використовують етанол та розчин гіпохлориту натрію [20]. На першому етапі нами було визначено та встановлено ефективні концентрації стерилізуючих агентів та час обробки ними насіння рижію посівного. Як видно з табл. 4.1 незалежно від часу обробки насіння при використанні гіпохлориту натрію в концентрації 1 % на 5-й день спостерігали контамінацію вихідного матеріалу.

Таблиця 4.1

Результати стерилізації рижію посівного

Варіанти концентрацій та часу обробки гіпохлоритом натрію	Контамінація
1%-ний розчин, 5 хв	+
1%-ний розчин, 10 хв	+
1,5%-ний розчин, 1 хв	+
1,5%-ний розчин, 3 хв	+
1,5%-ний розчин, 5 хв	—
1,5%-ний розчин, 6 хв	—
1,5%-ний розчин, 7 хв	—
1,5%-ний розчин, 10 хв	—
1,5%-ний розчин, 15 хв	—

Примітка: „+” – присутня контамінація; „—” – відсутня контамінація.

При обробці насіння 1,5 %-м гіпохлоритом натрію протягом 3 хв у сорта Перемога та 5 хв – у сорта Євро-12 також спостерігалась

контамінація. Стовідсоткову ефективність стерилізації насіння в умовах *in vitro* для сорту Перемога вдалось отримати після 5-хвилинної обробки 1,5 %-м гіпохлоритом натрію та майже стовідсоткову ефективність стерилізації (97 %) спостерігали при 6- та 7-хвилинній обробці. При цьому, стерильне насіння накльовувалося вже через добу після стерилізації, на сьому добу проростки мали нормальну морфологію та утворювали добре розвинені корені.

Проте, для сорту Євро-12 оптимальним варіантом виявилась 6-7-хвилинна обробка 1,5 %-м гіпохлоритом натрію, так як при цьому зараження не спостерігалось, а відсоток проростання насіння складав 100 % (рис 4.1).

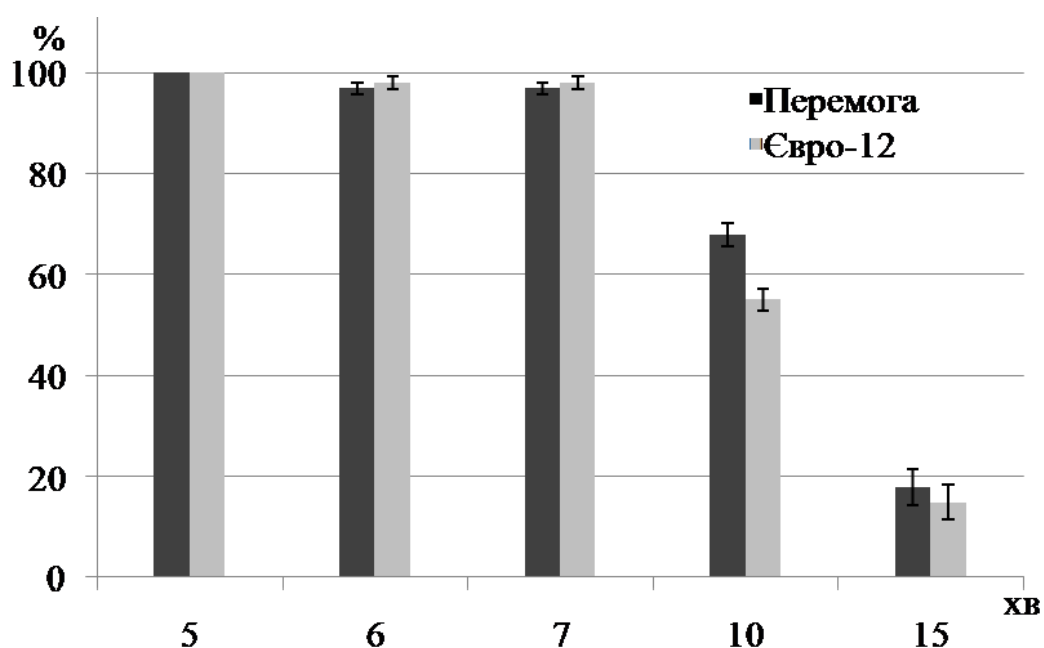


Рис. 4.1. Ефективність проростання насіння після обробки 1,5%-им розчином гіпохлориту натрію: по вертикалі – ефективність проростання насіння, %; по горизонталі – тривалість стерилізації, хв.

Слід зауважити, що при збільшенні тривалості обробки стерилізуючим агентом (10-15 хв) проростання насіння починалось

значно пізніше та зменшувалась сама швидкість його проростання (рис 4.2). Негативний вплив більш тривалого контакту з розчином гіпохлориту натрію відображався на морфології, зокрема, нами було відмічено потовщення та значне вкорочення гіпокотилів, в деяких випадках скручування сім'ядолей та припинення росту гіпокотилів. Щодо коренів, вони також були вкорочені та потовщені, а в деяких випадках взагалі були відсутні.

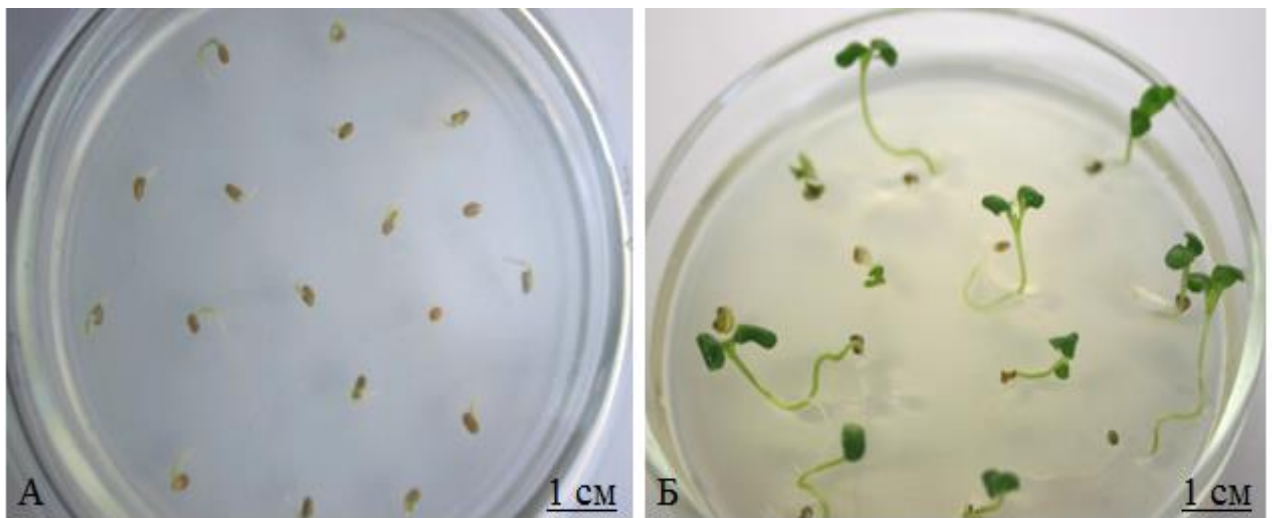


Рис. 4.2. Проростки після стерилізації 1,5 %-ним гіпохлоритом натрію. Тривалість стерилізації А) 15 хв; Б) 6 хв

Враховуючи тривалість обробки та концентрацію розчину наші результати не зовсім співпадають з отриманими раніше даними [20]. Виходячи з отриманих нами даних найбільш оптимальними умовами стерилізації насіння досліджуваних сортів *C. sativa* були 5-7-хвилинна тривалість обробки насіння 1,5 %- м гіпохлоритом натрію як для сорту Перемога, так і для сорту Євро-12.

4.2. Дослідження морфо-генетичного потенціалу різних типів експлантів

Відомо, що для ініціації органогенезу в умовах *in vitro* у багатьох видів рослин родини *Brassicaceae* зазвичай використовують сім'ядолі та гіпокотилі, як найбільш оптимальний тип експлантів [131, 148]. Для визначення ефективності використання різних експлантів та їх віку, для введення в культуру *in vitro* в наших дослідженнях було використано експланти сім'ядольних листків та гіпокотилів 5-, 7-, 9- та 14- денних проростків двох сортів ріжю: Перемога та Євро-12.

Через два-три тижні культивування на експлантах сім'ядольних листків та гіпокотилів ріжю по краях зрізів спостерігали утворення калюсу (рис. 4.3.). Колір калюсу варіював від світло-жовтого до зеленого, а сама структура калюсу була рихлою як на гіпокотиліях так, і на сім'ядолях. У результаті досліджень було виявлено, що утворення калюсу на сім'ядольних листках відбувалося значно швидше, ніж на експлантах гіпокотилів.

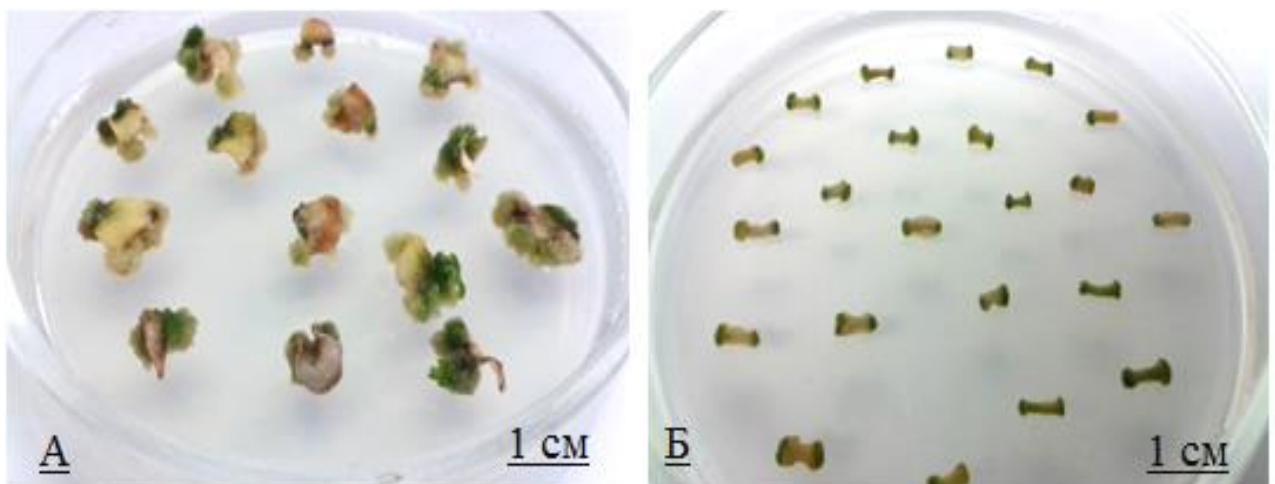


Рис. 4. 3. Індукція калюсогенезу з різних типів експлантів: А - формування калюсу на сім'ядольних листках; В – формування калюсу на сегментах гіпокотилів.

Початок регенерації пагонів спостерігали після 3-4 тижнів культивування, причому найбільшою здатністю до регенерації характеризувались експланти 5- та 7-ми денних проростків, тоді, як у 9-денних ефективність пагоноутворення значно зменшувалась у всіх досліджуваних зразках. На експлантах 14-денних проростків формування калюсних структур відбувалось більш сповільнено, а формування зачатків пагонів взагалі не спостерігалось. Серед двох сортів, що досліджували, експланти сорту Перемога незалежно від віку проростків характеризувалися дещо більшою здатністю до регенерації пагонів, ніж сорт Євро-12 (Табл. 4.2-4.3.).

Таблиця 4.2

Вплив віку експлантів сім'ядолей *C. sativa* на частоту пагоноутворення

Сорт	Частота пагоноутворення з експлантів сім'ядолей, %		
	Вік проростків, з яких отримано експланти, діб		
	5	7	9
Перемога	51,9±1,7	60,2±2,1	33,9±3,6
Євро-12	51,8±2,2	58,6±2,6	29,2±4,2

Таблиця 4.3

Вплив віку експлантів гіпокотилів *C. sativa* на частоту пагоноутворення

Сорт	Частота пагоноутворення з експлантів гіпокотилів, %		
	Вік проростків, з яких отримано експланти, діб		
	5	7	9
Перемога	31,6±3,9	33,9±1,5	21,7±3,5
Євро-12	31,2±0,8	25,4±3,5	19,1±2,4

У обох сортів істотних відмінностей між 5- та 7-денними проростками не відмічали, однак кількість експлантів з регенованими пагонами була значно меншою, ніж у 9-денних рослин.

Можливо це пов'язано з тим, що у проростків на 6-8 добу культивування починають розгортатися сім'ядольні листочки, на які витрачаються поживні речовини сім'ядолі. Тому, як правило, для регенерації рослин з сім'ядольних експлантів використовують проростки до появи перших справжніх листочків. Таким чином, нами продемонстровано, що для ефективної регенерації пагонів *C. sativa* доцільно використовувати експланти проростків на більш ранніх стадіях їх розвитку. В нашому випадку це 5- або 7-денні проростки, оскільки ефективність регенерації пагонів на їх експлантах була вищою в порівнянні з 9-денними проростками. Відносно типу екпланту, то в однаковій мірі для регенерації пагонів можна використовувати як сім'ядольні листки, так і гіпокотилі.

Слід зазначити, що отримані нами результати дещо відрізняються від тих, що були отримані в роботі Göre & Kurt (2015). В даній роботі використовували 21-денні проростки, як екпланти брали корінь, 1-ше та 2-ге міжвузля, а також 1-й та 2-й листки. Результати досліджень показали, що максимальною частотою регенерації пагонів характеризувались експланти міжвузля – 44 %, дещо меншою була частота регенерації з експлантів листків – 22,5 % та 6,4 % з коренів [18]. Хоча авторами більш ранньої роботи було встановлено, що регенерація пагонів з експлантів листків більш ефективно відбувалася, ніж з експлантів гіпокотилів [17].

4.3. Дослідження впливу фітогормонів на індукцію пагоноутворення та укорінення у *C. sativa*

Найважливішу роль в індукції поділу клітин екпланту, утворенні калюсу та морфогенезі відіграють регулятори росту. Відомо, що у ряда

представників родини хрестоцвітих формування пагонів відбувається в присутності як цитокинінів, які здатні викликати поділ клітин та ініціювати диференціацію пагонів, так і при сумісному додаванні в середовище різних комбінацій регуляторів цитокинінової та ауксинової природи [131, 148, 149, 187]. Найбільш ефективна регенерація пагонів рижію відбувається на середовищах, що містять цитокиніни в комбінації з ауксинами [17, 18].

Отже, в якості експлантів нами було обрано сегменти гіпокотилів та сім'ядольних листків 5- та 7-денних проростків насіння, оскільки, як виявилось, дані експланти є найбільш придатними для пагоноутворення. Для вивчення процесу регенерації пагонів у *C. sativa* нами було протестовано декілька варіантів середовищ, які відрізнялись або концентрацією фітогормону БАП (1 – 4 мг/л), або містили різні співвідношення БАП (1 або 2 мг/л) та НОК (0,1 мг/л). Також досліджували вплив двох концентрацій сахарози (10 та 20 г/л) на процес формування пагонів у поєднанні з усіма варіантами концентрацій фітогормонів. Потім для індукції ризогенезу у отриманих пагонів використовували різні концентрації НОК (0,1; 0,5; 1 мг/л).

У результаті проведених досліджень було виявлено, що процес диференціації клітин відбувався доволі швидко, вже наприкінці третього тижня культивування ріст калюсу дещо сповільнювався, але при цьому спостерігали інтенсивне пагоноутворення на його поверхні (рис. 4.4).

На середовищі, яке містило БАП в комбінації з НОК, формування пагонів відбувалося набагато інтенсивніше в порівнянні з середовищем, що містило лише БАП (Рис.4.5). Така тенденція була характерною для всіх типів експлантів, отриманих як з п'ятиденних, так і семиденних проростків.



Рис. 4.4. Формування зачатків та регенерація пагонів з сім'ядольних листків рижію сорту Перемога через три тижні культивування.

При цьому найбільша кількість пагонів на один експлант для сім'ядольних листків становила 2-3 шт., а для гіпокотилів – 1-2 шт. (Рис. 4.6).



Рис. 4.5. Регенерація пагонів рижію сорту Євро-12 на середовищі з 2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК.

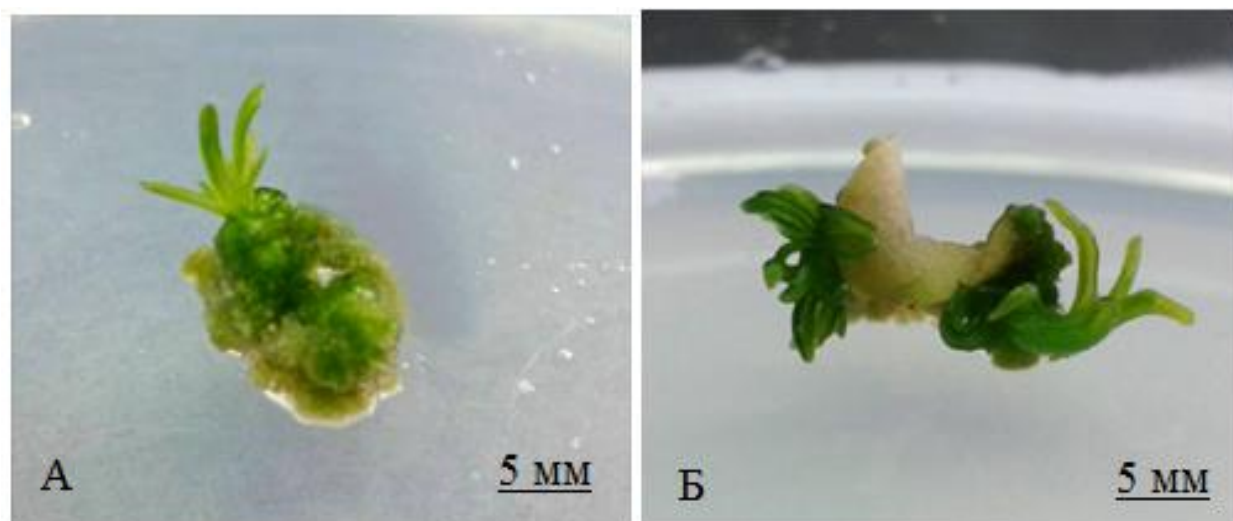
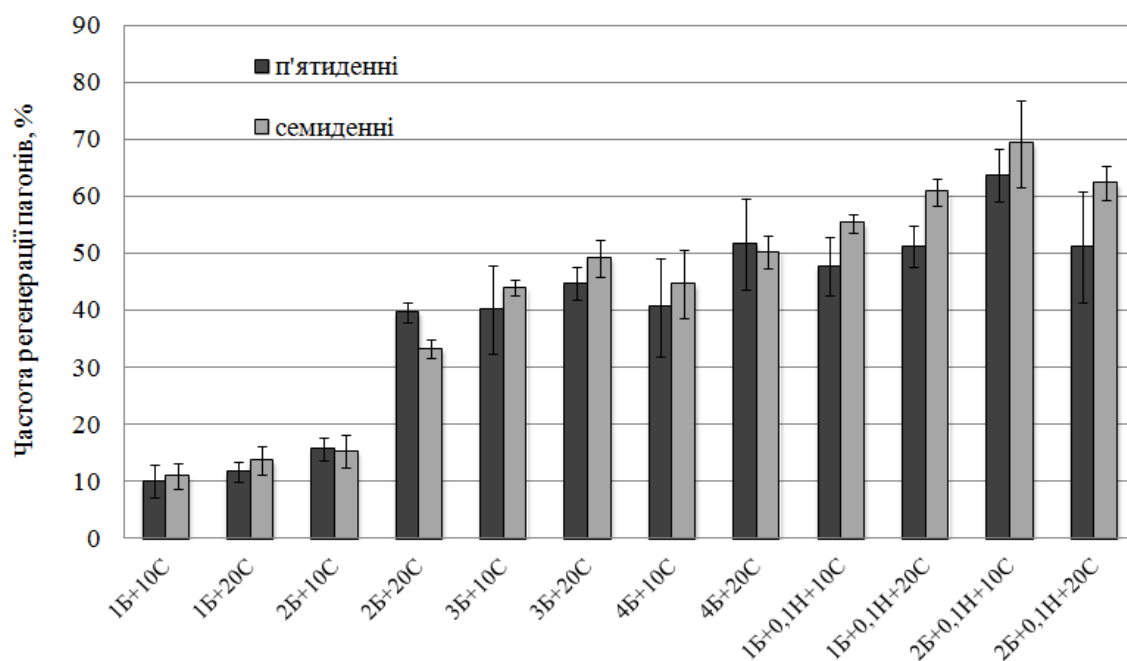


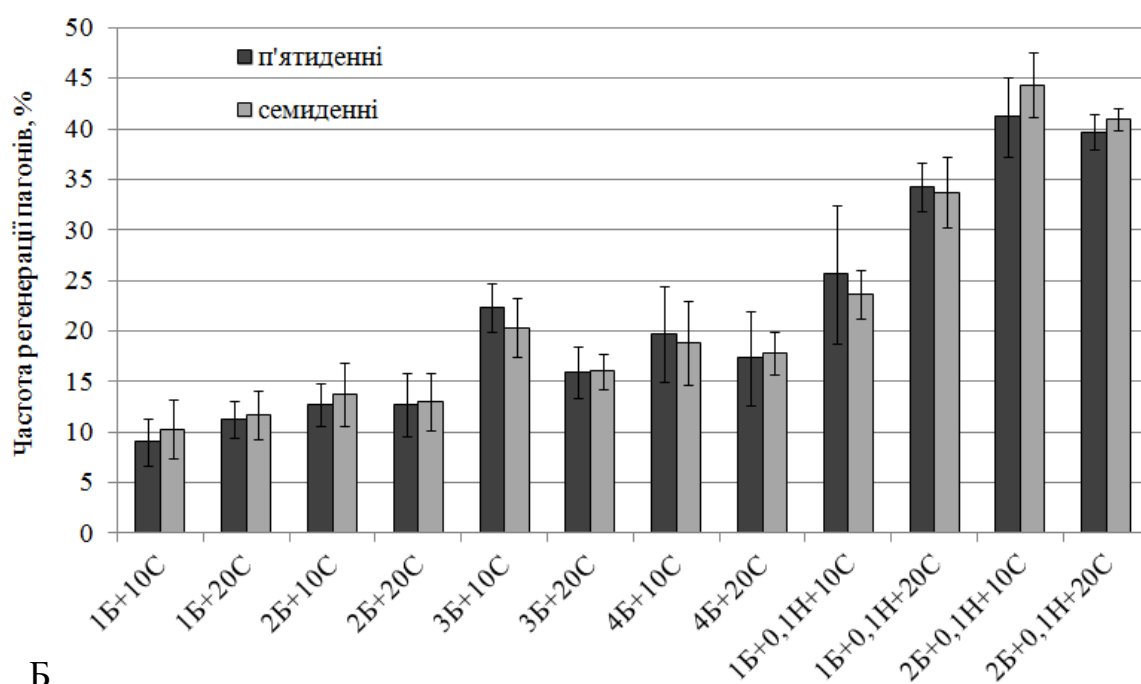
Рис. 4.6. Регенерація пагонів з експлантів гіпокотилів проростків (А) та сім'ядольних листків (Б) сорту Перемога.

За використання середовища, що містило в своєму складі лише БАП, незалежно від концентрації, регенерація пагонів відбувалась менш ефективно. Так, частота регенерації пагонів на експлантах сім'ядольних листків була 51,7 % для 5-денних та 50,3 % для 7-денних проростків. Щодо експлантів гіпокотилів, то показник частоти регенерації був на рівні 22 %. Найвищу частоту регенерації пагонів з експлантів рижію отримано на середовищах, що містили БАП в концентрації 1 – 2,0 мг/л та 0,1 мг/л НОК. Вона становила майже 70 % у експлантів сім'ядольних листків та 45 % у експлантів гіпокотилів (Рис. 4.7).

Найбільш ефективним джерелом вуглецю для культур клітин і тканин рослин найчастіше слугує сахароза. Рослинні культури не можуть синтезувати *in vitro* необхідну для їх нормального розвитку кількість вуглеводів, тому в живильні середовища сахарозу додають в концентрації 20-30 г/л, що рекомендовано для більшості живильних середовищ [290]. Відомо, що змінюючи рівень сахарози, можна істотно впливати на характер морфогенетичного процесу, особливо при взаємодії з регуляторами росту.



А



Б

Рис. 4.7. Частота регенерації пагонів з різних експлантів сорту Перемога на середовищах, що містять різні комбінації фітогормонів: А - сім'ядольні листки; Б – гіпокотилі (Б – БАП; Н – НОК; С – сахароза).

В нашому випадку було встановлено, що за використання 20 г/л сахарози цей процес відбувався з більшою частотою, ніж за використання

10 г/л, але істотного впливу сахарози в різних концентраціях на процес пагоноутворення не спостерігали. В той час, як інші автори [131] повідомляли, що відсоток пагоноутворення підвищувався при збільшенні концентрації сахарози.

Відомо, що коренеутворення (ризогенез) та подальша адаптація до умов закритого чи відкритого ґрунту є найбільш важко здійсненними етапами при культивуванні *in vitro* будь-якого рослинного матеріалу. Якщо регенерація пагонів хрестоцвітих в умовах *in vitro* відбувається за дії цитокінінів та їх комбінації з ауксинами, то укорінення отриманих регенерантів – за дії лише ауксинів [208, 132, 189, 291]. В наших дослідженнях при вивченні процесу ризогенезу було виявлено, що ініціація утворення коренів відбувалась на середовищі МС з додаванням 1 мг/л НОК. Для цього, регеновані пагони переносили на відповідне середовище. Через 2 - 3 тижні культивування на місці зрізу стебла спостерігали формування калюсних клітин, з яких згодом утворювалися корені (Рис 4.8). Слід відмітити, що при додаванні 0,1 чи 0,5 мг/л НОК формування коренів у регенованих пагонів взагалі не спостерігалось. Отримані нами дані дещо відрізняються від досліджень інших авторів, які виявили, що процес коренеутворення у регенерантів представників родини *Brassicaceae*, зокрема *B.rapa* та *B.napus*, ефективніше проходив на середовищі, яке містило ½ МС з додаванням НОК в концентрації 0,5 мг/л. Для рижію було показано, що відсоток коренеутворення збільшувався при додаванні НОК в концентрації 2 мг/л [17]. Хоча дані інших дослідників свідчать про те, що достатньо і 0,25 мг/л НОК для індукції коренеутворення [20].

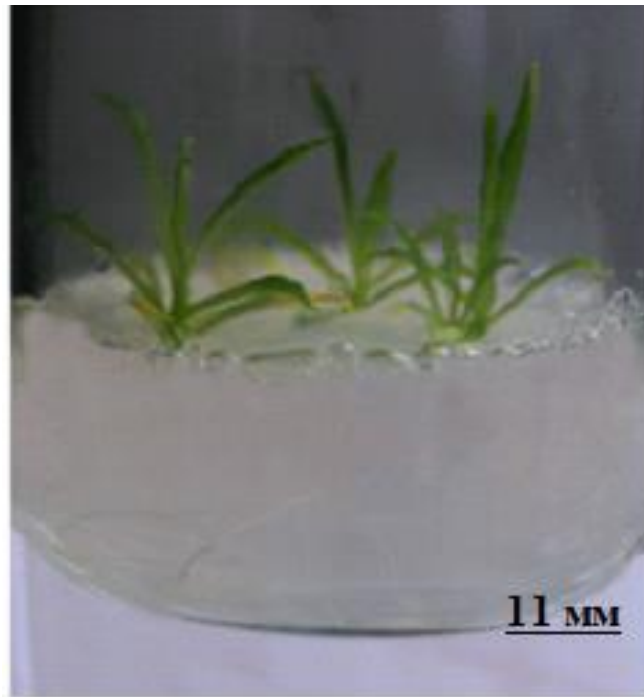


Рис. 4.8. Укорінені регенеранти рижю сорту Перемога в умовах *in vitro*.

Таким чином, було встановлено, що найбільш ефективним для регенерації пагонів *C. sativa* є середовище МС, що містило в якості фітогормонів 1-2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, а для їх укорінення – середовище МС з 1 мг/л НОК.

4. 4. Оцінка морфогенетичного потенціалу у досліджуваних сортозразків і сортів рижю

Серед багатьох факторів, які впливають на морфогенез в культурі є вибір генотипу, який є не менш важливим, ніж підбір умов культивування. На основі отриманих результатів за використання сорту Перемога було проведено аналіз ефективності регенерації пагонів всіх інших досліджуваних форм та сортів рижю (Рис. 4.9).

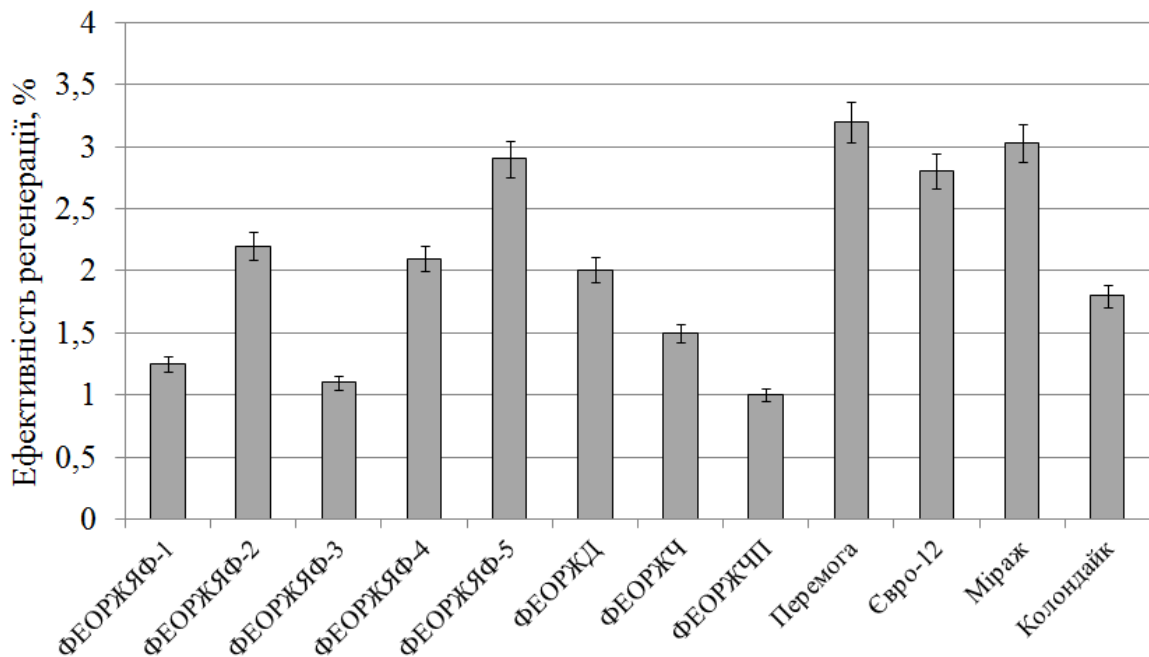


Рис. 4.9. Ефективність регенерації рослин у досліджуваних форм та сортів *C. sativa*.

Як видно з отриманих даних найбільша кількість регенерантів на експлат була у сортів Перемога (3,2 %) та Міраж (3,03 %). Ефективність регенерації дещо зменшувалась у сорту Євро-12 (2,8 %) Найменшу кількість регенерованих рослин було отримано у сорту Колондайк, у нього ефективність становила менше 2 %. Що стосується сортозразків, то ФЕОРЖЯФ-3 та ФЕОРЖЧП продукували найменшу кількість регенерантів (1 та 1,1 %), тоді як ФЕОРЖЯФ-5 характеризувався найбільшою здатністю до регенерації рослин серед усіх сортозразків (2,9 %).

Якщо основні морфометричні показники рослин рижю, крім формового різноманіття, залежать від екзогенних факторів, то можна вважати, що відмінність морфогенетичних реакцій різних генотипів визначається балансом ендогенних факторів – фітогормонів. Різноманітні морфогенетичні реакції в культурі *in vitro* були відмічені серед сортів

багатьох видів, таких як *Crataegus pinnatifida* [292], *Helianthus annuus* [293], та *Brassica napus* [147].

У результаті проведених досліджень було виявлено, що три сорти та один сортозразок характеризуються досить високим морфогенетичним потенціалом. Це сорти Перемога, Міраж, Євро-12 та сортозразок ФЕОРЖЯФ-5.

Результати досліджень представлені в наступних публікаціях [294, 295].

РОЗДІЛ 5

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТА АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ ЛІНІЙ *C. SATIVA*

5.1. Підбір селективних концентрацій гігроміцину

Інфікування агробактерією, ко-культивування, селекція на селективному середовищі з одночасним застосуванням реагенту для знищення бактерій після трансформації та подальша регенерація рослин це є основними етапами, з яких складається процес генетичної трансформації рослин. Одним із основних факторів, від якого залежить ефективність трансформації є визначення селективної концентрації агента, оскільки селекція – це важливий момент при відборі трансгенних ліній [296]. Добре відомо, що процес трансформації та подальше тривале культивування тканин в умовах *in vitro* значно знижують їх морфогенетичну здатність. Тому потрібно обирати оптимальну концентрацію селективного агента, який забезпечує ефективну селекцію трансгенних рослин, а також не буде перешкоджати морфогенезу та подальшій регенерації рослин. Беручи до уваги той факт, що конструкція для трансформації містила селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігроміцину у трансгенних рослин, нами було проведено ряд досліджень щодо вивчення його впливу різних концентрацій даного селективного агента на життєздатність експлантів рижію посівного для встановлення найбільш ефективної при відборі трансгенних ліній. Хоча гігроміцин давно використовують для селекції трансгенних рослин, однак не існує даних щодо єдиної ефективної концентрації цього антибіотика для відбору трансгенних рослин. Тому, для встановлення селективної концентрації гігроміцину спочатку було досліджено його дію в різних концентраціях на життєздатність експлантів рижію. Дані оцінювали після культивування на твердих середовищах, які містили гігроміцин в

концентраціях 0-15 мг/л. Дослідження по підбору селективної концентрації гігроміцину проводили на експлантах сорту Перемога, оскільки він характеризувався найвищим потенціалом щодо регенерації пагонів.

Через 2 тижні після початку культивування на експлантах спостерігали зниження життєздатності клітин калюсу за концентрації гігроміцину 5 мг/л, у порівнянні з контролем (рис. 5.1). При підвищенні концентрації агенту до 10 мг/л знижувались ознаки активності проліферації клітин та регенерації пагонів, подальше підвищення концентрації до 15 мг/л антибіотика призводило до загибелі тканин.

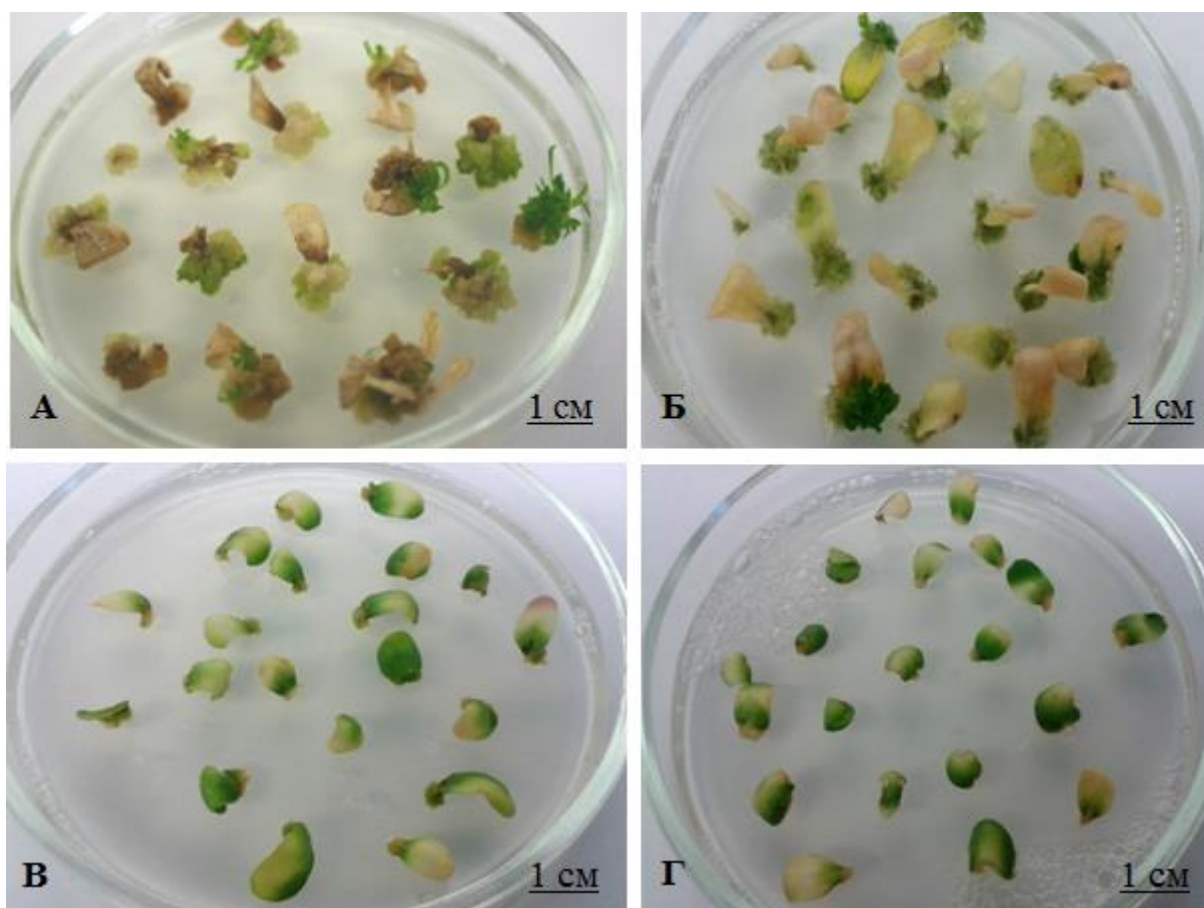


Рис. 5.1. Вплив гігроміцину (мг/л) в різних концентраціях на життєздатність експлантів сім'ядольних листків рижюю сорту Євро-12: А – контроль; Б – 5 мг/л; В – 10 мг/л; Г – 15 мг/л.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що ефективною концентрацією гігromіцину, за дії якої гинуло більше 50 % експлантів є 5 мг/л.

Також було вивчено вплив гігromіцину на проростання насіння та ріст і розвиток проростків. В контрольних умовах (на живильному середовищі без антибіотика) спостерігали 100% проростання насіння та нормальний ріст і розвиток проростків. За присутності 5 мг/л гігromіцину спостерігали формування злегка деформованих коренів, розвиток проростків дещо сповільнювався (Рис. 5.2). Щодо впливу гігromіцину в концентраціях 5 та 10 мг/л, то значних відмінностей між проростками не спостерігали, всі вони мали однакову форму та розміри, як показано на рис. 5. 3.

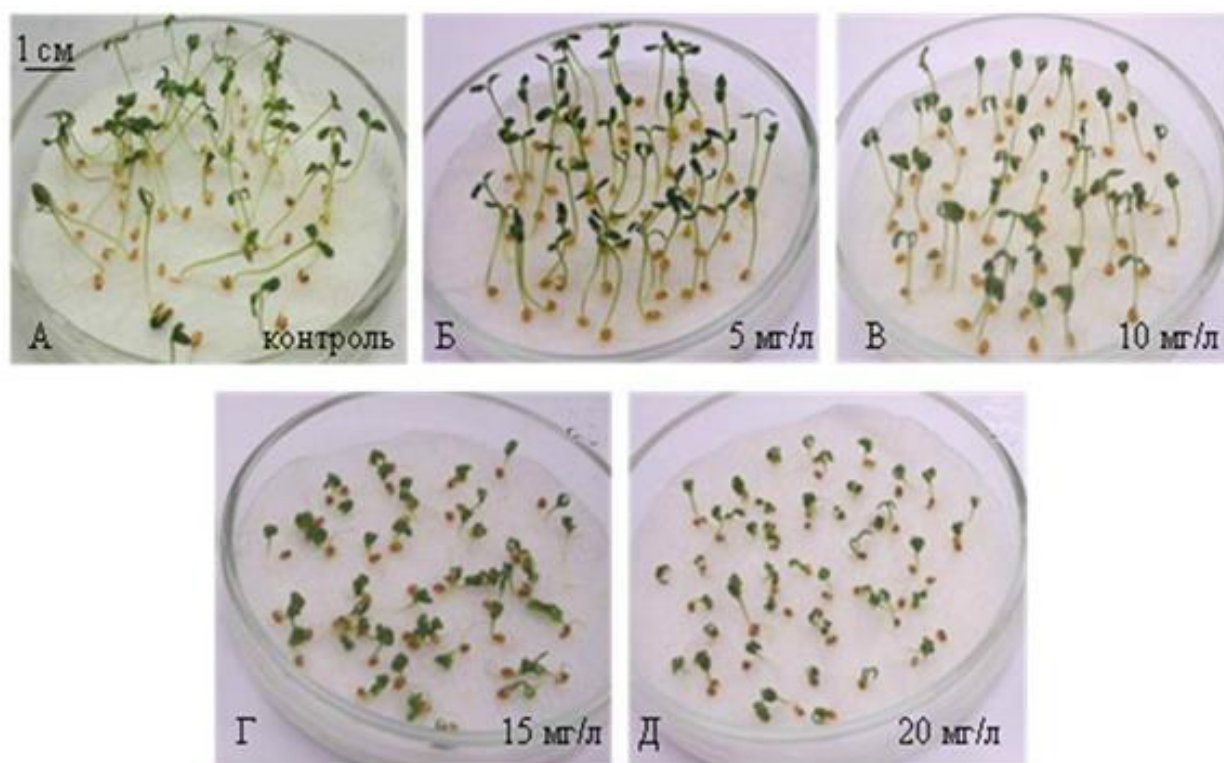


Рис. 5.2. Характер проростання насіння рижю без антибіотика (А) та у присутності гігromіцину (Б-Д).

Підвищення концентрації гігроміцину до 15 мг/л у живильному середовищі призводило до значної затримки росту проростків, тоді як за концентрації 20 мг/л спостерігали повне інгібування розвитку коренів і пагонів, довжина гіпокотилів не перевищував 4-5 мм, і вони були потовщеними. При пророщуванні насіння в присутності 15 та 20 мг/л антибіотика було встановлено, що концентрація 20 мг/л є найбільш токсичною для контролю, оскільки вже через 2 тижні всі проростки темніли і гинули.



Рис. 5.3. Морфологія проростків *C. sativa* після пророщування насіння без та у присутності (5-20 мг/л) гігроміцину

Отже, за результатами тестування на чутливість до селективного агента було встановлено, що критичною концентрацією для відбору

трансгенного насіння рижю є 20 мг/л гігromіцину, яку в подальшому було використано при селекції трансгенних ліній після трансформації методом *in planta*. Отримані результати по чутливості до гігromіцину на проростках не співпадають з даними, отриманими з використання калюсу рижю, що є очевидним і було очікуваним.

Інші дослідники [297], які визначали оптимальну концентрацію цього антибіотика, наприклад для *Arabidopsis thaliana* також відзначили, що вже після одного тижня культивування при концентрації гігromіцину більш ніж 20 мг/л спостерігали повне інгібування розвитку коренів і пагонів: зменшувалась довжина гіпокотилів, а проростки взагалі втрачали зелений колір.

5.2. *Agrobacterium*–опосередкована трансформація *C. sativa* в умовах *in vitro*

Для проведення методу генетичної трансформації використовували штам *A.tumefaciens* AGL1, що ніс векторну конструкцію pGH217, до складу якої входив репортерний ген *GUS*, який дозволяє досить швидко визначати транз'єнтну експресію перенесеного гена, а відповідно і частоту репортерної трансформації. Генетичну трансформацію *C. sativa* здійснювали двома шляхами: в умовах *in vitro* та за використання методу *in planta*, порівнюючи їх ефективність в наших дослідженнях. Отже, для трансформації як експланти використовували асептичні сім'ядольні листки та сегменти гіпокотилів.

Відомо, що процес генетичної трансформації за допомогою *A.tumefaciens* складається з декількох етапів: прикріплення бактерії до стінки рослинної клітини, проникнення Т-ДНК в середину цієї клітини, інтеграція Т-ДНК в геном та експресія чужорідних генів. Фактори, що визначають успішну інтеграцію екзогенної ДНК у геном рослини, – це тривалість інокуляції та ко-культивування з агробактерією у відсутності

антибіотика, що пригнічує її ріст, та час, упродовж якого відсутній селективний тиск, тривалість та відновлення, а також регенераційний потенціал трансформованих експлантів рослин.

Для визначення умов, що дають можливість ефективно проводити трансформацію рижю, було проведено серію експериментів, в яких досліджували тривалість інокуляції та ко-культивування з агробактерією (Табл.5.1). Було встановлено, що найбільш оптимальна тривалість інокуляції як сім'ядольних листків, так і сегментів гіпокотилів агробактерією становить 15 хв.

Таблиця 5.1

Умови *Agrobacterium*–опосередкованої трансформації експлантів рижю сорту Перемога

№ варіанту експеримента	Тривалість		
	інокуляції, (хв.)	ко- культивування (діб)	відновлення експлантів (7 діб)
1	15	1	+
2	30	1	+
3	60	1	+
4	15	2	+
5	30	2	+
6	60	2	+
7	15	3	+
8	30	3	+
9	60	3	+

Тоді як збільшення часу інокуляції до 30 хв і більше призводило до негативного ефекту на рослинні тканини (Рис. 5.4.). За таких умов значна частина експлантів відмирала, або взагалі втрачала здатність до регенерації пагонів.

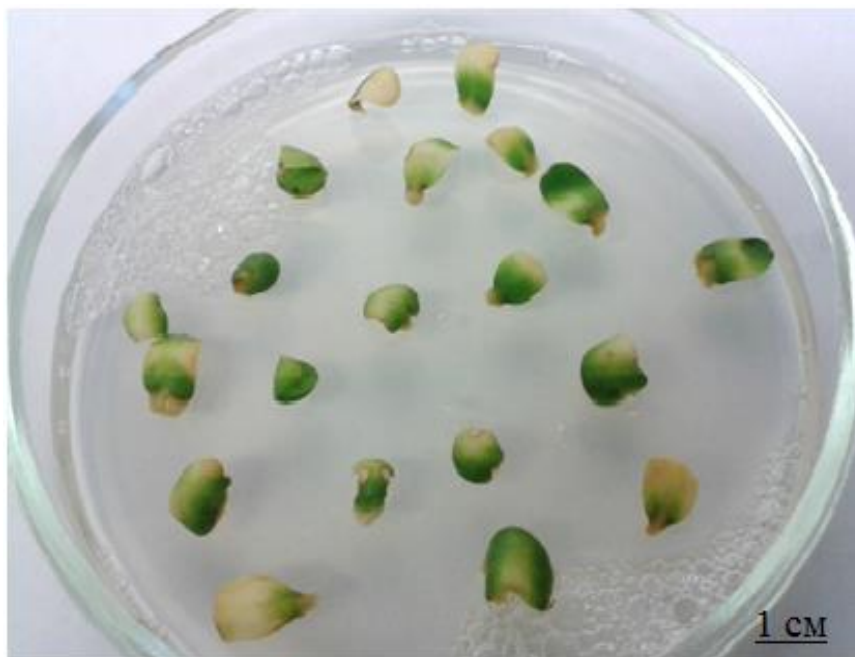


Рис. 5.4. Загальний вигляд експлантів, які втратили здатність до регенерації пагонів після тривалого контакту (30-60 хв) з агробактерією.

Необхідно зазначити, що оптична щільність суспензії агробактерії у всіх варіантах дослідів по генетичній трансформації становила 0,5. Після етапу інокуляції експланти переносили на агаризоване середовище на 1-3 доби для їх подальшого ко-культивування з агробактерією, а потім - на середовище для регенерації пагонів без селективного тиску, однак середовища містили 350 мг/л цефотаксиму для елімінації залишків агробактерії.

Після одного тижня культивування експлантів, їх переносили кожні два тижні на свіже середовище, що містили 350 мг/л цефотаксиму та селективну концентрацію (5 мг/л) гігromіцину (Рис. 5.5).

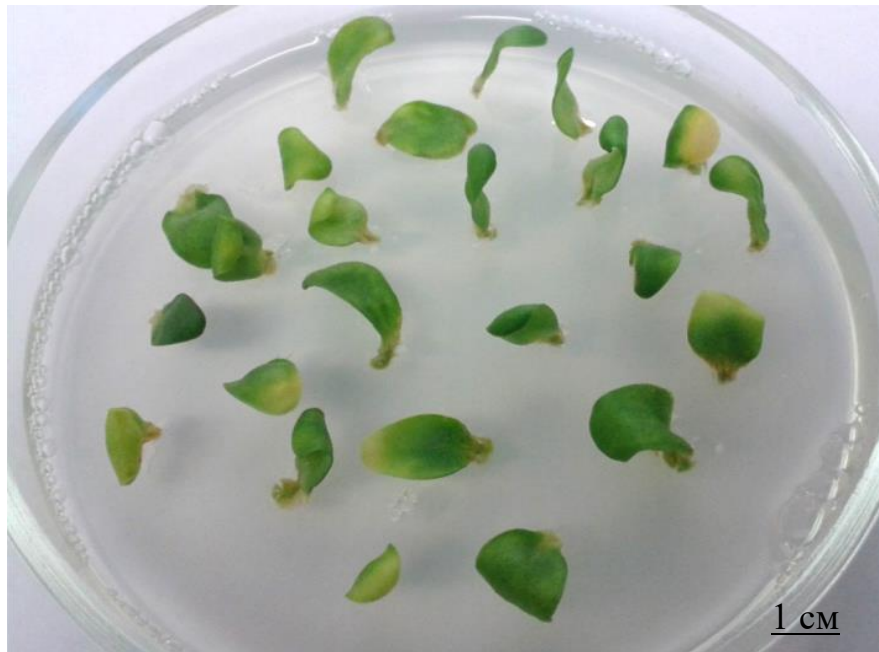


Рис. 5.5. Селекція експлантів *C.sativa* на середовищі, що містило 5 мг/л гігроміцину

Так, на селективному середовищі через 2-3 тижня після проведення трансформації на раньовій поверхні сім'ядольних листків та сегментів гіпокотилів рижію спостерігали формування калюсу. На деяких калюсах формувалися бруньки, однак при подальшому субкультивуванні значна їх частина, ставали блідими, деякі з пагонів, що утворювалися були зеленими з блідими листочками. Подальшого росту і розвитку пагонів в даному випадку на селективному середовищі не спостерігали. Подекуди, значна частина світло-зелених калюсів при культивуванні на свіжому селективному середовищі ставала білою або жовтою, в подальшому такий калюс поступово відмирав (Рис. 5.6.).

Взагалі, весь процес отримання трансгенних рослин з експлантів гіпокотилів був тривалішим, оскільки перші пагони з'являлись лише на 5-6 тиждень після початку трансформації. Регенерація пагонів із сім'ядольних листків відбувалась значно раніше, на 4-5 тиждень, самі рослини були помітно більш життєздатними, краще розвинутими.

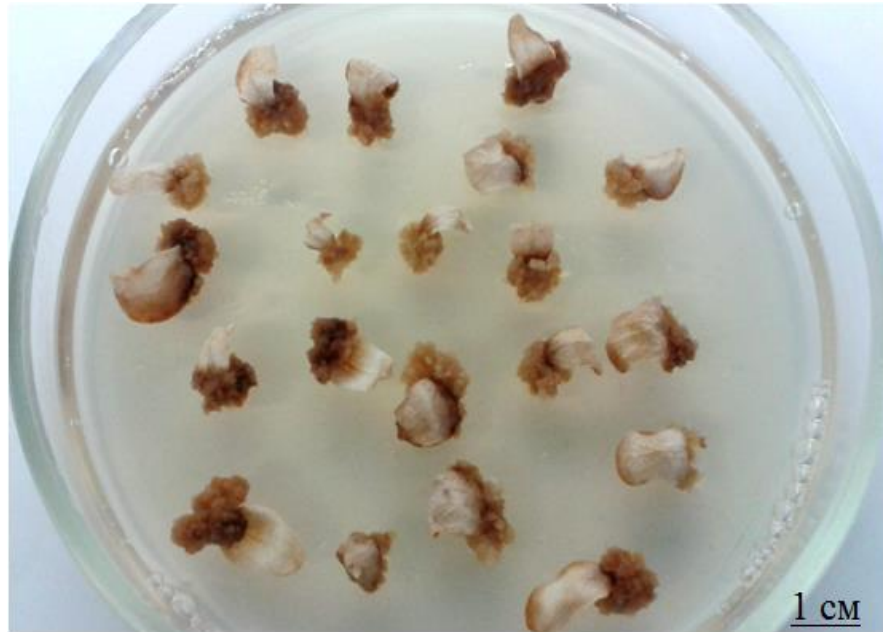


Рис. 5.6. Загальний вигляд калюсу, що втратив здатність до регенерації пагонів на селективному середовищі, що містило 5 мг/л гігromіцину.

Нами було з'ясовано, що найбільша частота регенерації пагонів з сім'ядольних листків та частота формування зеленого калюсу на експлантах гіпокотилів відбувалась за умов проведення дослідження під №4 для обох типів експлантів (Рис. 5.7). Найімовірніше, що саме при додержанні цих умов проведення трансформації, значно збільшується можливість проникнення агробактерії в клітину, а з цим і переносу чужорідної ДНК з послідуочим вбудуванням її в геном рижю.

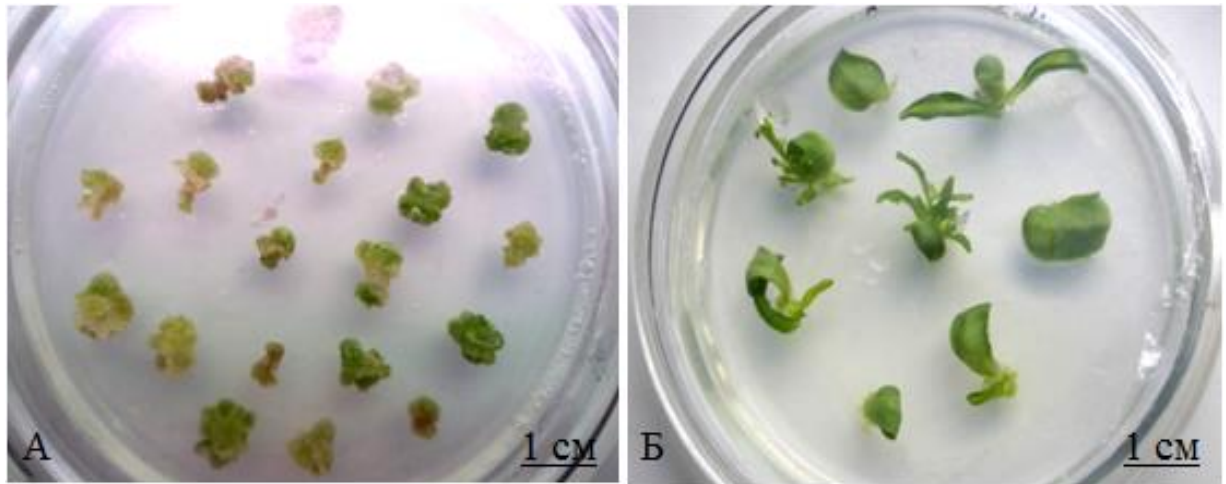


Рис. 5.7. Морфогенетична відповідь досліджуваних експлантів на 28 добу після проведення генетичної трансформації (варіант досліді №4): А – сегменти гіпокотилів; Б – сім'ядольні листки.

Не зважаючи на відносно велику кількість калюсів, отриманих на першому етапі селекції, на другому етапі їхня кількість значно зменшувалася, і лише на деяких експлантах формувалися бруньки, які розвивалися в подальшому в пагони.

Найменша морфогенетична відповідь або взагалі її відсутність, зокрема, у випадку сім'ядольних листків, спостерігалась у варіантах №1, 3, 7 - 9, теж саме спостерігали і для сегментів гіпокотилів – (Рис. 5.8).

Частоту трансформації визначали як процентне співвідношення кількості експлантів з регенерованими на селективному середовищі пагонами – для сім'ядольних листків та у випадку гіпокотилів – зелених калюсів, до загальної кількості взятих в досліді експлантів.

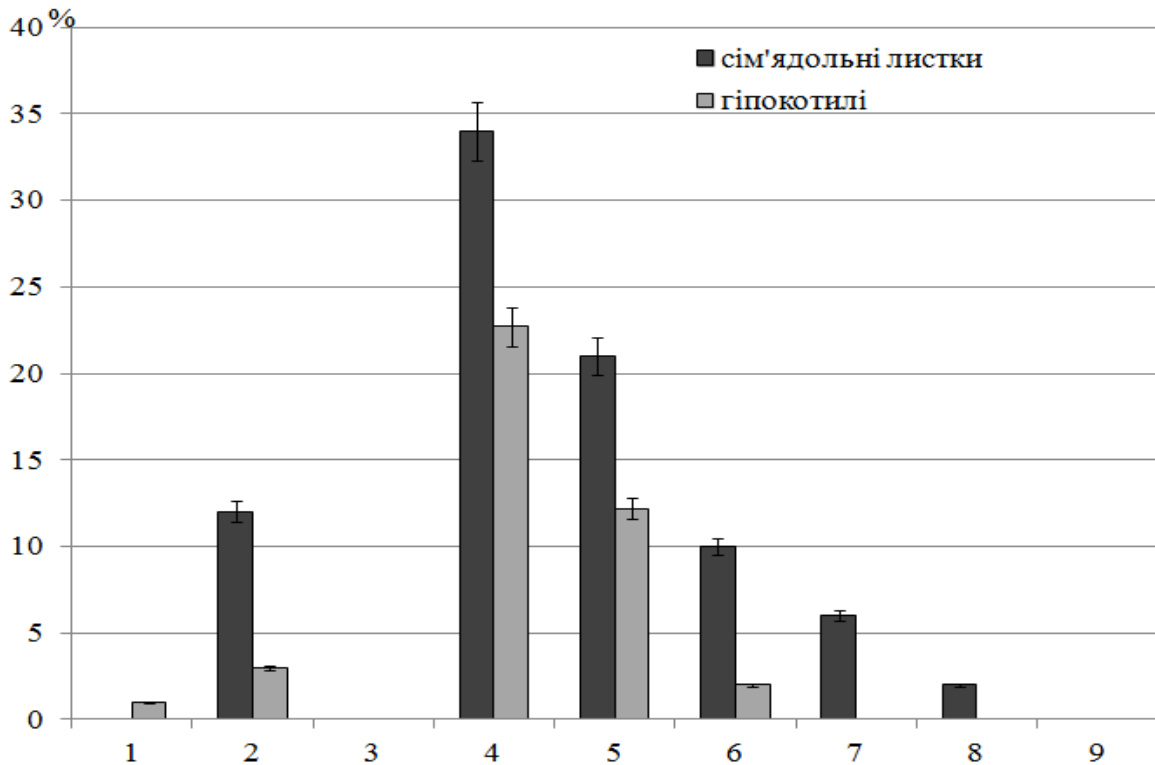


Рис. 5.8. Залежність морфогенетичного потенціалу сім'ядольних листків та гіпокотилів від умов трансформації на селективному середовищі через 30 діб культивування: по вертикалі – частота регенерації пагонів, % (з сім'ядольних листків), частота формування зеленого калюсу, % (на сегментах гіпокотилів); по горизонталі – № варіанту дослідження.

Виходячи з того, що в нашій роботі дотримання умов проведення *Agrobacterium* -опосередкованої трансформації за варіанту №4 дозволило отримати більш ефективні результати в порівнянні з іншими варіантами, аналіз експресії репортерного гена *GUS* після трансформації експлантів проводили через три доби після перенесення їх на селективне середовище з гігromіцином. Результати цього тесту представлено на рис. 5.9.

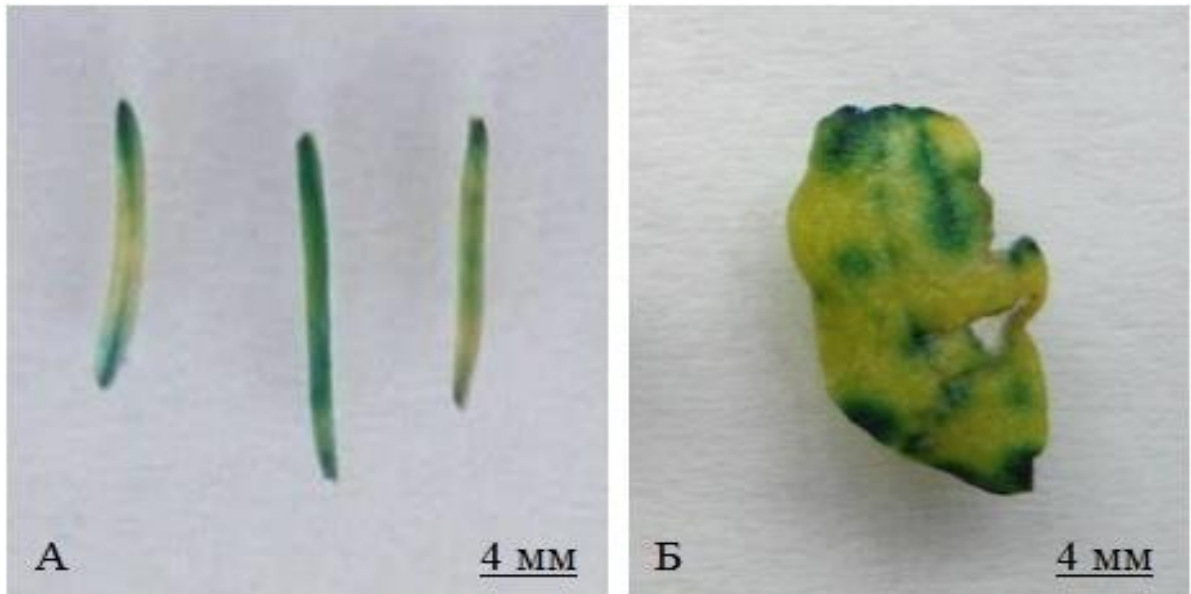


Рис. 5.9. Результати гістохімічного аналізу активності репортерного гена *GUS* в клітинах експлантів гіпокотилів (А) та сім'ядольних листків рижію (Б) після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації конструкцією pGH217.

Через 2-3 місяці на селективному середовищі, що містило 5 мг/л гігromіцину, відбирали перші трансгенні лінії *C. sativa*, які також аналізували за допомогою гістохімічного аналізу. За нашими даними частота транз'єнтної трансформації рижію становила 1,6% (Табл. 5.2.).

Нами було встановлено також, що більш тривале культивування калюсу на селективному середовищі в присутності гігromіцину послідовно знижувало його регенераційний потенціал, що відображалось на кінцевому результаті і на кількості отриманих регенерантів. Більше того, тривале (більше 4 місяців) культивування в умовах *in vitro* пагонів, що були регенеровані на гігromіцині, також призводило до значного інгібування їх здатності до коренеутворення.

Таблиця 5.2.

**Частота *Agrobacterium*-опосередкованої (транз'єнтної)
трансформації рижю**

Варіант	Кількість інокульованих експлантів, шт	Кількість регенованих пагонів, шт	Кількість <i>GUS</i> + рослин	Частота трансформації, %
1	139	39	2	1,4
2	143	50	3	2,1
3	150	46	2	1,3
Всього	432	135	7	1,6

Примітка: *GUS* + — *GUS* позитивні лінії

При проведенні гістохімічного аналізу отриманого калюсу та листків регенованих пагонів, як видно з рис. 5.10, спостерігали характерне синє забарвлення, що свідчить про експресію гена *GUS* та підтверджує трансгенну природу отриманих ліній.

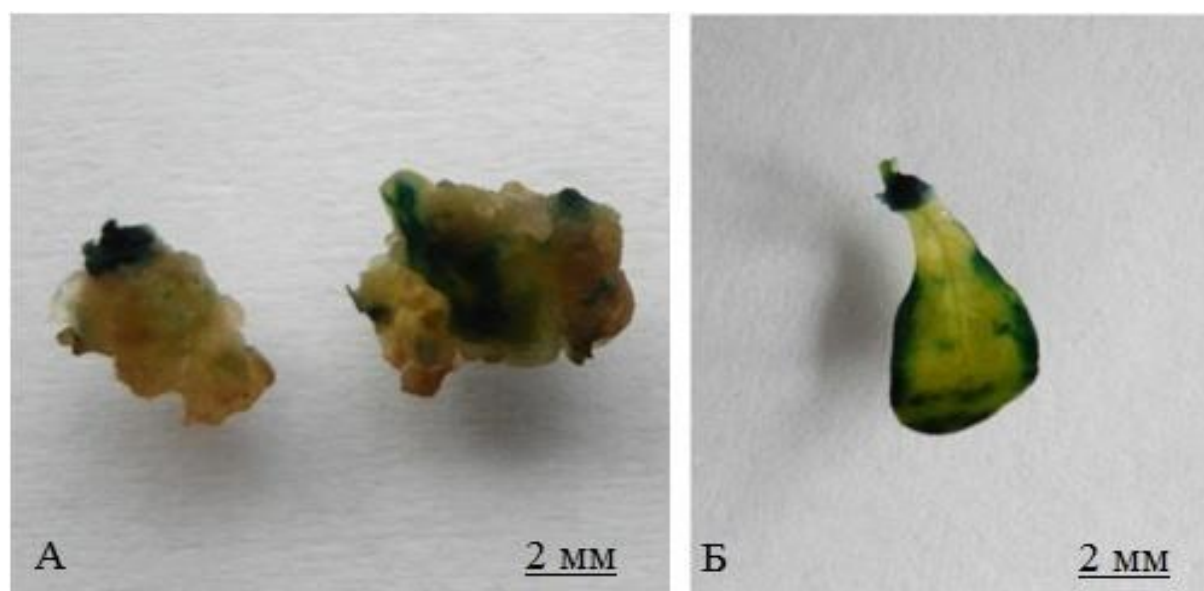


Рис. 5.10. Результати гістохімічного аналізу активності репортерного гена *GUS* в сформованому через три тижні на селективному середовищі калюсі (А) та листках регенованих пагонів *C. sativa* (Б).

Таким чином, на основі отриманих нами даних було встановлено, що найбільш оптимальна тривалість інокуляції як сім'ядольних листків, так і сегментів гіпокотилів агробактерією є 15 хв, оптимальний час культивування експлантів з *A. tumefaciens* складає дві доби. Підібрані умови проведення *Agrobacterium*–опосередкованої трансформації *S. sativa*, можуть слугувати основою для подальшого біотехнологічного вдосконалення цього виду цільовими генами.

Так, за даними дослідження Кувшинова [20] ефективність трансформації ріжю становила 3 %, використовуючи три різні штами агробактерії з різними конструкціями, які містили репортерний ген *GUS*. При цьому було відмічено, що ефективною концентрацією гігromіцину, як селективного агенту було обрано 15 мг/л.

Слід зазначити, що на сьогоднішній день всі спроби та, відповідно, повідомлення про проведення генетичної трансформації ріжю (*Camelina sativa*) спрямовані на оптимізацію жирнокислотного складу для паливної та харчової промисловості [102, 15, 250-254, 26, 27, 256, 257, 29, 259].

5.3. Трансформація *S. sativa* методом *in planta*

На сьогоднішній день в генетичній інженерії рослин значну увагу приділяють методам трансформації, що дозволяють запобігти довготривалим маніпуляціям, пов'язаними з отриманням культури тканин. Останні досягнення у галузі генетичної трансформації показали, що можливе створення трансгенних рослин без проведення будь-яких процедур *in vitro*. Раніше було запропоновано новий метод трансформації, названий трансформація *in planta* [225], розроблений для *Arabidopsis thaliana*, який успішно використовується для трансформації інших представників з родини *Brassicaceae* таких як редька, ріпак, індійська гірчиця [230,231, 233; 298, 299]. Однією із проблем генетичної

трансформації *in vitro*, яка пов'язана з регенерацією рослин, є химерність отриманих трансформантів і соматональна варіабельність. Метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* дозволяє подолати наведені вище труднощі під час отримання трансгенних ліній шляхом трансформації експлантів певних видів рослин [229]. Протягом останніх років активно ведуться розробки в даному напрямку, які представляють перспективну задачу за умов, що вдасться подолати певні труднощі. Наприклад, трансформація методом інокуляції суцвіть – найбільш розроблений та відтворюваний метод трансформації *in planta* – ефективний тільки по відношенню деяких видів, в основному представників родини хрестоцвітих [300, 301], що пов'язано, вірогідно, з особливостями будови їх генеративних органів. Крім стадії розвитку рослини і будови квітки, потрібно враховувати не менш важливі фактори, такі як тривалість контакту рослинних тканин з агробактерією, використання індукторів генів вірулентності, генотип рослин, тощо [302]. Для підвищення ефективності трансформації додатково використовують також фізичні методи такі як, вакуумна інфільтрація рослин, оскільки під дією тиску повітря бактерія проникає по міжклітинникам до більш глибоких шарів [19, 232]. Слід зазначити, що температура навколишнього середовища також може мати вирішальне значення на перебіг процесу трансформації і суттєво впливати на його ефективність [303]. Отже, на даний час існує багато модифікацій методу *in planta*, однак для кожного рослинного об'єкту необхідно адаптувати цей метод та визначити відповідні умови для успішної трансформації. Тому в нашій роботі було протестовано вплив температури для оптимізації методу генетичної трансформації *in planta* *C. sativa* (основні дослідження були проведені за використання сорту Перемога).

Зважаючи на те, що є поодинокі повідомлення по *in planta* трансформація рижю посівного, зокрема Lu та Kang [19], а нещодавно Liu з колегами [22] у своїх роботах повідомили про успішну

трансформацію рижію посівного використовуючи цей метод, нами було досліджено вплив температури на процес трансформації.

В багатьох роботах було продемонстровано, що температура, при котрій проводять інокуляцію агробактеріями, зазвичай коливається від 22°C до 26°C [225, 233, 236, 304, 305]. Нами *Agrobacterium*-опосередкована інокуляція проводилась в умовах вегетаційного періоду на дослідних ділянках у другій половині дня за двох температурних режимів: 20 – 22°C та 25 – 27°C. Загалом бактеріальною суспензією було оброблено 30 рослин на ранній стадії цвітіння (Рис. 5.11). Оскільки, як свідчать дані авторів [228, 306, 307], інокуляція на більш пізніх стадіях розвитку, а також повністю розвинутих квіток призводила до зниження ефективності трансформації, або взагалі відсутністю трансформантів.



Рис. 5.11. Загальний вигляд рослин рижію на стадії цвітіння (А) та процес трансформації методом *in planta* (Б).

Трансформовані рослини знаходились на ділянках до повного дозрівання насіння. У результаті проведених досліджень було отримано насіння, яке за морфологічними показниками не відрізнялося від контролю (рис. 5.12).

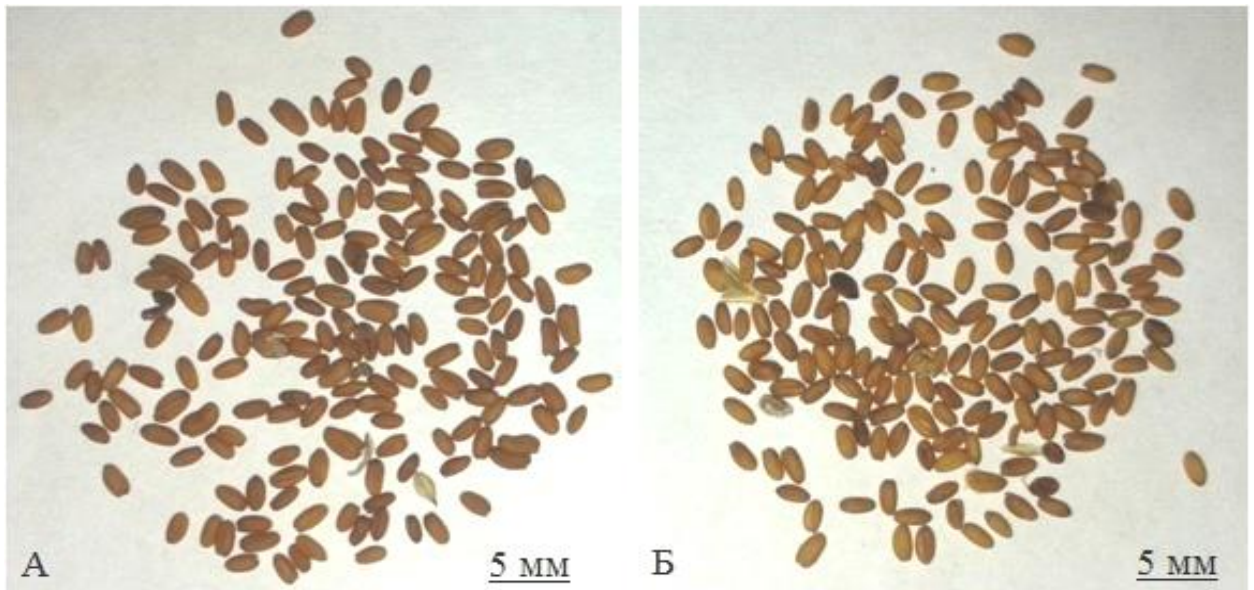


Рис. 5.12. Загальний вигляд насіння контрольної рослини *C. sativa* (А) та насіння, отриманого після трансформації *C. sativa* методом *in planta* (Б).

Так, після трансформації рижюю методом *in planta* було отримано близько 4,5 г насіння. Для відбору потенційно трансгенного насіння (T_1), його пророщували на фільтрувальному папері з гігроміцином у концентрації 20 мг/л, оскільки дана концентрація при вивченні впливу антибіотику на проростання насіння та ріст і розвиток проростків рижюю виявилась найбільш токсичною для контрольної лінії. Протягом 3–5 діб насіння проростало достатньо рівномірно, але вже через тиждень селекції спостерігали, що нетрансформовані проростки були більш пригнічені у рості, листя скручувалося в той час, як трансформовані проростки мали довші гіпокотилі (Рис. 5. 13), причому на контрольному розчині без гігроміцину (Рис. 5.14) спостерігали дружнє проростання всіх насаджених насінин.



Рис. 5.13. Результати проростання насіння T_0 трансформованої рослини рижію у присутності з 20 мг/л гігromіцину.

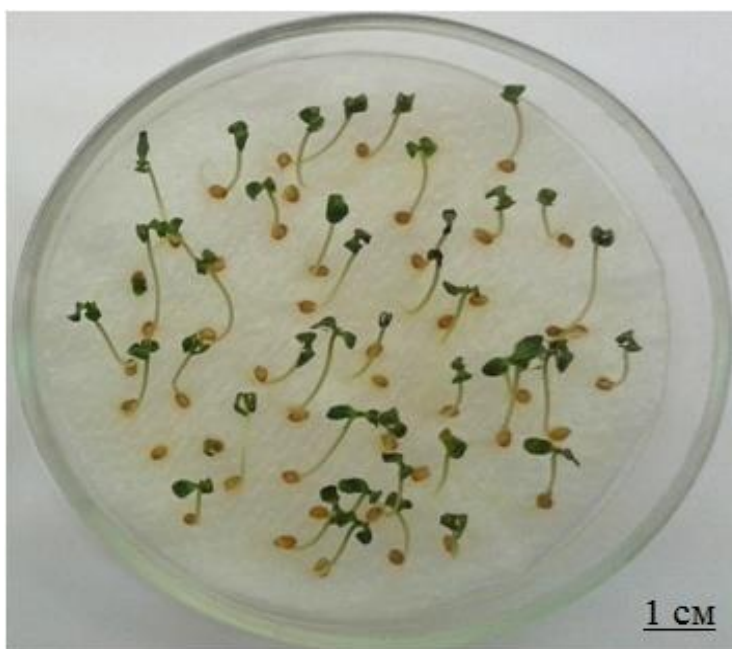


Рис. 5.14. Характер проростання насіння T_0 трансформованої рослини рижію без гігromіцину (контроль).

Слід відмітити, що кількість гігроміцин-стійких проростків на середовищі з гігроміцином за температури проведення трансформації *in planta* 25 – 27° С була більшою, ніж за температури 20 – 22° С. Різні дослідники вказують на дещо відмінні дані, щодо оптимальних значень температури, які обмежуються чутливістю до температури білків, що беруть участь в перенесенні Т-ДНК. Так, згідно досліджень Dillen та співавт. [308] найкращі результати отримали за 22°С, в той час в роботі Salas [309] найбільшу кількість трансформантів отримали за температури 25°С, попри те, що оптимальною температурою для перенесення Т-ДНК було 19°С. Для більшості однодольних рослин температура культивування з агробактеріями становить 24 - 28°С [302]. Трансформація проростків тютюну суспензією агробактерій повністю блокується при температурі 31°С [229]. А в більш ранніх роботах [310] повідомлялось, що при інокуляції арабідопсису агробактеріями при 16 °С та 22 °С в двох незалежних експериментах були отримані різні результати: в одному при збільшенні температури ефективність трансформації зростала, в іншому – залишалась на попередньому рівні. В експериментах по трансформації кукурудзи *in planta* обробка маточкових ниток агробактеріями за температури повітря 22 – 25 °С виявилась більш ефективною, ніж за 18 – 20 °С [311].

Для отримання насінневого покоління T_1 та подальшого молекулярно-генетичного аналізу рослин, частину насіння висівали на дослідній ділянці (Рис. 5.15). Слід зазначити, що протягом вегетаційного періоду не спостерігали ніяких особливих відмінностей у морфології та розвитку рослини T_0 покоління.

Частоту трансформації рижію визначали як співвідношення кількості гігроміцин-стійких проростків до загальної кількості насіння, що пророщували у присутності селективного агента. Для сорту Перемога вона становила 2,2 %.



Рис. 5.15. Загальний вигляд рослин ріжю посівного T₀ покоління

Раніше, Lu & Kang [19] повідомили про успішну трансформацію ріжю посівного, використовуючи метод *in planta*, який включав *Agrobacterium*-опосередковану інокуляцію на початку цвітіння рослин разом з процедурою вакуумної інфільтрації. Для цього було використано ген зеленого флюоресцентного білка як репортерний ген. Цей маркер було використано для відбору трансгенного насіння *Arabidopsis thaliana* [248], що дозволило зручно детектувати трансгенне насіння з великої кількості нетрансгенного [249]. Так, використовуючи даний метод трансформації *in planta*, було одержано понад 1 % трансгенного насіння. При генетичному аналізі було показано, що більша частина трансгенних рослин містила одну копію репортерного гена. А нещодавно Liu et al. [22] повідомили про успішну трансформацію *C. sativa* методом *in planta* без застосування вакуумної інфільтрації. Дослідження проводили на чотирьох сортах ріжю (Ames 26665, Calena A3U7761, Ames 1043 і Celine), використовуючи три різні штами *A. tumefaciens* (GV3101, EHA105, At503) з конструкцією, до складу якої входив селективний маркерний ген *ALS* (ацетолацетат-синтаза), що забезпечує стійкість до гербіциду хлорсульфурону. Ефективною селективною

концентрацією даного гербіциду для відбору трансгенного насіння було обрано 0,025 мг/л. Отримані нами дані не співпадають з результатами даної роботи, оскільки частота трансформації становила 2,2 %. При цьому було відмічено, що додавання ацетосерингону в середовище для інокуляції не впливало на ефективність трансформації. Для багатьох культур, наприклад соняшнику, кукурудзи [312] описано успішні дослідження по трансформації без додаткових обробок, тобто трансформація базувалась на простому зануренні квіток (до розкриття) в суспензію бактерій. Хоча при порівнянні обох методів для арабідопсису отримано рівнозначні результати [236].

5.4. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних рослин ріжю

Для підтвердження трансгенної природи отриманих нами рослин було проведено молекулярно-генетичний аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР-аналіз проводили з використанням відповідних праймерів до гена *GUS* (Рис. 5.4.).

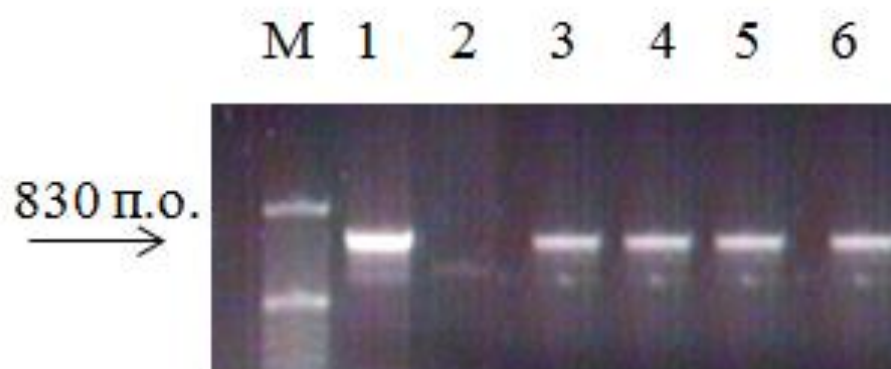


Рис. 5. 4. Результати ПЛР-аналізу рослин *C. sativa*: М – маркер молекулярних мас (п.о.), 1 – плазміда pGH217, 2 – нетрансформована рослина *C. sativa* (контроль), 3 – 6 – трансгенні рослини ріжю T₁.

При ампліфікації ДНК з використанням специфічних праймерів до гена *GUS* було отримано фрагменти, які відповідали розрахованій довжині фрагмента цього гена. Розмір фрагмента становив 830 п.о., і цей фрагмент був виявлений у зразках, що відповідає позитивному контролю (плазміда рGH217, яку було використано для трансформації) та в трансгенних лініях. При аналізі рослинної ДНК із нетрансгенних контрольних рослин рижію, ампліфікацію цього гена не спостерігали.

При порівнянні ефективності двох методів трансформації (*Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta*), слід зазначити, що трансформація методом *in planta* є більш зручною, оскільки вдається запобігти стадії регенерації рослин, яка потребує спеціального обладнання та дорогих реактивів.

Отже, результати молекулярно-генетичного аналізу ліній рижію посівного підтверджують перенесення та інтеграцію чужорідного гена. За отриманими даними можна відмітити, що частота трансформації у порівнянні з іншими роботами для рижію посівного була у 2,5 рази вищою [19, 22]. Для порівняння ефективність трансформації для інших видів родини *Brassicaceae* варіювала від 0,01 % для ріпи [230] до 3 % для *Arabidopsis* [225]. Більше того, застосування методу, який включав *Agrobacterium*-опосередковану інокуляцію на початку цвітіння рослин без застосування процедури вакуумної інфільтрації [22] виявився більш простим та швидким. Частота трансформації становила 0,8 %.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами було підтверджено, що найбільш ефективним методом перенесення чужорідних генів в геном рослин рижію посівного для подальшого біотехнологічного вдосконалення різних генотипів цього виду є метод генетичної трансформації методом *in planta*, оскільки він є більш зручним, швидким, а також за його використання спостерігається збільшення показника частоти трансформації *C. sativa*.

Отримані результати досліджень представлені в наступних публікаціях: [313, 314].

РОЗДІЛ 6

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

На сьогоднішній день надзвичайно актуальним у світі є пошук альтернативних джерел для отримання біодизелю. Одним із варіантів збагачення ресурсної бази для отримання цього виду палива є відновлення розширеного культивування рижію посівного (*Camelina sativa*) – традиційної для України, але малопоширеної нині капустиної культури поліфункціонального використання [7-9]. Створення і використання нових високопродуктивних генотипів рижію посівного української селекції та збільшення його посівів дозволить поліпшити соціально-економічну ситуацію в країні – зменшення енергетичної залежності за рахунок альтернативного відновлювального джерела рослинної сировини. Зважаючи на ці обставини, створення генетично покращених сортів рижію посівного (*C. sativa* (L.) Crantz), зокрема, підвищення його врожайності та збільшення вмісту олії в насінні для виробництва біодизелю в Україні є одним з важливих завдань.

В багатьох країнах, в тому числі і в Україні, останніми роками інтенсивно ведеться селекційна робота, спрямована на поліпшення агрономічних якостей хрестоцвітих культур. Щодо рижію, існує лише дві роботи по введенню та регенерації в культуру *in vitro* [17, 18] та соматичній гібридизації [242]. По генетичній трансформації рижію є лише кілька робіт та два патенти [19-23].

Отже, у результаті проведеного дослідження проаналізовано високопродуктивні генотипи рижію української селекції, зокрема, встановлено їх продуктивний потенціал, а також розроблено методи введення в культуру *in vitro* та регенерації рослин восьми сортозразків та чотирьох сортів *C. sativa* та проведено генетичну трансформацію рижію посівного за допомогою *A. tumefaciens* з метою порівняння ефективності

двох методів (*Agrobacterium*-опосередкованої трансформації за умов *in vitro* та методом *in planta*).

Для досягнення цієї мети дослідження були розпочаті з аналізу морфофізіологічних та біохімічних характеристик *C. sativa* восьми сортозразків та чотирьох сортів. Було встановлено, що для створення насінних посівів з високою продуктивністю найбільш сприятливий період сівби - від III декади квітня до III декади травня. При цьому тривалість вегетаційного періоду *C. sativa* до досягання насіння залежно від досліджуваної форми чи сорту становила від 65 до 90 діб. Нові сорти та сортозразки рижію характеризуються високим продукційним потенціалом, вирізняються за морфологічними особливостями та урожайними характеристиками, що за рядом з цих показників перевищували, або були на рівні морфологічних характеристик деяких сортозразків ярого рижію різного регіонального походження, що були проаналізовані раніше [279-282].

За основними морфометричними параметрами рослин встановлено суттєву перевагу сортів Перемога та Євро-12. За урожайністю нові сорти та сортозразки рижію формували 3-4 т/га насіння із вмістом олії 36-43% при її виході 1000-1300 кг/га, що є достатньо високими показниками для отримання біодизелю. Одночасно за іншими показниками урожайність досліджуваних генотипів ярого рижію сягала 25 т/га біомаси, 5-8 т/га сухих речовин, 0,8-1,0 т/га протеїну, що вказує на перспективність використання цієї культури на кормові цілі як високобілкової та високовітамінної сировини. За вмістом ліпідів у насінні, так і за виходом енергії з олії переважали сорти Перемога та Євро-12. При дослідженні біохімічного складу було виявлено, що для всіх сортозразків та сортів характерним є високий вміст ліноленової, лінолевої, олеїнової, гондоїнової та пальмітинової кислот, а також властивої всім представникам родини *Brassicaceae* ерукової кислоти. Так, сортозразки ФЕОРЖЯФЧП, ФЕОРЖЯФ-5 та Євро-12 характеризувались високим

вмістом ерукової кислоти, яка є цінною сировиною для виробництва біодизельного палива.

Другий етап роботи полягав у розробці методу введення в культуру *in vitro* та регенерації рижію посівного, оскільки це є важливою передумовою для подальшого успішного проведення експериментів по його генетичній трансформації. Виявлено, що 5-7 хв стерилізація насіння в 1,5% гіпохлориті натрію є достатньою для ефективної стерилізації матеріалу, при якій зберігається повна схожість насіння. При цьому проростки мали нормальну морфологію і на сьому добу культивування утворювали добре розвинені корені. Нами було відмічено, що утворення калюсу з сім'ядолей відбувалося значно швидше, ніж з гіпокотильних експлантів. Колір калюсу варіював від світло-жовтого до зеленого, а сама структура калюсу була рихлою.

Щодо морфо-генетичного потенціалу різних типів експлантів, то найкращою здатністю до регенерації характеризувались експланти п'яти- та семиденних проростків, тоді, як у дев'ятиденних ефективність пагоноутворення значно зменшувалась. Відносно типу екпланту, то в однаковій мірі для регенерації пагонів можна використовувати як сім'ядольні листки, так і сегменти гіпокотилів. Так, досліджуючи вплив фітогормонів на індукцію пагоноутворення та укорінення, було виявлено, що процес формування пагонів на середовищі МС для регенерації пагонів, яке містило БАП в поєднанні з НОК, відбувався набагато інтенсивніше в порівнянні з середовищем, що містило лише БАП. При цьому, найбільша кількість пагонів на один експлант для сім'ядольних листків становила 2-3 шт., а для гіпокотилів – 1-2 шт. Зокрема, за використання 1-2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК частота регенерації пагонів становила майже 70 % у експлантів сім'ядольних листків та досягала 45 % у експлантів гіпокотилів. При дослідженні впливу сахарози на процес формування пагонів у поєднанні з усіма варіантами концентрацій фітогормонів було встановлено, що за використання 20 г/л сахарози

процес формування калюсу відбувався інтенсивніше, ніж за використання 10 г/л сахарози, однак істотного впливу на процес пагоноутворення не спостерігали. В той час, як іншими авторами повідомлялося, що відсоток пагоноутворення підвищувався при збільшенні концентрації сахарози [131]. Щодо вивчення процесу ризогенезу було виявлено, що ініціація утворення коренів відбувалась на середовищі МС з додаванням 1 мг/л НОК, оскільки при додаванні цього фітогормону в концентраціях 0,1 мг/л та 0,5 мг/л формування коренів взагалі було відсутнє.

Також, на основі отриманих результатів, було проведено аналіз морфо-генетичного потенціалу всіх досліджуваних сортів та сортозразків рижю. Так, найбільшу здатність до регенерації пагонів серед чотирьох сортів мали сорти Перемога (3,2 %) та Міраж (3,03 %). Найменшу кількість регенованих рослин було отримано у сорту Клондайк (2%). Серед сортозразків найменшу кількість регенованих пагонів продукували ФЕОРЖЯФ-3 (1,1%) та ФЕОРЖЧП(1%), тоді як ФЕОРЖЯФ-5 характеризувався найбільшою здатністю до регенерації рослин серед усіх сортозразків (2,9 %).

Отримані нами результати також підтверджують той факт, що здатність до регенерації пагонів в культурі *in vitro* залежить від певного генотипу рослин. Різноманітні морфогенетичні реакції в культурі *in vitro* також були відмічені серед сортів багатьох видів [147, 292, 293]. Слід відмітити той факт, що кількість опублікованих робіт щодо маніпуляцій з рижієм посівним є досить не великою, тому він залишається цікавим об'єктом для біотехнологічного вдосконалення.

Тому наступним етапом роботи було пошук найбільш оптимального методу перенесення чужорідних генів в геном *C. sativa*. Для цього було здійснено порівняння двох методів генетичної трансформації рижю посівного за допомогою *A. tumefaciens*: трансформація різних типів експлантів в умовах *in vitro* та трансформація методом *in planta*.

Оскільки конструкція для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації містила селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину, спочатку було протестовано вплив різних концентрацій цього селективного агента на життєздатність експлантів рижію для встановлення селективної концентрації при відборі трансгенних ліній. У результаті проведених досліджень було встановлено, що ефективною концентрацією (ЛД₅₀) гігromіцину є 5 мг/л. Додатково нами було проведено серію дослідів для визначення впливу антибіотику на проростання насіння, а також ріст і розвиток проростків рижію. Показано, що у присутності 5 та 10 мг/л гігromіцину спостерігається формування дещо потовщених коренів у проростків, розвиток яких сповільнюється. Нами було встановлено, що критичною (селективною) концентрацією для відбору трансгенних ліній рижію є 20 мг/л гігromіцину, яку в подальшому було використано при відборі з насіння трансгенних рослин після проведення трансформації *C. sativa* методом *in planta*.

Для визначення умов, що дають можливість ефективно проводити трансформацію рижію нами було проведено серію дослідів, в яких було вивчено вплив тривалості інокуляції та ко-культивування з агробактерією, оскільки вони є одними із основних факторів, що визначають успішне перенесення та інтеграцію екзогенної ДНК у геном рослини. Було встановлено, що найбільш оптимальна тривалість інокуляції як сім'ядольних листків, так і сегментів гіпокотилів агробактерією є 15 хв, тоді як збільшення тривалості призводило до негативного впливу на рослинні тканини.

Більше того, тривале культивування в умовах *in vitro* пагонів, що були регенеровані на гігromіцині, також призводило до значної здатності до коренеутворення пагонів.

У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на селективному середовищі у присутності гігromіцину було регенеровано

лінії, трансгенну природу яких встановлено за допомогою гістохімічного аналізу. Частота транз'єнтної трансформації експлантів *C. sativa* становила 1,6 %.

Наступним етапом роботи було проведення трансформації *C. sativa* методом *in planta*. У результаті трансформації методом *in planta* *C. sativa* було отримано насіння, яке за морфологічними показниками не відрізнялося від контролю. При проведенні молекулярно-генетичного аналізу з використанням специфічних праймерів до гена *GUS* було отримано фрагменти, які відповідали розрахованій довжині фрагмента цього гена. За проведеними розрахунками частота стабільної трансформації *C. sativa* складала близько 2,2 %. При порівнянні ефективності двох методів (*Agrobacterium*-опосередкованої та *in planta*) трансформації, трансформація методом *in planta* є більш зручним методом, оскільки вдається запобігти стадії регенерації рослин, яка потребує спеціального обладнання та дорогих реактивів. Слід відмітити, що частота трансформації у порівнянні з іншими роботами для рижію посівного була у 2,5 рази вищою [19, 22].

Отже, у результаті проведеної роботи нами відібрано високопродуктивні генотипи *C. sativa* української селекції, проаналізовано їх фізіологічні та біохімічні характеристики. Серед восьми сортозразків та чотирьох сортів виявлено високопродуктивні генотипи, два сорти та один сортозразок, які за основними морфометричними параметрами та біохімічним складом мали суттєву перевагу. Підібрано умови для введення в культуру *in vitro* та регенерації рослин *C. sativa*. Зокрема, визначено вік та тип експланту для ефективної регенерації з них рослин. Досліджено вплив регуляторів росту на індукцію пагоноутворення та укорінення рижію. Проведено аналіз регенераційної здатності всіх сортозразків та сортів рижію. Здійснено генетичну трансформацію за допомогою двох методів та продемонстровано, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in*

planta є більш ефективним методом перенесення чужорідних генів в геном рижію. Трансгенну природу отриманих рослин було підтверджено за допомогою молекулярно-генетичного аналізу. Отримані результати можуть в подальшому слугувати основою для подальшого біотехнологічного вдосконалення найбільш продуктивних сортів чи сортозразків *C. sativa*.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проаналізовано морфофізіологічні та біохімічні характеристики ряду ярих сортів і сортозразків рижію посівного (*Camelina sativa*) української селекції, розроблено метод введення їх в культуру *in vitro*, вивчено вплив фітогормонів на індукцію пагоноутворення та укорінення рижію з метою оптимізації умов культивування для його подальшого біотехнологічного вдосконалення, а також проведено порівняння частоти генетичної трансформації *C. sativa*, опосередкованої *Agrobacterium tumefaciens*, в умовах *in vitro* та *in planta*.

1. За результатами порівняльного аналізу морфо-фізіологічних та біохімічних характеристик 12 ярих сортів і сортозразків рижію посівного встановлено, що всі вони характеризуються високим продукційним потенціалом (3-4 т/га). Визначено, що тривалість вегетаційного періоду до досягання насіння у проаналізованих зразків *C. sativa* становить від 65 до 90 діб.

2. Встановлено, що насіння досліджуваних сортів та сортозразків рижію характеризується високим вмістом ліпідів (36–43 %) та великим їх виходом з урожаєм (1000–1300 кг/га). За вмістом ліпідів та за виходом енергії з олії перевагу порівняно з іншими мали сорти Перемога та Євро-12 і сортозразок ФЕОРЖЯФ-4.

3. Встановлено, що для використання олії в технічних та енергетичних цілях більш цінними є сорти Перемога та Євро-12 і сортозразки ФЕОРЖЯФ-5 і ФЕОРЖЯФЧП, які характеризуються високим вмістом ненасичених жирних кислот, у тому числі ерукової кислоти, яка є важливою жирною кислотою для отримання якісного біодизелю.

4. Підібрано умови введення в культуру *in vitro* всіх досліджуваних сортів і сортозразків *C. sativa*. Встановлено, що для індукції пагонів рижію посівного найкраще використовувати експланти 5- або 7-денних

проростків, які характеризуються найбільшою здатністю до регенерації рослин. Для ефективної регенерації рослин можна використовувати як сім'ядольні листки, так і експланти гіпокотилів цих проростків.

5. У результаті дослідження впливу фітогормонів на регенерацію пагонів рижю та їх укорінення було встановлено, що живильне середовище МС, яке містить комбінацію фітогормонів БАП (1-2 мг/л) та НОК (0,1 мг/л), є найбільш ефективним для регенерації пагонів, тоді як середовище, що містить 1 мг/л НОК – для їх укорінення.

6. Встановлено, що найбільшою здатністю до регенерації рослин характеризуються сорти Перемога і Міраж та сортозразок ФЕОРЖЯФ-5 (ефективність регенерації – близько 3 пагонів на експлант).

7. За результатами проведеної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів рижю з використанням репортерного гена *GUS* та гістохімічного аналізу трансгенних ліній було встановлено, що частота транз'єнтної трансформації *C. sativa* становить 1,6%.

8. За використання методу генетичної трансформації *in planta* та проведеного молекулярно-генетичного аналізу відселектованих трансгенних ліній *C. sativa* було встановлено, що цей метод перенесення чужорідних генів в геном рослин рижю посівного є більш ефективним, оскільки частота стабільної трансформації за умов його використання становить 2,2%.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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.
2. Zubr J. Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Industr. Crop Prod.* – 1997. – Vol. 6. – P.113–119.
3. Moser B.R., Vaughn S.F. Evaluation of alkyl esters from *Camelina sativa* oil as biodiesel and as blend components in ultra low-sulfur diesel fuel. *Bioresource Technol.* – 2010. – Vol. 101. – P. 646–653.
4. Mulligan G.A. Weedy introduced mustards (*Brassicaceae*) of Canada// *Can. Field Nat.* – 2002.– Vol. 116. – P. 623–631.
5. Moore M. *Camelin sativa* comes in from the cold. *Furrow.* – 1994. – Vol. 99. – P. 20 – 21.
6. Рожкован В., Комаров І. Рижій – альтернативна олійна культура та перспективи його використання. Інформаційний щомісячник «Пропозиція». – 2009. – Режим доступу: <http://www.propozitsiya.com>.
7. Блюм Я.Б., Григорюк І.П., Дмитрук К.В., Дубровін А.В., Ємець А.І. [таін.]. Система використання біоресурсів у новітніх біотехнологіях отримання альтернативних палив. К.: Аграр Медіа Груп. – 2014. – С. 359.
8. Мельничук М.Д., Демидась Г.І., Квітко Г.П., Гетман Н.Я. Рижій посівний як альтернатива ріпаку ярому для виробництва біодизеля. *Наук. доп. Нац. у-ту біоресурсів і природокористування України.* – 2012. – Т. 31, № 2. – Режим доступу.: http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012_2/12dgi.pdf.
9. Рахметов Д.Б., Самойленко И. Рыжей – альтернативная масличная культура. *Зерно.* 2012. – С. 50–55.
10. Russo R., Reggiani R. Antinutritive compounds in twelve *Camelina sativa* genotypes. *Amer. J. Plant Sci.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1408–1412.

11. Pilgeram A.L., Sands C., Boss D., Dale N., Wichman D., Lamb P., Lu C. [et al.]. *Camelina sativa*, a Montana Omega-3 and fuel crop. Eds J. Janick, A. Whipkey. Issue in new crops and new uses. VA, USA: ASHA Press, Alexandria. – 2007. – P. 129–131.
12. Bansal S., Durrett T.P. *Camelina sativa*: an ideal platform for the metabolic engineering and field production of industrial lipids. *Biochimie*. – 2015. – P. 1–8.
13. Iskandarov U., Kim H. J., Cahoon E. B. *Camelina*: an emerging oilseed pfor advanced biofuels and bio-based materials. *Plants and Bioenergy, Adv. in Plant Biol.* – 2014. – Vol. 4, № 8. – P. 131 – 140.
14. Lu C., Napier J.A., Clemente T.E., Cahoon E.B. New frontiers in oilseed biotechnology: meeting the growing global demand for vegetable oils for food, feed, biofuel, and industrial uses. *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 252–259.
15. Nguyen H., Park H., Koster K.L. et al. Redirection of metabolic flux for high levels of omega-7 monounsaturated fatty acid accumulation in *Camelina* seeds. *Plant Biotechnol. J.* – 2015. – Vol. 13. – P. 38–50.
16. Vollmann J., Eynck C. *Camelina* as a sustainable oilseed crop: Contributions of plant breeding and genetic engineering. *Biotechnol. J.* – 2015. – Vol. 10. – P. 525–535.
- 17 Tattersall A., Millam S. Establishment and *in vitro* regeneration studies of the potential oil crop species *Camelina sativa*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 1999. – Vol. 55. – P. 147–149.
18. Göre M., Kurt O. Research to establish effects of explant sources and plant growth regulators on camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) tiller and plant induction *Anadolu Tarım Bilim. Derg.An. J.Agr. Sci.* – 2015. – Vol. 30. – P. 268–274.
19. Lu C., Kang J. Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediate transformation. *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27, № 2. – P. 273–278.

20. Patent Application: US 2009/0151023 A1. Transformation system for *Camelina sativa* / V.Kuvshinov, A. Kanerva, K Koivu, E. Pehu, S. Kuvshinova; Dodds & Associates, Washington, DC 20036 (US); Publication Date: 11.06. 2009.

21. US Patent Application: 2011/0145950 A1. Floral dip method for transformation of *Camelina* / T.Nguyen, X.Liu, J.Derocher; Global Clean Energy Holdings, Inc., Long Beach, CA (US); Publication Date: 16.06. 2011.

22. LiuX., Brost J., Hutcheon C., Guilfoil R., Wilson A.K., Leung SH., et al. Transformation of the oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple large-scale screening of trans forms. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2012. – Vol. 48. – P. 462–468.

23. Kumari M., Khalid H., NasimM. Growth parameter study in *Camelina sativa*, a potential biofuel crop, under *in vitro* culture conditions. *Ind. J.Agr. Sci.* – 2015. – Vol. 85, №. 8. – P. ISSN 0019-5022.

24. Moser B.R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2009. – Vol. 45. – P.229–266.

25. Поліщук В.М. Тваринні та рослинні жири як сировина для виробництва біодизеля (узагальнення досвіду). Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. К. – 2010. – Вип. 144, Ч. 3. – С. 198–218.

26. Beaudoin F., Sayanova O., Haslam R. P., Bancroft I., Napier J.A. Oleaginous crops as integrated production platforms for food, feed, fuel and renewable industrial feedstock. *OCL.* – 2014. – Vol. 21, №.6. – P. 1–12.

27. Zhu L. H., Krens F., Smith M.A., Xueyuan Li, et al. Dedicated industrial oilseed crops as metabolic engineering platforms for sustainable industrial feedstock production. *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 1–11.

28. Frohlich A., Rice B. Evaluation of *Camelina sativa* biodiesel production. *Ind Crops Prod.* – 2005. – Vol. 21. – P. 25–31.

29. Kagale S., Koh C., Nixon J. et al. The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. *Nature Commun.* – 2014. – Vol. 5, №3706. – P. 1–11.

30. Блюм Я.Б., Левчук О.М., Рахметов Д.Б., Рахметов С.Д. Біологічні ресурси і технології для виробництва різних видів біопалив // Матеріали наукової конференції «Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив». Вісник НАН України. – 2014. – № 11. – С. 64–69, 71.

31. Kim H.J., Silva J. E., Vu H. S. et al. Toward production of jet fuel functionality in oilseeds: identification of FatB acyl-acyl carrier protein thioesterases and evaluation of combinatorial expression strategies in *Camelina* seeds. *J. Exp. Botany.* – 2015. – Vol. 66, №. 14. – P. 4251–4265.

32. Gugel R.K. and Falk K.C. Agronomic and seed quality evaluation of *Camelina sativa* in western Canada. *Can J Plant Sci.* – 2006. – Vol. 86. – P. 1047–1058.

33. Blackshaw R., Johnson E., Ganet Y. et al. Alternative oilseed crops for biodiesel feedstock on the Canadian prairies. *Can. J. Plant Sci.* – 2011. – Vol. 91. – P. 889–896.

34. Urbaniak S.D., Caldwell C.D., Zheljazkov V.D., Lada R., Luan L. The effect of cultivar and applied nitrogen on the performance of *Camelina sativa* L. Maritime Provinces of Canada. *Can. J. Plant Sci.* – 2008. – Vol. 88. – P. 111–119.

35. Dobre P., Jurcoane S. *Camelina* crop opportunities for a sustainable agriculture. *Sci. Papers Series A Agron.* – 2011. – Vol. 54. – P. 420–424.

36. Enjalbert J.N., Zheng S.S., Johnson J.J., Mullen J.L., Byrne P.F., McKay J.K. *Brassicaceae* germplasm diversity for agronomic and seed quality traits under drought stress. *Ind. Crop Prod.* – 2013. – Vol. 47. – P. 176–185.

37. Демидась Г.І., Квітко Г.П., Гетман Н.Я. Рижій посівний – олійна культура альтернативна ріпаку ярому для виробництва біодизеля.

Відновлювані джерела енергії. Збірник наукових праць ВНАУ. – 2011. – С. 3 – 8.

38. Warwick S.I., Francis A., Al-Shehbaz I.A. *Brassicaceae*: species checklist and database on CD-Rom. *Plant Syst. Evol.* – 2006. – Vol. 259. – P. 249–258.

39. Аветисян В.Е. Семейство крестоцветные (*Brassicaceae*, или *Cruciferae*). Жизнь растений / Под ред. А.Л. Тахтаджяна. Москва: Просвещение. – 1981. – Т. 5, №2. – С. 67-74.

40. Murphy D.G. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends Biotechnol.* – 1996. – Vol. 14. – P. 206-213.

41. Warwick S.I., Gugel R. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* – *C. hispanica* – *C. glabrata* complex. *Genet. Res. Crop Evol.* – 2003. – Vol. 50. – P.291–305.

42. Warwick S.I., Gugel R., McDonald T. et al Genetic variation and agronomic potential of Ethiopian mustard (*Brassica carinata*) in western Canada. *Genet. Res. Crop Evol.* – 2006. – Vol. 53. – P. 297-312.

43. Poulsen G.B. Genetic transformation of *Brassica*. *Plant Breed.* – 1996. – Vol. 115. – P. 209-225.

44. Puddephat I.J., Riggs T.J., Fennig T.M. Transformation of *Brassica oleracea* L.: a critical review. *Mol. Breed.* – 1996. – Vol. 2. – P. 185-210.

45. Liu M.S., Ko M.H., Li H.C., Tsai S.J., et al. Compositional and proteomic analyses of genetically modified broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) harboring an agrobacterial gene. *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol.15, №. 9. – P. 15188-209.

46. Kumar P., Srivastava D.K. Biotechnological advancement in genetic improvement of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), an important vegetable crop. *Biotechnol. Lett.* – 2016. – Vol.38, №. 7. – P. 1049–1063.

47. Warwick S.I., Simard M.J., Légère A. et al. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus*

raphanistrum L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O. E. Schulz. *Theor Appl Genet.* – 2003. – Vol. 107. – P. 528–539.

48. Warwick S.I., Légère A., Simard M.J. et al. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Mol. Ecol.* – 2008. – Vol. 17. – P. 1387–1395

49. The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 796–815.

50. Енциклопедія українознавства: словникова частина / В. Кубійович; редкол.: В. Голубничий, А. Жуковський, І. Кошелівець та ін. Вид. «Молоде життя». – 1973. – Т. 7. – С. 2506.

51. Рожкован В., Комарова І. Ранній посів рижю та його швидке дозрівання дають змогу вирощувати на одному полі впродовж року дві культури. *Зерно і хліб.* – 2013. – №. 4. – С. 53–55.

52. Schuster A., Friedt W. *Camelina sativa*: Old face – new prospects. *Crucifer. News.* – 1995. – Vol. 17. – P. 6 – 8.

53. Mansour M.P., Shrestha P., Belid S. et al. Characterization of oilseed lipids from “DHA-producing *Camelina sativa*”: A new transformed land plant containing long-chain Omega-3 oils. *Nutrients.* – 2014. – Vol. 6. – P. 776 – 789.

54. Gehringer A., Friedt W., Lühs W., Snowdon R.J. Genetic mapping of agronomic traits in *false flax* (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). *Genome.* – 2006. – Vol. 49, №. 12. – P. 1555–1563.

55. Mudalkar S., Golla R., Ghatty S., Ramachandra A. De novo transcriptome analysis of an imminent biofuel crop, *Camelina sativa* L. using Illumina GAII-X sequencing platform and identification of SSR markers. *Plant Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 84. – P. 159–171.

56. Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б., Ємець А.І., Бойчук Ю.М., Андрущенко О.Л., Вергун О.М., Рахметова С.О. *Camelina sativa* (L.) Crantz – цінна олійна рослина. *Інтродукція рослин.* – 2014. – Т. 2. – С. 50 – 58.

57. Abramovic H., Abram V. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. Food Technol. & Biotechnol. – 2005. – Vol. 43, № 1. – P. 63-70.

58. Cherian G. *Camelina sativa* in poultry diets: opportunities and challenges. Biofuel co-products as livestock feed. Opportunities and challenges. Food and agricul. organiz. of the united nations. – 2012. – Vol. 17. – P. 303-310.

59. Onyilagha J.C., Gruber M.Y., Hallett R.H. et al. Constitutive flavonoids deter flea beetle insect feeding in *Camelina sativa* L. Biochem. Syst. Ecol. – 2012. – Vol. 42. – P. 128–133.

60. Поляков О.І., Комарова І., Вахненко С. Рижій – альтернативна олійна культура. Пропозиція. – 2013. – № 2. – С. 36 – 38

61. Angelini L.G., Moscheni E., Colonna G., Belloni P., Bonari E. Variation in agronomic characteristics and seed oil composition of new oilseed crops in central Italy. Ind Crops Prod. – 1997. – Vol. 6. – P. 313–323.

62. Goffman F.D., Thies W., Velasco L. Chemo taxonomic value of tocopherols in *Brassicaceae*. Phytochemistry. – 1999. – Vol. 50. – P. 793-798.

63. Zanetti F., Monti A., Berti M.T. Challenges and opportunities for new industrial oilseed crops in EU-27. Ind. Crops Prod. – 2013. – Vol. 50. – P. 580–595.

64. Betancor M.B., Sprague M., Sayanova O., Usher S. et al. Evaluation of a high-EPA oil from transgenic *Camelina sativa* in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Effects on tissue fatty acid composition, histology and gene expression. Aquaculture. – 2015. – Vol. 444. – P. 1–12.

65. Steinke G., Kirchhoff R., Mulherju K.D. Lipase-catalyzed alcoholysis of crambe oil and camelina oil for the preparation of long-chain esters. J. American Oil Chemists' Society. – 2000. – Vol. 77, N 4. – P. 361–366.

66. Deng Q., Huang F., Huang Q. et al. Lipid-lowering evaluation of cold-pressed *Camellina sativa* oil. J. Food, Agr. Envir. – 2001. – Vol. 9. – P. 157–162.
67. Zubr J., Matthaus B. Effect of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. Ind. Crops and Products. – 2002. – Vol. 15. – P. 155–162.
68. Ciorescu G., Hebean V., Tamas V., Burcea D. Use of dietary *Camelina (Camelina sativa)* seeds during the finishing period: effects on broiler performance and on the organoleptic traits of broiler meat. Zooteh. si Biotechnol. – 2007. – Vol. 40, № 1. – P. 410–417.
69. Cais-Sokolinska D., Majcher M., Pikul J., Bielinska S., Czauderna M., Wojfowski J. The effect of *Camelina sativa* cake diet supplementation on sensory and volatile profiles of ewe's milk. African J. of Biotechnol. – 2011. – Vol. 10, № 37. – P. 7245–7552.
70. Imbrea F., Jurcoane S., Halmajan H., Duda M., Botos L. *Camelina sativa*: a new source of vegetal oils. Romanian Biotechnol. Letters. – 2011. – Vol. 16, № 3. – P. 6263–6270.
71. Taranu I., Gras M., Pistol G.C. et al. ω -3 PUF A rich *Camelina* oil by-products improve the systemic metabolism and spleen cell functions in fattening pigs. Plosone. – 2014. – Vol. 9, № 10. – P. 1–15.
72. Salem N. J., Ward G. R. Are omega-3 fatty acids essential nutrients for mammals. Word Rev. Nutr. Diet. – 1993. – Vol. 72. – P. 128-147.
73. Barcelo-Coblijn G., Murphy E.J. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain ω -3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining ω -3 fatty acid levels. Pr. in Lip. Res. – 2009. – Vol. 48. – P. 355–374.
74. Chowdhury R., Warnakula S., Kunutsor S. et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. Ann of Inter Med. – 2014. – Vol. 160, №. 6. – P. 398–406.

75. Sipalova M., Losak T., Hlusek J., Vollmann J., Hudec J. et al. Fatty acid composition of *Camelina sativa* as affected by combined nitrogen and sulphur fertilization. African J. of Agr Research. – 2011. – Vol. 6, № 16. – P. 3919–3923.

76. Henriksen B.I.F., Lunden A.R., Prestlokken E. et al. Nutrient supply for organic oilseed crops and quality of potential organic protein feed for ruminants and poultry. Agronomy Research. – 2009. – Vol. 7 (Special issue II). – P. 592-598.

77. Francis A., Warwick S.I. The biology of Canadian weeds. 142. *Camelina alyssum* (Mill.) Thell.; *C. microcarpa* Andr. ex DC.; *C. sativa* (L.) Crantz. Can. J. Plant Sci. – 2009. – Vol. 89. – P. 791–810.

78. Hixson S.M., Parrish C.C., Anderson D.M. Use of *Camelina* oil to replace fish oil in feeds for farmed salmonids and Atlantic cod. Aquaculture. – 2014. – Vol. 431. – P. 44–52.

79. Hurtaud C., Peyraud J.L. Effects of feeding *Camelina* (seeds or meal) on milk fatty acid composition and butter spreadability. J Dairy Sci. – 2007. – Vol. 90. – P. 5134–5145.

80. Cherian G., Campbell A., Parker T. Egg quality and lipid composition of eggs from hens fed *Camelina sativa*. J. App. Poul. Res. – 2009. – Vol. 18. – P. 143–150.

81. Shonnard D.R., Williams L., Kalnes T.N. *Camelina*-derived jet fuel and diesel: sustainable advanced biofuels. Environ. Prog. Sustain Energy. 2010. Vol. 29. №. 3. P. 382–392.

82. Sharma G., Dinesh Kumar V., Haque A., Bhat S.R., Prakash S., Chopra V.L. *Brassica* coeno species: a rich reservoir for genetic resistance to leaf spot caused by *Alternaria brassicae*. Euphytica. – 2002. – Vol. 125. – P. 411–417.

83. Li H., Barbetti M.J., Sivasithamparam K. Hazard from reliance on cruciferous hosts as sources of major gene-based resistance for managing

blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease. *Field Crop. Res.* – 2005. – Vol. – 91. – P. 185–198.

84. Ehrensing D.T, Guy S.O. *Camelina*. Oreg. S. U., Corvallis. – 2008. Режим доступу: <http://extension.oregonstate.edu/catalog/pdf/em/em8953-e.pdf>.

85. 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.

86. Seguin-Swartz G., Eynck C., Gugel R.K. et al. Diseases of *Camelina sativa* (false flax). *Can. J. Plant Pathol.* – 2009. – Vol. 31. – P. 375–386.

87. Hunsaker D.J., French A.N., Clarke T.R., El-Shikha D.M. Water use, crop coefficients, and irrigation management criteria for *Camelina* production in arid regions. *Irrig. Sci.* – 2011. – Vol. 29. – P. 27–43.

88. Семенов В.Г. Біодизельне паливо для України. Вісник НАН України. – 2007. – №. 4. – С. 18 – 22.

89. Yusuf N.N., Kamarudin S.K., Yaakub Z. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Convers Manage.* – 2011. – Vol. 52. – P. 2741–2751.

90. Schmidt C.W. Biodiesel: cultivating alternative fuels. *Environ Health Perspect.* – 2007. – Vol. 115, №. 2. – P. 86–91.

91. Hein L., Leemans R. The impact of first-generation biofuels on the depletion of the global phosphorus reserve. *Ambio.* – 2012. – Vol. 41, №. 4. – P. 341–349.

92. Ong H.C., Mahlia T.M.I., Masjuki H.H., Honnery D. Life cycle cost and sensitivity analysis of palm biodiesel production. *Fuel.* – 2012. – Vol. 98. – P. 131–139.

93. Smith K.A., Mosier A. R., Crutzen P. J., Winiwarter W. The role of N₂O derived from crop-based biofuels, and from agriculture in general, in Earth's climate. *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2012. – Vol. 367. – P. 1169–1174.

94. Vimmerstedt L.J., Bush B., Peterson S. Ethanol distribution, dispensing, and use: analysis of a portion of the biomass-to-biofuels supply chain using system dynamics. PLoS One. – 2012. – Vol. 7, №. 5. – P. 1–18.

95. Georgescu M., Lobell D., Field C. Direct climate effects of perennial bioenergy crops in the United States. PNAS. – 2011. – Vol. 108, №. 11. – P. 4307–4312.

96. Khanal S., Anex R. P., Anderson C. J., Herzmann D. E. Streamflow impacts of biofuel policy-driven landscape change. PLoS One. – 2014. – Vol. 9, №. 10. – P. 109–129.

97. Dellomonaco C., Fava F., Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. Microbial Cell. Fact. – 2010. – Vol. 9, №. 3. – P. 2 – 15.

98. Скрипниченко В.А. Деякі аспекти впровадження нетрадиційних відновлюваних і альтернативних видів паливно-енергетичних ресурсів. Науковий вісник НУБіП України. – 2013. – №. 181. – С. 294 – 298.

99. Kephart K., G.B.Opera, D.Johnson. Adaptation and evaluation of several oilseed species for potential biodiesel and biolubricant production in south central Montana. Annual Report – 2006. <http://www.sarc.montana.edu/2006>.

100. Bates P.D., Stymne S., Ohlrogge J. Biochemical pathways in seed oil synthesis. Curr. Opin. Plant Biol. – 2013. – Vol. 16. – P. 358–364.

101. Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beissonetal F. Acy-llipid Metabolism. The Arabidopsis Book. – 2013. – Vol. 11. – P. 1–61.

102. Nguyen H., Silva J., Podicheti R., et al. *Camelina* seed transcriptome: a tool for meal and oil improvement and translational research. Plant Biotechnol. J. – 2013. – Vol. 11. – P. 759–769.

103. Gesch R.W., Archer D.W. Double-cropping with winter *Camelina* in the northern Corn Belt to produce fuel and food. Ind.Crop. Prod. – 2013. – Vol. 44. – P. 718–725.

104. Feng Z., Zhang B., Ding W. et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell. Research.* – 2013. – Vol. 23. – P. 1229–1232.
105. Gesch R.W., Archer D.W., Berti M.T. Dual cropping winter *Camelina* with soybean in the northern Corn Belt. *Agron. J.* – 2014. – Vol. 106. – P. 1735–1745.
106. Krohn B.J., Fripp M.A. Life cycle assessment of biodiesel derived from the “niche filling” energy crop *Camelina* in the USA. *Appl. Energ.* – 2012. – Vol. 92. – P. 92–98.
107. Li X., Mupondwa E. Life cycle assessment of *Camelina* oil derived biodiesel and jet fuel in the Canadian Prairies. *Sci. Tot. Env.* – 2014. – Vol. 481. – P. 17–26.
108. Sjodin C. *Brassicaceae*, a plant family well suited for modern biotechnology. *Acta Agr. Scand.* – 1992. – Vol. 42. – P. 197–207.
109. Keller W.A., Armstrong K.C. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures. *Can J Bot.* – 1977. – Vol. 55. – P. 1383–1388.
110. Murata M., Orion T.J. Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1987. – Vol. 11. – P. 111–123.
111. Moloney M.M., Walker J.M., Sharma K.K. High-efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep.* – 1989. – Vol. 8. – P. 238–242.
112. Sharma K K., Bhojwani S.S., Thorpe T.A. Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Science.* – 1990. – Vol. 66, № 2. – P. 247–53.
113. Hachey J.E., Sharma K.K., Moloney M.M. Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep.* – 1991. – Vol. 9. – P. 549–54.

114. Ono Y., Takahata Y., Kaizuma N. Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L). *Plant Cell Rep.* – 1994. – Vol. 14. – P. 13–17.
115. Gaur A., Chowdhury V.K., Yadav R.C., Chowdhury J.B. *Agrobacterium* mediated transformation in Indian mustard of *Brassica juncea* L. coss and czern. *Eucar. Crucif. Newslett.* – 1997. – Vol. 19. – P. 59–60.
116. Radke S.E., Andrews B.M., Moloney M.M., Crouch M.L., Krid J.C., Knauf V.C. Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. *Theor. Appl. Genet.* – 1988. – Vol. 75, № 5. – P. 685–694.
117. De Block M., Tenning P., de Brouwer D. 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. – Vol. 91. – P. 694 – 701.
118. Yang M.Z., Jia S.R., Pua E.C. High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1991. – Vol. 24. – P. 79–82.
119. Das B., Goswami L., Ray S. et al. *Agrobacterium* mediated transformation of *Brassica juncea* with a cyanobacterial (*Synechocystis* PCC6803) delta-6 desaturase gene leads to production of gamma linolenic acid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2006. – Vol. 86. – P. 219–31.
120. Christey M.C., Earle E.D. Regeneration of *Brassica oleracea* from peduncle explants. *Hort Science.* – 1991. – Vol. 26. – P. 1069–1072.
121. Eapen S., George L. Plant regeneration from peduncle segments of oilseed *Brassica* species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 1997. – Vol. 51. – P. 229–32.
122. Alaska-Kennedy Y., Yoshida H., Takahata Y. Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): the influence of AgNO₃ and genotype. *Plant Cell Rep.* – 2005. – Vol. 24. – P. 649–654.

123. Fry J., Barnason A., Horsch R. B. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium* based vectors. *Plant Cell Reports*. – 1987. – Vol. 6. – P. 321–325.
124. Litcher R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Plant Physiol*. – 1982. – Vol. 105. – P. 427–434.
125. Xu Z.H., Davey M.R., Cocking E.C. Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Plant Sci. Lett.* – 1982. – Vol. 24. – P. 117–121.
126. Glimelius K. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. *Physiol Plant*. – 1984. – Vol. 61. – P. 38–44.
127. Barsby T.L., Yarrow S.A., Shepard J.F. A rapid and efficient alternative procedure for the regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* – 1986. – Vol. 5. – P. 101–103.
128. Kik C., Zaal M.A.C.M. Protoplast culture and regeneration from *Brassica oleracea* ‘rapid cycling’ and other varieties. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 1993. – Vol. 35. – P. 107–14.
129. Hu Q., Anderson S.B., Hansen L. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 1999. – Vol. 59. – P. 189–96.
130. Радчук В.В., Блюм Я.Б., РышкаУ., Шуманн Г., Клоке Э. Изучение регенерации и получение трансгенных растений у различных сортов белокочанной капусты. *Физиология растений*. – 2000. – Т. 47, №. 3. – С. 453-460.
131. Tang G.H., Zhou W.Z., Li H.Z. et al. Medium, explant and genotype factors influencing shoot regeneration in oilseed *Brassica* spp. *Agr. Crop Sci.* – 2003. – Vol. 189. – P. 351–358.
132. Cardoza V., Stewart N. Canola (*Brassica napus* L.). In: Wang K (ed) *Agrobacterium* protocols (2nd edn). *Methods in molecular biology*. – 2006. – Vol. 343. – P. 257 – 266.

133. Gasic K., Korban S.S. Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern). In: Wang K (ed) *Agrobacterium* Protocols (2nd edn). Methods in molecular biology. – 2006. – Vol. 343. – P. 281 – 289.
134. Munshi M.K., Roy P.K., Kabir M.H., Ahmed G. *In vitro* regeneration of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) through hypocotyl and cotyledon culture. Plant Tiss. Cult. Biotechnol. – 2007. – Vol. 2. – P. 131–136.
135. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T. *In vitro* regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. *Capitata*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2015. – Vol. 51. – P. 80–87.
136. Dietert M.F., Barron Sa, Yoder O.C. Effects of genotype on *in vitro* culture in the genus *Brassica*. *Plant Sci Lett.* – 1982. – Vol. 26. – P. 233-240.
137. Dunwell J.M. *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three *Brassica* species. *J Exp Bot.* – 1981. – Vol. 32. – P. 789-799.
138. Fazekas G.A., Sedmach P.A., Palmer M.V. Genetic and environmental effects on *in vitro* shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* – 1986. – Vol. 6. – P. 177-180.
139. Jain R.K., Chowdhury J.B., Sharma D.R., Friedt W. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassic* species. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* – 1988. – Vol. 14. – P. 197-206.
140. Ono Y., Takahata Y. Genetic analysis of shoot regeneration from cotyledonary explants in *Brassica napus*. *Theor Appl. Genet.* – 2000. – Vol. 100. – P. 895–898.
141. Sparrow P.A.C., Townsend T., Morgan C.L., Arthur A.E., Dale P.J., Irwin J.A. Genetic analysis of *in vitro* shoot regeneration from cotyledonary petioles of *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – Vol. 108. – P. 1249–1255.
142. Gil-Humanes J., Martín A., Barro F. Characterization of a collection of *Brassica carinata* genotypes for *in vitro* culture response and mode of shoot regeneration. *Amer. J. Plant Sci.* – 2011. – Vol. 2. – P. 27–34.

143. Zhang F. L., Takahata Y., Xu J. B. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp *pekinensis*). *Plant Cell Rep.* – 1998. – Vol. 17. – P. 780–786.
144. Ahmed N.U., Park J.I., Kim H.R., Nou S. Progress in genetic manipulation of the *Brassicaceae*. *J Plant Biotechnol.* – 2012. – Vol. 39. – P. 1–12.
145. Khan I., Khan M. S., Ilyas M., Rajab H., Shah S. H., Jalal A. Genetic transformation of *Brassica napus* with the antifungal *chitinase* gene. *Int. J. Agric. Biol.* – 2013. – Vol. 15. – P. 933–938.
146. He W. T., Hou S. W., Wang C. Y. Callus induction and high-frequency plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of *Arctium lappa* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2006. – Vol. 42, № 5. – P. 411-414.
147. Burbulis N., Kupriene R., Blinstrubiene A. Callus induction and plant regeneration from somatic tissue in spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biologija.* – 2008. – Vol. 54, №. 4. – P. 258–263.
148. Zhang Yu., Xu J., Han Lu. et al. Efficient shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica juncea*. *Plant Mol. Rep.* – 2006. – Vol. 24. – P. 255a - 255i.
149. Koh W.J., Lox C.S. Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering rapid-cycling *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* – 2000. – Vol. 19. – P. 1177–1183.
150. Sretenović-Rajičić T., Ninković S., Uzelać B., Vinterhalter B., Vinterhalter D. Effects of plant genotype and bacterial strain on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica oleracea* L. var. *Capitata*. *Russ J Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 54. – P. 653–658.
151. Maheshwari P., Selvaraj G., Kovalchuk I. Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation. *Nat Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 144–155.

152. Ali H., Ali Z., Ali H., Mehmood S. *In vitro* regeneration of *Brassica napus* L. cultivars (Star, Cyclone and Westar) from hypocotyls and cotyledonary leaves. Pak. J. Bot. – 2007. – Vol. 39. – P. 1251-1256.
153. Bano R., Khan M.H., Khan R.S., Rashid H., Swati Z.A. Development of an efficient regeneration protocol for three genotypes of *Brassica juncea*. Pak. J. Bot. – 2010. – Vol. 42. – P. 963–969.
154. Khan M., Robin A., Nazim-Ud-Dowla M., Talukder S., Hassan L. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of two varieties of *Brassica*: optimization of protocol. Bang. J. Agric. Res. – 2010. – Vol. 34. – P. 287–301.
155. Kong F., Li J., Tan X. et al. Newtime-saving transformation system for *Brassica napus*. Afr. J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 8. – P. 2497–2502.
156. Millam S., Hodgson V.J. *In vitro* response of thin-layer floral internode sections of *Brassica oleracea* L. to a range of sucrose and maltose levels. J. Plant Physiol. – 1991. – Vol. 138. – P. 620 – 621.
157. Hildebrandt A. C., Riker A. J. The influence of various carbon components on the growth of marigold, paris daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue *in vitro*. Am. J. Bot. – 1949. – Vol. 36. – P. 74—85.
158. Chi G.L., Pua E.C., Goh C.J. Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* (Lour) Olesson *in vitro*. Plant Physiol. – 1991. – Vol. 96. – P. 178–183.
159. Burnett L., Arnoldo M., Yarrow S., Huang B. Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explant of *Brassica rapa* ssp. *oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1994. – Vol. 37. – P. 253—256.
160. Pua E. C., Chi G. L. De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) *in vitro* in relation to ethylene. Physiol. Plant. – 1993. – Vol. 88. – P. 467 – 474.

161. Радчук В.В., Клоке Е., Радчук Р.И., Нойманн М., Блюм Я.Б. Получение трансгенных растений рапса (*Brassica napus* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. Генетика. – 2000. – Т. 36, № 7. – С. 932-941.
162. Rani T., Yadav R. C., Yadav N. R. Genetic transformation in oilseed brassicas - A review. Ind. J. Agr. Sci. – 2013. – Vol. 83, №. 4. – P. 367–373.
163. Liu X.X., Lang S.R., Su L.Q., Liu X., Wang X.F. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation and high efficiency of rootformation from hypocotyl meristem of spring *Brassica napus* 'Precocity' cultivar. Genet. Mol. Res. – 2015. – Vol. 14, № 4. – P. 16840-16855.
164. Bhatnagar-Mathur P., Vadez V., Sharma K.K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. Plant Cell Rep. – 2008. – Vol. 27, № 3. – P. 411–424.
165. Confalonieri M., Faè M., Balestrazzi A. et.al. Enhanced osmotic stress tolerance in *Medicago truncatula* plants over expressing the DNA repair gene *MtTdp 2a* (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2). Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2014. – Vol. 116, № 2. – P. 187–203.
166. Su X., Zhou P., Wang R. et al. Overexpression of the maize *psbA* gene enhances sulfur dioxide tolerance in transgenic tobacco. Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2015. – Vol. 120, № 1. – P. 303-311.
167. Сахно Л.А., Герасименко И.М., Комарницкий И.К., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Создание устойчивых к глифосату растений *Brassica napus* L., экспрессирующих десатуразу DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus*. Biopolym. Cell. – 2012. – Т. 28, № 6. – С. 449–455.
168. Green J.M. The benefits of herbicide-resistant crops. Pest Manag. Sci. – 2012. – Vol. 68, № 10. – P. 1323-1331.
169. Vencill W.K., Nichols R.L., Webster T.M. et al. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. Weed Sci. – 2012. – Special Issue. – P. 2–30.

170. Konagaya K-I., Tsuda M., Okuzaki A., Ando S. et al. Application of the acetolactate synthase gene as a cisgenic selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Plant Biotechnol. – 2013. – Vol. 30. – P. 125-133.

171. Сахно Л.О., Комарницький І.К., Кучук М.В. Стійкість до гліфосату і глюфозінату в поколіннях T₁–T₂ біотехнологічних рослин ріпаку (*Brassic napus* L.). Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2015. – Т. 13, № 1. – С. 3-10.

172. Zang H.X., Hodson J.N., Williams J.P., Blumwald E. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, № 22. – P. 12832 – 12836.

173. Dhaka N., Chaudhary P., Sarin N.B. *Agrobacterium* mediated transformation using Glyoxylase II to increase salt tolerance in *Gossypium hirsutum*. Plant Mol. Biol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 4. – P. 1–5.

174. Soroka J., Gugel R., Elliott R. et al. Resistance of crucifer species to insect pests. Proc GCIRC 11th Int Rapeseed Congr. – 2003. – Vol. 3. – P. 1031–1033.

175. Henderson A.E., Hallett R.H., Soroka J. Prefeeding behavior of the crucifer flea beetle, *Phyllotreta cruciferae*, on host and nonhost crucifers. J Insect Behav. – 2004. – Vol. 17. – P. 17–39.

176. Keshamma E., Sreevathsa R., Kumar A.M., Reddy K.N. et al. *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of field bean (*Lablab purpureus* L.) and recovery of stable transgenic plants expressing the *cry1AcF* gene. Plant Mol. Biol. Rep. – 2012. – Vol. 30. – P. 67-78.

177. Hong H., Datla N., Darwin W. R. et al. High-level production of γ -linolenic acid in *Brassica juncea* using a $\Delta 6$ -desaturase from *Pythium irregulare*. Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129. – P. 354–362.

178. Sivaraman I., Amurugam N., Sodhi S.Y., Gupta V. Development of high oleic and low linoleic acid transgenics in a zero erucic acid *Brassica*

juncea L. (Indian mustard) line by antisense suppression of the *fad2* gene. Mol. Breed. – 2004. – Vol. 13. – P. 365–375.

179. Mietkiewska E., Hoffman T.L., Brost J.M. Hairpin-RNA mediated silencing of endogenous FAD2 gene combined with heterologous expression of *Crambe abyssinica* FAE gene causes an increase in the level of erucic acid in transgenic *Brassica carinata* seeds. Mol Breed. – 2008. – Vol. 22. – P. 619–627.

180. Сахно Л.О., Остапчук А.М., Ключко В.В., Кучук М.В. Жирнокислотний склад насіння ріпаку з трансгеном *sup11A1* цитохрому P450_{SCC}. Біотехнологія. – 2012. – Т.5, № 5. – С. 27–33.

181. Barfield D.G., Pua E.C. Gene transfer in plants of *Brassica juncea* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell Rep. – 1991. – Vol. 10. – P. 308–314.

182. Radke S.E., Turner J.C., Facciotti D. Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11. – P. 499–505.

183. Gupta V., Sita Lakshmi G., Shaila M.S., Jagannathan V. Genetic transformation of *Brassica nigra* by *Agrobacterium* based vector and direct plasmid uptake. Plant Cell Rep. – 1993. – Vol. 12. – P. 418–421.

184. Narasimhulu S.B., Kirti P.B., Mohapatra T., Prakash S., Chopra V.L. Shoot regeneration in stem explants and its amen ability to *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in *Brassica carinata*. Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11. – P. 359–362.

185. Yadav R C., Konishi H., Kamada H., Kikuchi F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Brassica carinata* L. Braun. Eucarpia Cruciferae Newsletter. – 1997. – Vol. 19. – P. 61–72.

186. Bhalla P.L., Smith N. *Agrobacterium*-mediated transformation of Australian cultivars of cauliflowers, *Brassica oleracea* var botrytis. Mol Breed. – 1998. – Vol. 4. – P. 531–541.

187. Sparrow P.A.C., Dale P.J., Irwin J.A. The use of phenotypic markers to identify *Brassica oleracea* genotypes for routine high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* – 2004. – Vol. 23. – P. 64–70.
188. Sparrow P.A.C., Snape J.W., Dale P.J., Irwin J.A. The rapid identification of *B. napus* genotypes, for high-through put transformation, using phenotypic tissue culture markers. *Acta Hortic.* – 2006. – Vol. 706. – P. 239–247.
189. Bhalla P.L., Singh M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nat. Protoc.* – 2008. – Vol. 2. – P. 181–189.
190. Wahlroos T., Susi P., Tylkina L. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and stable expression of the green fluorescent protein in *Brassica rapa*. *Plant Physiol Biochem.* – 2003. – Vol. 41, № 9. – P. 773-778.
191. Takasaki T., Hatakeyama K., Hinata K. Effect of silver nitrate on shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of Turnip (*Brassica rapa* L. var. *rapifera*). *Plant Biotechnol.* – 2004. – Vol. 21, №3. – P. 225-228.
192. Bhuiyan M.S.U., Min S.R., Jeong W.J., Sultana S. et al. An improved method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation from cotyledon explants of *Brassica juncea*. *Plant Biotech.* – 2011. – Vol. 28. – P. 17 – 23.
193. Babic V., Datla R.S., S coles G.J., Keller W.A. Development of an efficient *Agrobacterium* mediated transformation system for *Brassica carinata*. *Plant Cell Rep.* – 1998. – Vol. 17. – P. 183–188.
194. Zhang F.L., Takahata Y., Watanabe M., Xu J.B. *Agrobacterium* - mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep.* – 2000. – Vol. 19. – P. 569 – 575.

195. Yang Z.H., Jin H., Plaha P. et al. An improved regeneration protocol using cotyledonary explants from inbred lines of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). J Plant Biotechnol. – 2004. – Vol. 6. – P. 235–239.
196. Kuvshinov V., Koivu K., Kanera A., Perhu E. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of greenhouse-grown *Brassica rapa* ssp. *Oleifera*. Plant Cell Rep. – 1999. – Vol. 18. – P. 733–777.
197. Qing C.M., Fan L., Lei Y. et al. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *Chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. Mol. Breed. – 2000. – Vol. 6. – P. 67–72.
198. Yan J.Y., He Y.K., Cao J.S. Transformation of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) by *Agrobacterium* micro-injection into flower bud. Agric. Sci. China. – 2003. – Vol. 2. – P. 906–911.
199. Yan J.Y., He Y.K., Cao J.S. Factors affecting transformation efficiency by micro-injecting *Agrobacterium* into flower bud of Chinese cabbage. Agric. Sci. China. – 2004. – Vol. 3. – P. 44–51.
200. Wu J., Wu L., Liu Z. et al. A plant defensin gene from *Orychophragmus violaceus* can improve *Brassica napus* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Afr. J. Biotechnol. – 2009. – Vol. 8, № 22. – P. 6101–6109.
201. Wang J., Chen Z., Du J., Sun Y., Liang A. Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. Plant Cell Reports. – 2005. – Vol. 24. – P. 549–55.
202. Moghaieb R. E.A., El-Awady M.A., Mergawy R. G. E., Youssef S. S., M.El-Sharkawy A. A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). Afr. J. of Biotechnol. – 2006. Vol. 5, №2. – P. 143–148.
203. Babwah A.V., Wandell C.S. Cytosine deaminase as a substrate-dependent negative selectable marker in *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet. – 2000. – Vol. 100, № 5. – P. 802–809.

204. 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. Biothechnol. – 2000. – Vol. 9, № 2. – P. 73–79.

205. Prasad K. V. S. K., Sharmila P., Kumar P.A., Saradhi P. P. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress. Mol. Breed. – 2000. – Vol. 6. – P. 489–499.

206. Dutta I., Majumder P., Saha P., Ray K., Das S. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). Plant Sci. – 2005. – Vol. 169. – P. 996 – 1007.

207. Longdou L., Wu J., Wang J., Duan H., Li R. Expression of chitinase gene in transgenic rape plants. Analele Stiintifice ale Universitatii “Al.I. Cuza” Iasi, Genetica si biologie moleculara. – 2005. – P. 167–72.

208. Cardoza V., Stewart N. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21. – P. 599–604.

209. Sharma M., Sahni R., Kansal R., Koundal K.R. Transformation of oilseed mustard *B. juncea*. var. PJK with Snowdrop lectin gene. Ind J. Biotechnol. – 2004. – Vol. 3. – P. 97–102.

210. Singh V.V., Verma V., Pareek A.K. et al. Optimization and development of regeneration and transformation protocol in Indian mustard using lectin gene from chickpea [*Cicer arietinum* (L.)]. J. Plant Breed. Crop Sci. – 2009. – Vol. 1, № 9. – P. 306–10.

211. Kong F., Li J., Tan X. A new time-saving transformation system for *Brassica napus*. Afr. J. Biotechnol. – 2009. – Vol. 8, № 11. – P. 2497–2502.

212. Liu H., Guo X., Naeem M.S. Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella*

xylostella and *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2011. – Vol. 106. – P. 143–51.

213. Патент України на корисну модель № 39205, МПК А01Н1/00; А01Н4/00; А01Н5/00; С12Н1/00; С12Н5/00; С12Н15/00, Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації / Гочева Є.А., Сахно Л.О., Кучук М.В., заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та біотехнології НАНУ, заявл. 3.10.2008; опубл. 10.02.2009, бюл. № 3.

214. Vamling K., Glimelius K. Regeneration of plants from protoplasts of oilseed *Brassica* crops. [Biotechnology in Agriculture and Forestry. V. 10: Legumes and Oilseed Crops I.] eds. Y.P.S. Baja. Springer, Berlin. – 1990. – P. 385-417.

215. 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. – Vol. 13. – P. 657–660.

216. Нітовська О.І., Шаховський А.М., Череп М.Н., Городенська М.М., Кучук М.В. Отримання цибридних транспластомних рослин *Brassica napus* з хлоропластами *Lesquerella fendleri*. Cytology and Genetics. – 2006. – Т. 40, № 4. – С. 3 – 11.

217. Damm B., Schmidt R., Willmitz L. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. Mol. Gen. Genet. – 1989. – Vol. 217. – P. 6–12.

218. Mukhopadhyay A., Topfer R., Pradhan A.K. et al. Efficient regeneration of *Brassica oleracea* hypocotyl protoplasts and high frequency genetic transformation by direct DNA uptake. Plant Cell Rep. – 1991. - Vol. 10. – P. 375–379.

219. Eimert K., Siegemund F. Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis)-an experimental survey. Plant Mol. Biol. – 1992. – Vol. 19. – P. 485–490.

220. Radchuck V., Ryschka U., Schumann G., Klocke E. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleraceavar. botrytis*) by direct DNA uptake into mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.* – 2002. – Vol. 114. – P. 429-438.

221. Sanford J.C., Smith F.D., Russel J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* – 1993. – Vol. 217. – P. 483-509.

222. Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature.* – 1987. – Vol. 327. – P. 70-73.

223. Chen J.L., Beversdorf W.D. A combined use of microprojectile bombardment and DNA imbibitions enhances transformation frequency of canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – Vol. 88, № 1. – P. 187-192.

224. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Sciences de la Vie.* – 1993. – Vol. 316. – P. 1194–1199.

225. Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* – 1998. – Vol. 16. – P. 735–743.

226. Kojima M., Sparthana P., Teixeira da Silva J.A., Nogawa M. Development of *in planta* transformation methods using *Agrobacterium tumefaciens*. [In: Teixeira da Silva JA (ed) Floriculture, ornamental and plant biotechnology]. Global Sci. Books, Isleworth, UK. – 2006. – Vol 2. – P. 41-48.

227. Ye G.N., Stone D., Pang S.Z. et al. *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium in planta* vacuum infiltration transformation. *The Plant J.* – 1999. – Vol. 19. – P. 249–257.

228. Desfeux C., Clough S.J., Bent A.F. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the

Arabidopsis floral-dip method. Plant Physiol. – 2000. – Vol. 123. – P. 895–904.

229. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta*. Биотехнология. – 2012. – № 1. – С. 8–20.

230. Qing C.M., Fan L., Lei Y. et al. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *Chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. Mol. Breed. – 2000. – Vol. 6. – P. 67–72.

231. 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. – Vol. 22. – P. 274–281.

232. Verma S., Chinnusamy V., Bansal K. A simplified floral dip method for transformation of *Brassica napus* and *B. carinata*. Plant Biochem. & Biotechnol. – 2008. – Vol. 17, № 7. – P. 197–200.

233. Curtis I.S., Nam H.G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. longipinnatus Bailey) by floral-dip method-plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. Transgenic Res. – 2001. – Vol. 10. – P. 363–371.

234. Narusaka M., Shiraishi T., Iwabuchi M., Narusaka Y. The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping. Plant Biotechnol. – 2010. – Vol. 27, № 4. – P. 349–351.

235. Chung M.H., Chen M.K., Pan S.M. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. Transgen. Res. – 2000. – Vol. 9. – P. 471–476.

236. Викторэк-Смагур А., Хнатушко-Конка К., Кононович А. К. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация. Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 4. – С. 619–628.

237. Tague B.W. Germ-line transformation of *Arabidopsis lasiocarpa*. *Trasgen. Res.* – 2001. – Vol. 10. – P. 259 – 267.
238. Davis A.M., Hall A., Millar A.J., Darrah C., Davis S.J. Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Met.* – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 1 – 7.
239. Шевченко І.А., Поляков О.І., Ведмедєва К.В., Комарова І. Б. Рижій, сафлор, кунжут. Стратегія виробництва олійної сировини в Україні (малопоширені культури). Інститут олійних культур Національної академії аграрних наук України. Запоріжжя: Статус. – 2017. – С. 5–15.
240. Hansen L.N. Intertribal somatic hybridization between rapid *cycling Brassica oleracea* L. And *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Euphytica.* – 1998. – Vol. 104. – P. 173–179.
241. Sigareva M.A., Earle E.D. Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – Vol. 98. – P. 164–170.
242. Jiang J., Zhao X., Tian W. et al. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Camelina sativa* with high linolenic acid content. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* – 2009. – Vol. 99. – P. 91–95.
243. Ferrie A.M.R., Bethune T.D. A microspore embryogenesis protocol for *Camelina sativa*, a multi-use crop. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2011. – Vol. 106. – P. 495–501.
244. Millam S., Mitchell S.M., Moscheni E., Lyon J.E. The establishment and regeneration of a range of *Cuphea* germplasm *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1997. – Vol. 48. – P. 143–147.
245. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
246. Beilstein M.A., Al-Shehbaz I.A., Kellogg E.A. *Brassicaceae* phylogeny and trichome evolution. *Am. J. Bot.* – 2006. – Vol. 93. – P. 607–619.

247. Beilstein M.A., Al-Shehbaz I.A., Mathews S., Kellogg E.A. *Brassicaceae* phylogeny inferred from phytochrome and NDHF sequence data: tribes and trichomes revisited. *Am. J. Bot.* – 2008. – Vol. 95. – P. 1307–1327.
248. Stuitje A.R., Verbree E.C., van der Linden K.H. et al. A Seed-expressed fluorescent protein as versatile tool for easy (co) transformation and high-throughput functional genomics in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* – 2003. – Vol. 1. – P. 301–309.
249. Lu C., Fulda M., Wallis J.G., Browse J. A high-throughput screen for genes from castor that boost hydroxy fatty acid accumulation in seed oils of transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* – 2006. – Vol. 45. – P. 847 – 856.
250. Kang J., Snapp A.R., Lu C. Identification of three genes encoding microsomal oleate desaturases (FAD2) from the oilseed crop *Camelina sativa*. *Plant Physiol. Biochem.* – 2011. – Vol. 49. – P. 223–229.
251. Snapp A.R., Kang J., Qi X., Lu C. A fatty acid condensing enzyme from *Physaria fendleri* increases hydroxyl fatty acid accumulation in transgenic oilseeds of *Camelina sativa*. *Planta.* – 2014. – Vol. 240. – P. 599–610.
252. Sayanova O., Ruiz-Lopez N., Haslam R.P., Napier J.A. The role of D6-desaturase acyl-carrier specificity in the efficient synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Plant Biotechnol. J.* – 2012. – Vol. 10, №. 2. – P. 195–210.
253. Ruiz-Lopez N., Haslam R., Napier J.A., Sayanova O. Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *Plant J.* – 2014. – Vol. 77. – P. 198–208.
254. Petrie J.R., Shrestha P., Belide S. et al. Metabolic engineering *Camelina sativa* with fish oil-like levels of DHA. *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1–8.
255. Hills G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2003. – Vol. 105. – P. 601–607.

256. Liu J., Rice A., McGlew K. et al. Metabolic engineering of oilseed crops to produce high levels of novel acetyl glyceride oils with reduced viscosity, freezing point and calorific value. *Plant Biotechnol. J.* – 2015. – Vol. 13. – P. 858–865.

257. Liu J., Tjellstrom H., McGlew K. et al. Field production, purification and analysis of high-oleic acetyl-triacylglycerols from transgenic *Camelina sativa*. *Ind. Crop Prod.* – 2015. – Vol. 65. – P. 259–268.

258. Durrett T.P., McClosky D.D., Tumaney A.W. et al. A distinct DGAT with sn-3 acetyltransferase activity that synthesizes unusual, reduced-viscosity oils in *Euonymus* and transgenic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 9464–9469.

259. Hutcheon C., Ditt R. F., Beilstein M. et al. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes. *BMC Plant Biol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 233.

260. Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Nekrasov V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/ Cas system. *Plant Methods.* – 2013. – Vol. 9. – P. 39.

261. Feng Z., Mao Y., Xu N., Zhang B. et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111. – P. 4632–4637.

262. Vollmann J., Grausgruber H., Stift G. et al. Genetic diversity in *Camelina* germplasm as revealed by seed quality characteristics and RAPD polymorphism. *Plant Breed.* – 2005. – Vol. 124. – P. 446–453.

263. Vollmann J., Moritz T., Kargl C. et al. Agronomic evaluation of *Camelina* genotypes selected for seed quality characteristics. *Ind. Crop Prod.* – 2007. – Vol. 26. – P. 270–27.

264. Rodríguez-Rodríguez M.F., Sanchez-García A., Salas J.J. et al. Characterization of the morphological changes and fatty acid profile of

developing *Camelina sativa* seeds. Ind. Crop Prod. – 2013. – Vol. 50. – P. 673–679.

265. Malik M.R., Yang W., Patterson N. et al. Production of high levels of poly-3-hydroxybutyrate in plastids of *Camelina sativa* seeds. Plant Biotechnol. J. – 2015. – Vol. 13. – P. 675–688.

266. Pollard M., Delamarter D., Martin T.M., Shachar-Hill Y. Lipid labeling from acetate or glycerol in cultured embryos of *Camelina sativa* seeds: A tale of two substrates. Phytochem. – 2015. – Vol. 118. – P. 192–203.

267. Desta Z.A., Ortiz R. Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. Trends Plant Sci. – 2014. – Vol. 19. – P. 592–601.

268. Liang C., Liu X., Yiu S.-M., Lim B.L. De novo assembly and characterization of *Camelina sativa* transcriptome by paired-end sequencing. BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – P. 146–156.

269. Бейдеман И.Н. Методика фенологических наблюдений при геоботанических исследованиях. Москва: АН СССР. – 1954. – С. 131.

270. Доспехов Б.А. Основы методики полевого опыта. Москва: Просвещение. – 1967. – С. 176.

271. Артюшенко З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений: Семя. Львов: Наука. – 1990. – С. 203.

272. Викторов Д.П. Краткий словарь ботанических терминов. Москва: Наука. – 1964. – С. 178.

273. Сікура Й.Й., Капустян В.В., Сікура А.Й. Морфологічні особливості плодів та насіння квіткових рослин світової флори. Київ: Фітосоціоцентр. – 2005. – С. 124.

274. Методические указания по семеноведению интродуцентов / Под ред. М.Г. Николаева. Москва: Наука. – 1980. – С. 63.

275. 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. – Vol. 6, №13. – P. 3901–3907.

276. Becker D., Brettschneider R., Lörtz H. Fertile transgenic wheat from miroprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* – 1994. – Vol. 5. – P. 299–307.

277. Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа. – 1990. – С. 352.

278. Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Бойчук Ю.М., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Фізіологічні та морфо метричні характеристики нових форм та сортів ярого рижю (*Camelina sativa*). Вісник Укр. тов.-ва. генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, №1. – С. 65 – 77.

279. Ionescu (Truta) A., Roman Gh. V. Research on morphological and biological peculiarities of *Camelina sativa* (L.) Crantz species under the conditions of the central part of roumanian plain. *USAMV Bucharest, Series A.* – 2009. – Vol. LII. – P. 344-348.

280. Комарова І.Б. Мінливість ознак рижю ярого та створення нового вихідного матеріалу методом хімічного мутагенезу: дис. Комарової І.Б. канд.с.-г. наук: спец. 06.01.05/ Запоріжжя. – 2010. – С. 204.

281. Комарова І.Б., Лях В.О. Генетична мінливість урижю ярого під впливом етил метан сульфонату. Частина 1. Спектр мутацій. Актуальні питання біології, екол. та хім. Запоріжський нац.ун-т. – 2010. – №1. – С. 4-14.

282. Лях В.О., Комарова І.Б. Мінливість кількісних ознак рижю ярого у поколінні МЗ. Бюл. Ін-ту сіл. госп-ва степової зони НААН України, Дніпропетровськ. – 2010. – №. 39. – С. 149-152.

283. Воскресенская Г.С. Биология рыжика в связи с методикой селекции: автореф. дис. Воскресенской Г.С. канд.с.-х. наук: спец. 06.01.05/ Л. – 1949. – С. 10.

284. Яковлева-Носарь С.О., Лях В.О. Мінливість деяких ознак продуктивності генеративної сфери рижю ярого за різних густот сівби. Вісник Запоріжського національного ун-ту. – 2012. – №1. – С. 23-27.

285. Комарова І.Б. Кореляційні зв'язки між господарсько цінними та морфологічними ознаками рижію ярого. Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2013. – № 1. – С. 37-41.

286. Зиман С.М., Мосякін С.Л., Гродзинський Д.М. та ін. Ілюстрований довідник з морфології квіткових рослин. Київ: Фітосоціоцентр. – 2012. – С. 176.

287. Scarth R., Tang G. Modification of *Brassica* oil using conventional and transgenic approaches. Crop.Sci. – 2006. – Vol. 46. – P. 1225–1236.

288. Budin J.T., Breene W.M., Putnam D.H. Some compositional properties of camelina (*Camelina sativa* L.grandz) seeds and oil. J.Am. oil Chem. Soc. – 1995. – Vol. 72, №3. – P. 309–315.

289. Allan A. Plant cell culture. [Plant cell and tissue culture], eds.A. Stafford, G. Warren, Open University Press, Milton Keynes, UK. – 1991. – P. 1–24.

290. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ. – 2014. – С. 247.

291. Verma R., Singh R.R. Regeneration and *in vitro* flowering in *Brassica Campestris* (L.) Var. Bhavani. Our Nature. – 2007. – Vol. 5. – P. 21–24.

292. Dai H., Zhang Z., Guo X. Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledones explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* B ge.var. *major* N. E. Br.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2007. – Vol. 43. – P. 2–8.

293. Vega T.A., Nestares G.M., Pratta G. et al. Biochemical and histological changes associated with *in vitro* responses in sunflower cotyledonary explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2007. – Vol. 43. – P. 415–422.

294. Шиша О.М., Бойчук Ю.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Введення в культуру *in vitro* рижію посівного (*Camelina sativa*). Матеріали міжнародної

наукової конференції присвяченої 75-річчю заснування Національного ботанічного саду ім. Гришка НАНУ «Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках». Київ, 15-17 вересня. – 2010. – С. 627-630.

295. Yemets A.I., Boychuk Yu.N., Shysha E.N., Rakhmetov D.B., Blume Ya.B. Establishment of *in vitro* culture, plant regeneration, and genetic transformation of *Camelina sativa*. *Cytology and Genetics*. – 2013. – Vol. 47, N 3, – P. 138-144.

296. Roussy I., Ahlandsberg S., Jansson C. Transformation and regeneration capacities for five Nordic barley elite cultivars – evaluation of tissue culture response and transient expression. *Hereditas*. – 2001. – Vol. 134. – P. 97–101.

297. Khairunnisa S.F., Zeti-Azura M.B., Noor M.H. et al. Effective hygromycin concentration for selection of *Agrobacterium*-mediated transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Malays. Appl. Biol.* – 2014. – Vol. 43, №1. – P. 119–123.

298. Inan G., Zhang Q., Li P. et al. Salt cress a halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 135. – P. 1718–1737.

299. Chhikara S., Chaudhary D., Yadav M. et al. A non-tissue culture approach for developing transgenic *Brassica juncea* L. plants with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* – 2012. – Vol. 48. – P. 7–14.

300. Liu F., Cao M.Q., Yao L. et al. *In planta* transformation of pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*) by infiltration of adult plants with *Agrobacterium*. *Acta Hortic.* – 1998. – Vol. 467. – P. 187 – 192.

301. Xu H. Wang X., Zhao H., Liu F. An intensive understanding of vacuum infiltration transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*). *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27. – P. 1369–1376.

302. Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X., Armstrong C.L. Invited review: factor influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* – 2004. – Vol. 40. – P. 31–45.

303. Горбатюк І.Р., Бавол А.В., Моргун Б.В. Агробактеріальна трансформація *in planta* пшениці озимого сорту Подолянка та ярого сорту Bobwhite. Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 15. – С. 35–39.

304. Feldman K., Marks M.D. *Agrobacterium* mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet.* – 1987. – Vol. 208. – P. 1–9.

305. Suparthana P., Shimizu T., Nogawa M. et al. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biosci. Bioengi.* – 2006. – Vol. 102, № 3. – P. 162–170.

306. Bent A.F., Kunkel B.N., Dahlbeck D. et al. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science.* – 1994. – Vol. 265. – P. 1856-1860.

307. Bechtold N., Jaudeau B., Jolivet S. et al. The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* – 2000. – Vol. 155. – P. 1875–1887.

308. Dillen W., De Clereq J., Kapila J. et al. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens* method of gene transfer to plants. *Plant J.* – 1997. – Vol. 12. – P. 1459–1462.

309. Salas M., Park S., Srivatanakul M., Smith R. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell rep.* – 2001. – Vol. 20. – P. 701 – 705.

310. Katavic V., Haughn G.W., Reed D., Martin M., Kunst L. *In planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* – 1994. – Vol. 245. – P. 363–370.

311. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., Волохина И.В. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta*. Генетика. – 2006. – Т. 42, № 8. – С. 1083–1088.

312. Матвеева А.Ю., Комисаренко А.Г. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) *in planta* с использованием штамма LBA4404, несущего плазмиду сРНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы. VII международная конференция молодых ученых и специалистов, ВНИИМК. – 2013. – С. 145.

313. Бойчук Ю.М., Баєр О.О., Баєр Г.Я., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Трансформація *Camelina sativa* методом *in planta*. Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 112–116.

314. Бойчук Ю.М., Баєр О.О., Баєр Г.Я., Ємець А.І. Трансформація рижю посівного (*Camelina sativa*) методом *in planta*. Матеріали третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» – м. Київ, 16 – 18 травня. – 2017. – С. 61.