

РОЗРОБКА ЕФЕКТИВНОЇ СИСТЕМИ РЕГЕНЕРАЦІЇ *IN VITRO* ОЗИМОГО РІПАКУ *BRASSICA NAPUS L.* УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

І.С. ГНАТЮК^{1,2}, О.І. ВАРЧЕНКО^{1,2}, М.В. КУЧУК¹, М.Ф. ПАРІЙ^{2,3}, Ю.В. СИМОНЕНКО^{1,2}

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, 03143, Київ, Україна

² ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції», вул. Васильківська, 30, 03022, Київ, Україна

³ Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, 03041, Київ, Україна

E-mail: ignatyuk94@gmail.com

Оптимізовано методику регенерації озимого ріпаку комерційної лінії Вn1. В якості експлантів використовували фрагменти гіпокотилів 6-денних проростків. Регенерація відбувалась шляхом органогенезу на живильному середовищі МС, доповненому 3 мг/л 6-бензиламінопурину та 2 мг/л 2-ізопентиладеніну. Всі отримані рослини-регенеранти успішно вкорінені на безгормональному живильному середовищі та адаптовані до ґрунтових умов. Підібрано умови яровизації, які забезпечили $83,93 \pm 5,33$ % бутонізації та цвітіння. ПЛР аналіз з використанням ISSR 2 та ISSR 15 маркерів показав, що у озимого ріпаку лінії Вn1 не виникає соматоклональна мінливість за використання запропонованої методики. Таким чином, розроблена методика є ефективною та економічно вигідною для отримання біотехнологічних рослин озимого ріпаку.

Ключові слова: озимий ріпак, регенерація, органогенез, регулятори росту, яровизація, соматоклональна мінливість.

Вступ. На сьогоднішній день ріпак посідає одне з провідних місць серед олійних культур, а за обсягами виробництва в Україні поступається лише соняшнику та соєвим бобам. І це не дивно, адже завдяки унікальним властивостям, ріпакова олія використовується в харчовій, лакофарбовій, миловарній, сільськогосподарській та інших галузях промисловості. Крім того, поширеним стало використання ріпакової олії для виробництва біодизелю. Озимий ріпак є важливою сільськогосподарською культурою: він має високий рівень рентабельності, його вирощування є економічно вигідним, з кожним роком обсяги його виробництва та переробки збільшуються.

Із зростанням попиту на насіння ріпаку, а також продукти його переробки, пропорційно росте необхідність отримання нових сортів

рослин цього виду, – високопродуктивних, стійких до біотичних та абіотичних умов середовища, із якісно новими і корисними ознаками.

Добре відомо, що традиційні методи селекції є трудомісткими, часо- та ресурсозатратними. Генетична трансформація та мутагенез ріпаку базується на застосуванні культури тканин *in vitro* та молекулярно-генетичних підходах. Так, досить поширеною є *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація, основана на природній здатності агробактерій передавати рослинній клітині генетичну інформацію. Таким чином вже було здійснено успішну трансформацію модельних [1–3] та деяких комерційних [4–7] сортів ріпаку. Відомо, що ефективність генетичної трансформації залежить в першу чергу від генотипу вихідної рослини, її фізіологічного стану та регенераційного потенціалу. Тому, підбір оптимальних умов регенерації *in vitro* є критично важливим етапом в отриманні трансгенних рослин ріпаку.

Поширеним способом регенерації рослин як в природі, так і *in vitro* є органогенез *de novo*, при якому рослинні експланти спочатку утворюють адвентивні бруньки, а згодом розвивають пагони та коріння [8].

Зазвичай, в якості експлантів для регенерації та трансформації ріпаку використовують сім'ядолі [4, 7, 9], гіпокотилі [3, 10, 11] або фрагменти листя [2, 12]. Однак, при введенні в культуру *in vitro* рослин будь-якого генотипу потрібно враховувати його індивідуальні особливості та підбирати оптимальні експланти для регенерації, склад середовища та умови культивування. Для індукції калюсогенезу та органогенезу використовують такі регулятори росту, як 2,4-дихлорфеноксіацетова кислота (2,4-D), кінетин (Kin), бензиладенін (BA), 6-бензиламінопурин (BAP), α -нафтилоцтова кислота

(NAA) [13]. Більшість протоколів регенерації *in vitro* були розроблені для ярих сортів ріпаку, оскільки озимі лінії виявляють низький регенераційний потенціал та нездатність (англ. — recalcitrance) до трансформації. Крім того, процес отримання фертильних рослин та насіння у рослин озимого ріпаку ускладнений необхідністю проведення яровизації.

При культивуванні рослин *in vitro* досить часто спостерігається соматональна мінливість, яка неприйнятна при роботі з комерційними лініями рослин. Соматональні варіанти можуть бути виявлені за допомогою різних фізіологічних, морфологічних, біохімічних та молекулярних методів [14]. Серед молекулярних маркерів найзручнішими для виявлення генетичної мінливості є мікросателітні тандемні повтори. Ця методика використовує праймери, специфічні до мікросателітів в реакції ПЛР для ампліфікації ISSR (inter simple sequence repeats) послідовностей різного розміру [15].

На сьогоднішній день актуальним залишається пошук ефективної та економічно вигідної системи регенерації саме озимого ріпаку української селекції. Метою роботи було підібрати умови регенерації, вкорінення та адаптації озимого ріпаку *Brassica napus* L. лінії *Bn1* з подальшим отриманням насіння першого покоління.

Матеріали і методи. В роботі використовували насіння лінії *Bn1* озимого ріпаку, яке було люб'язно надане ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції». Лінія *Bn1* характеризується високим вмістом олії, ранньостиглістю та високою врожайністю.

Насіння вводили в культуру *in vitro* методом поверхневої стерилізації за наступною методикою: обробка 70%-вим етанолом — 5 хв., 1,5%-вим розчином гіпохлориту натрію — 20 хв із наступним триразовим відмиванням у стерильній дистильованій воді протягом 5 хв. Після стерилізації насіння висаджували на безгормональне живильне середовище МС [16], доповнене 400 мг/л антибіотику цефтріаксону (Ст) та витримували протягом 24 год у темряві при температурі 24 °С. Далі чашки з насінням культивували ще 5 днів в умовах культуральної кімнати при 16-год фотоперіоді та температурі 24 °С.

Для індукції калусогенезу та регенерації пагонів використовували модифіковану методику [6]. Експлантами слугували сегменти гіпо-

котилів (0,5–1 см) 6-денних проростків ріпаку. Калусні тканини ріпаку отримували на живильному середовищі МС, доповненому 1 мг/л 2,4-D (МСК).

Індукцію органогенезу проводили на живильному середовищі МС, доповненому 4 мг/л ВАР, 5 мг/л AgNO₃ та 2 мг/л одного з наступних регуляторів росту: зеатин (Zea) — середовище МСО1, кінетин (Kin) — МСО2, або 2-ізопентиладенін (2-іР) — МСО3. 2-іР — це природний цитокінін, що регулює поділ, розвиток і метаболізм в рослинах; він слугує попередником синтезу зеатину і в 5 разів дешевший за нього. Через 2–3 тижні культивування, після того, як були сформовані адвентивні бруньки, експланти переносили на середовище МС для регенерації, яке містило 3 мг/л ВАР та 2 мг/л Zea (МСР1), Kin (МСР2) або 2-іР (МСР3). Після формування ювенільних регенерантів, розміром 15 × 20 мм, проводили елонгацію на середовищі МС з половинним вмістом макро- та мікросолей, доповненому 0,1 мг/л ВАР (МСЕ). Вкорінення рослин проводили на безгормональному середовищі МС з половинним вмістом макро- та мікросолей (МСВ). Всі живильні середовища, використані в дослідженні, були доповнені 400 мг/л антибіотику цефтріаксону (Ст). Дослідження проводили у трьох повторностях.

Рослини-регенеранти висаджували в торф'яну суміш та вирощували в умовах теплиці (16-год фотоперіод, 24 °С) протягом 6–8 тижнів. Для яровизації рослини поміщали в клімат-камеру з температурою 4 °С та 8-годинним фотоперіодом на 8 тижнів. Після закінчення яровизації рослини вирощували в умовах теплиці (24 °С, 16-год фотоперіод); утворення бутонів спостерігали через 4–5 тижнів. Для отримання насіння всі бутони накривали поліетиленовими ізоляторами та здійснювали примусове запилення; після висихання стручки зрізали та проводили морфологічний і кількісний аналіз отриманого насіння.

Для визначення соматональної варіабельності в культурі *in vitro* озимого ріпаку, виділяли геномну ДНК перенесених у ґрунт рослин за допомогою СТАВ методу [17] та проводили полімеразну ланцюгову реакцію з праймерами типу ISSR, які дозволяють отримувати декілька різних фрагментів із одного зразка [18]. У да-

ній роботі використовували праймери ISSR 2 та ISSR 15, які застосовувались у дослідженнях поліморфізму рослин роду *Brassica* [19]. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 20 мкл) містила 2 мкл 10-кратного ПЛР-буферу (10×PCR Buffer, «Thermo Fisher Scientific»), 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,5 мкл 10 мМ суміші dNTPs, 0,2 мкл 100 пМ праймера ISSR 2 або ISSR 15, 4 одиниці Taq-полімерази («Thermo Fisher Scientific»), 100 нг зразка ДНК та доводили об'єм суміші деіонізованою водою milli-Q. Ампліфікацію проводили за наступних умов: початкова денатурація (94 °С) – 7 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація при 94 °С – 45 с, відпал праймерів при 44 °С для ISSR 2 або 40 °С для ISSR 15 – 45 с, елонгація при 72 °С – 2 хв), кінцева елонгація при 72 °С – 10 хв. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,5%-вому агарозному гелі. До продуктів ампліфікації додавали 2 мкл 6-кратного буферу для нанесення (DNA Loading Buffer, «Thermo Fisher Scientific»). Електрофорез проводили за постійної напруги 110 В протягом 20 хв у 1 × TBE. Візуалізацію розділених фрагментів здійснювали за допомогою УФ-фотоілюмінатора. Гелеві пластини фотографували цифровою фотокамерою. Довжину фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, «Thermo Fisher Scientific»).

Частоту регенерації обчислювали, як співвідношення числа експлантів, які утворили органи, до загальної кількості експлантів, використаних в досліді. Статистичну обробку результатів виконували за допомогою Microsoft Office Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Дане дослідження проводили з метою розробки економічно вигідної та ефективної методики регенерації озимого ріпаку, яка дозволить отримати повноцінне насіння, ідентичне батьківським формам.

Через два тижні після індукції калусогенезу на живильному середовищі МСК, експланти озимого ріпаку лінії *Vn1* поміщали на середовище МСО1, МСО2 або МСО3 для формування адвентивних бруньок. Виявлено, що експланти утворювали морфогенні осередки з

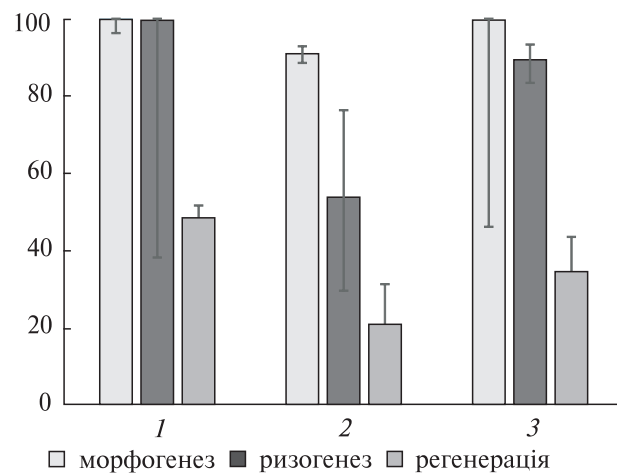


Рис. 1. Частота регенерації озимого ріпаку на регенераційному живильному середовищі МСР, доповненому 3 мг/л ВАР, 400 мг/л Ст та: 1 – 2 мг/л 2-ізопентиладеніну (МСР3); 2 – 2 мг/л кінетину (МСР2); 3 – 2 мг/л зеатину (МСР1)

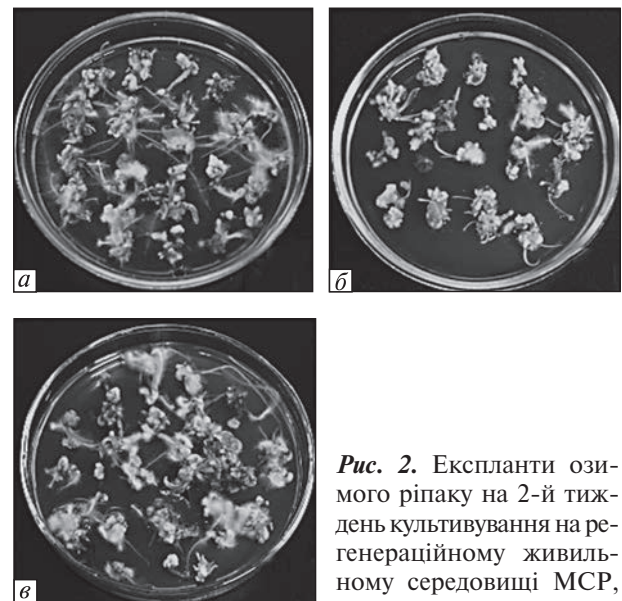


Рис. 2. Експланти озимого ріпаку на 2-й тиждень культивування на регенераційному живильному середовищі МСР, доповненому 3 мг/л ВАР, 400 мг/л Ст та: а – 2 мг/л зеатину (МСР1); б – 2 мг/л кінетину (МСР2); в – 2 мг/л 2-ізопентиладеніну (МСР3)

однаковою частотою на усіх живильних середовищах (МСО1-3). При культивуванні експлантів озимого ріпаку на регенераційних живильних середовищах (МСР1, МСР2, МСР3), спостерігали відмінності в частоті утворення органів.

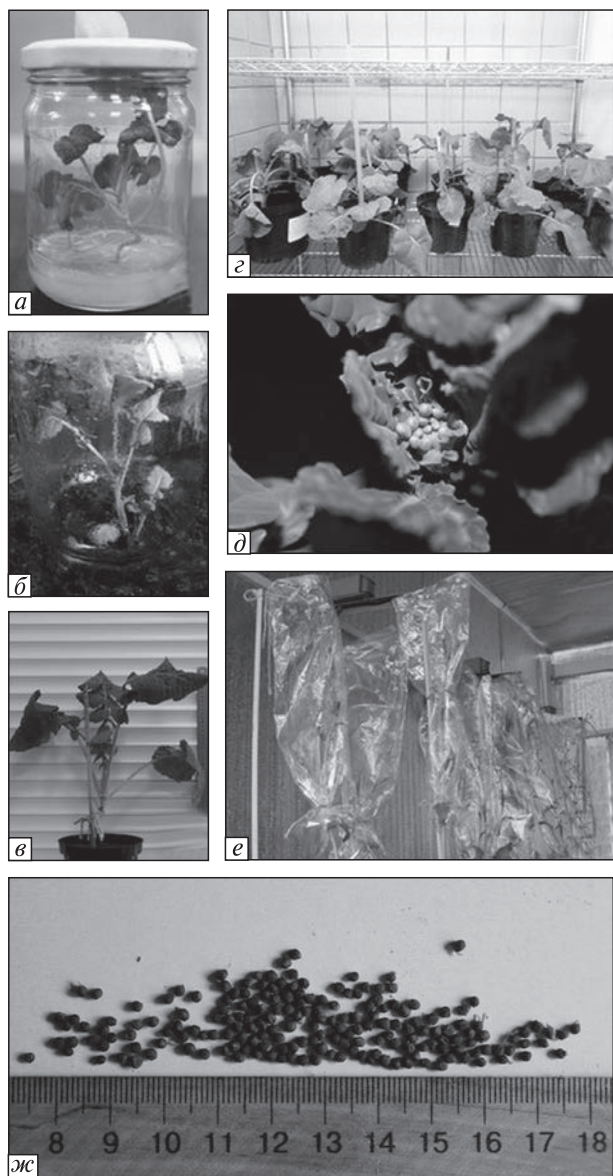


Рис. 3. Схема отримання насіння озимого ріпаку лінії *Bn1*: *a* – рослина-регенерант на живильному середовищі МСВ; *б* – адаптація до ґрунтових умов; *в* – кінець адаптаційного періоду; *г* – яровизація в клімат-камері; *д* – бутонізація яровизованої рослини; *е* – ізоляція та самозапилення; *ж* – насіння покоління F_0

Дану методику відпрацьовували, орієнтуючись на дослідження Rahnama та Sheykhasan [6], де в якості цитокінінів використали ВАР та Zea, а частота трансформації становила 20,2 %. На відміну від Rahnama та Sheykhasan, крім Zea ми використали Kin та 2-іР, в

результаті чого було встановлено, що частота регенерації озимого ріпаку лінії *Bn1* була найвищою на середовищі, доповненому 2 мг/л 2-іР (рис. 1, 2), і становила $48,45 \pm 2,80$ %, в порівнянні з $36,60 \pm 4,52$ % такої на середовищі, доповненому 2 мг/л Zea. Найнижчою частота регенерації була на живильному середовищі, доповненому 2 мг/л Kin ($21,61 \pm 7,37$ %).

В дослідженнях Mashayekhi et al. частота регенерації комерційної лінії ріпаку Licord становила 15,26 % при культивуванні гіпокотилів на живильному середовищі, доповненому 4 мг/л ВАР та 2 мг/л Zea [5].

При тривалому культивуванні на середовищах МСР2 та МСР3 іноді спостерігали вітрифікацію регенованих органів, що є частою проблемою при роботі з культурою тканин *in vitro* [20]. Вітрифікації вдалось позбутися при пересаджуванні на середовище для елонгації пагонів МСЕ. З огляду на це, для індукції органогенезу та регенерації озимого ріпаку більш ефективним та економічно вигідним є використання середовищ МСО3 та МСР3.

За методикою [6] сформовані регенеранти одразу пересаджували на живильне середовище для вкорінення, яке містило половинний склад макро- та мікроелементів МС та 5 мг/л індол-3-масляної кислоти (ІВА). Однак, нами було показано, що така кількість ауксину є критичною і призводить до некрозу тканин озимого ріпаку лінії *Bn1*. Крім того, для формування повноцінних пагонів ми додали етап елонгації на живильному середовищі, доповненому 0,1 мг/л ВАР (МСЕ). Це дозволило отримати повноцінні рослини-регенеранти озимого ріпаку та їх клони.

Для вкорінення рослини пересаджували на живильне середовище МС з половинним вмістом солей, доповнене 0,1 мг/л ІВА або 0,1 мг/л NAA. Але екзогенні регулятори росту пригнічували розвиток сформованих регенерантів, тому рослини були пересаджені на безгормональне живильне середовище (МСВ). Таким чином, всі рослини піддавали спонтанному ризогенезу та відмічали 100%-кове вкорінення.

Після формування кореневої системи на живильному середовищі МСВ (рис. 3, *a*) рослини-регенеранти озимого ріпаку пересаджували в торф'яний субстрат, створювали парниковий ефект і вирощували в умовах теплиці при тем-

пературі 24 °С та 16-год фотоперіоді 4 тижні для їх адаптації (рис. 3, б). Далі рослини яровизували за [21–23]: рослини озимого ріпаку лінії *Bn1* (рис. 3, в) поміщали до яровизаційної камери та вирощували за короткого світлового дня (8 год) при температурі 4 °С впродовж 8 тижнів (рис. 3, г). Успішну яровизацію відмічали за збільшенням міжвузлової відстані у пагонів ріпаку. За таких умов вдалося досягти $83,93 \pm 5,33$ % бутонізації та цвітіння рослин (рис. 3, д, е). З яровизованих рослин було отримане насіння (рис. 3, ж).

Незважаючи на те, що соматональна варіабельність може бути джерелом бажаних ознак (які потім намагаються закріпити в геномі рослини), для трансформації або подальшого культивування в умовах *in vitro* частіше обирають регенеранти, у яких такого явища не спостерігається. В нашій роботі такі зміни є недопустимими, оскільки використовувались комерційні лінії із важливими сільськогосподарськими ознаками, тому будь-яка соматональна варіабельність знижує цінність батьківського генотипу.

Результати ПЛР з використанням ISSR 2 та ISSR 15 маркерів показали, що культивування рослин-регенерантів протягом двох місяців на обраному нами регенераційному живильному середовищі MCP3 з подальшим пасажуванням на MCE та MCB не призводить до утворення соматоклонів у озимого ріпаку (рис. 4, 5), оскільки довжини отриманих фрагментів не відрізняються у контролю (рис. 4 та рис. 5, доріжка K2) та регенерантів (рис. 4 та рис. 5, доріжки 1–9).

Для регенерації ріпаку шляхом органогенезу іноді використовують сім'ядолі [4, 7, 9] і фрагменти листя [2, 12]. Показано, що використання листових експлантів для регенерації і трансформації ярого ріпаку має ряд переваг і забезпечує ефективність трансформації до 70–85 % [12, 24]. Проте, в наших експериментах частота регенерації з таких експлантів була дуже низькою (до 10 %), а процес культивування триваліший і складніший за пропонуваній у даній статті. Натомість, при використанні гіпокотилів в якості експлантів для регенерації ярого ріпаку, констатували частоту регенерації на рівні 50–80 % [1, 3]. При трансформації калюсних культур, отриманих з гіпо-

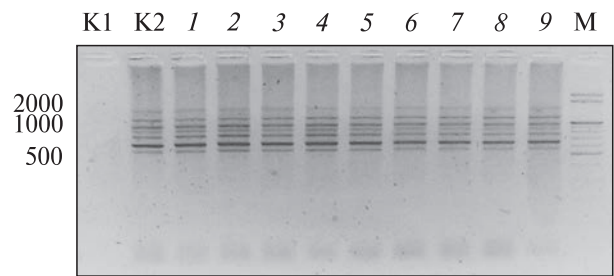


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації з використанням маркера ISSR 2: Доріжки 1–9 – досліджувані зразки озимого ріпаку лінії *Bn1*, отриманого на регенераційному живильному середовищі MCP3; K1 – негативний контроль (milli-Q); K2 – позитивний контроль – ДНК інтактної рослини озимого ріпаку лінії *Bn1*; M – маркер молекулярної маси GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific»)

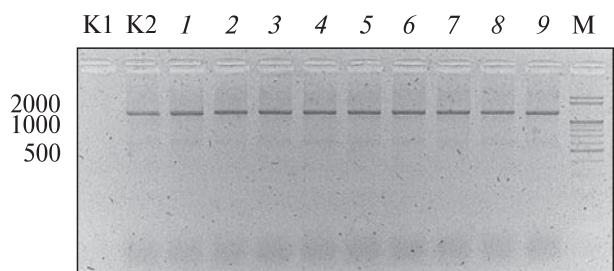


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації з використанням маркера ISSR 15: Доріжки 1–9 – досліджувані зразки озимого ріпаку лінії *Bn1*, отриманого на регенераційному живильному середовищі MCP3; K1 – негативний контроль (milli-Q); K2 – позитивний контроль – ДНК інтактної рослини озимого ріпаку лінії *Bn1*; M – маркер молекулярної маси GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific»)

котилів комерційних ліній ріпаку частота регенерації на селективному живильному середовищі становила від 15,26 [5] до 36,4 % [11]. Але на сьогоднішній день ще не була розроблена система регенерації для озимого ріпаку комерційних ліній, яка включала б етап яровизації та отримання насіння нового покоління.

Таким чином, оптимізована нами система регенерації є економічною, (вимагає використання невеликої кількості доступних регуляторів росту) і ефективною (забезпечує високу частоту регенерації та отримання насіння нульового покоління вже через рік після початку

експериментів), а також не спричиняє генетичних змін у рослинному матеріалі, тому її можна використовувати в подальших біотехнологічних дослідженнях озимого ріпаку зі збереженням цінного генотипу.

DEVELOPMENT OF UKRAINIAN BREEDING WINTER RAPE *BRASSICA NAPUS* L. AN EFFECTIVE *IN VITRO* REGENERATION SYSTEM

I.S. Hnatiuk, O.I. Varchenko, M.V. Kuchuk, M.F. Parii, Yu.V. Symonenko

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, 148 Akademika Zabolotnoho Str., 03143, Kyiv, Ukraine LTD «Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding» (VNIS), 30 Vasylykivska Str., 03022, Kyiv, Ukraine National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15 Heroiv Oborony Str., 03041, Kyiv, Ukraine

The regeneration method of the commercial line Bn1 winter rape was optimized. Hypocotyls fragments of 6-day-old seedlings were used as explants. Regeneration occurred by organogenesis on a MS nutrient medium supplemented with 3 mg/L of benzylaminopurine and 2 mg/L of 2-isopentyladenine. All obtained regenerant plants were successfully rooted in a hormone-free nutrient medium and adapted to soil conditions. The selected vernalization conditions provided 83,93%±5,33% of budding and flowering. PCR analysis using ISSR 2 and ISSR 15 markers showed that somaclonal variation does not occur in winter rape of the Bn1 line while using the proposed technique. Thus, the developed system is effective and economically viable for producing of biotechnological winter rape plants.

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОЙ СИСТЕМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO* ОЗИМОГО РАПСА *BRASSICA NAPUS* L. УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

И.С. Гнатюк, О.И. Варченко, Н.В. Кучук, М.Ф. Парий, Ю.В. Симоненко

Оптимизирована методика регенерации озимого рапса коммерческой линии Bn1. В качестве эксплантов использовали фрагменты гипокотилей 6-дневных проростков. Регенерация происходила путем органогенеза на питательной среде МС, дополненной 3 мг/л бензиламиннопурина и 2 мг/л 2-изопентиладенина. Все полученные растения-регенеранты успешно укоренены на безгормональной питательной среде и адаптированы к почвенным условиям. Подобраны условия яровизации, которые обеспечили 83,93 ± 5,33 % бутонизации и цветения. ПЦП анализ с использованием ISSR 2 и ISSR 15 мар-

керов показал, что у озимого рапса линии Bn1 не возникает соматоклональной изменчивости при использовании предложенной методики. Таким образом, разработанная методика является эффективной и экономически выгодной для получения биотехнологических растений озимого рапса.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Maheshwari, P., Selvaraj, G., and Kovalchuk, I., Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation, *New Biotechnol.*, 2011, vol. 29, no 1, pp. 144–55. doi: 10.1016/j.nbt.2011.06.014.
2. Hoang, T.G., Raldugina, G.N., Regeneration of transgenic plants expressing the GFP gene from rape cotyledonary and leaf explants: Effects of the genotype and ABA, *Rus. J. Plant Physiol.*, 2012, vol. 59: no. 3, pp. 406–12. doi: 10.1134/S1021443712030089.
3. Hussain, S., Rasheed, A., Latif, M., Mahmood, T., and Saqlan Naqvi, S.M., Canola (*Brassica napus* L.) regeneration and transformation via hypocotyl and hypocotyl derived calli, *Sarhad J. Agric.*, 2014, vol. 30, no. 2, pp. 165–72.
4. Bhalla, P.L., Singh, M.B., *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nat. Prot.*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 181–9. doi:10.1038/nprot.2007.527.
5. Mashayekhi, M., Shakib, A.M., Ahmad-Raji, M., and Ghasemi Bezdi, K., Gene transformation potential of commercial canola (*Brassica napus* L.) cultivars using cotyledon and hypocotyl explants, *Afric. J. Biotechnol.*, 2008, vol. 7, no. 24, pp. 4459–63.
6. Rahnama, H., Sheykhasan, M., Transformation and Light Inducible Expression of *cry1Ab* Gene in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.), *J. Sci.*, 2016, vol. 27, no. 4, pp. 313–9.
7. Bates, R., Craze, M., and Wallington, E.J., *Agrobacterium*-mediated transformation of oilseed rape (*Brassica napus*), *Curr. Prot. Plant Biol.*, 2017, vol. 2, pp. 287–98. doi: 10.1002/cppb.20060.
8. Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Twase, A., and Sugimoto, K., Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms, *Development*, 2016, vol. 143, no. 9, pp. 1442–51. doi: 10.1242/dev.134668.
9. Lone, J.A., Gupta, S.K., Wani, S.H., Bhat, M.A., and Lone, R.A., *In vitro* regeneration studies in *Brassica napus* with response to callus induction frequency and regeneration frequency, *Inter. J. Agric., Environ. Biotechnol.*, 2016, vol. 9, no. 5, pp. 755–61. doi: 10.5958/2230-732X.2016.00098.X.
10. Akter, S., Mollika, S.R., Sarker, R.H., and Hoque, M.I., *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Two Varieties of *Brassica juncea* (L.) Using Marker Genes, *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.*,

- 2016, vol. 26, no. 1, pp. 55–65. doi: 10.3329/bjar.v34i2.5802.
11. Liu, X.X., Lang, S.R., Su, L.Q., Liu, X., and Wang, X.F., Improved *Agrobacterium*-mediated transformation and high efficiency of root formation from hypocotyl meristem of spring *Brassica napus* «Precocity» cultivar, *Genet. Mol. Res.*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 16840–55. doi: 10.4238/2015.
 12. Hocheva, E.A., Sakhno, L.O., and Kuchuk, M.V., Method for producing transformed rape plants by method of agrobacterial transformation: Patent for utility model 39205 Ukraine. No u200811768 applied on 03.10.2008, published on 10.02.2009, bulletin № 3.
 13. Ravanfar, S.A., Orbovic, V., Moradpour, M., Abdul Aziz, M., Karan, R., Wallace, S., and Parajuli, S., Improvement of tissue culture, genetic transformation, and applications of biotechnology to *Brassica*, *Biotechnol. Genet. Engineer. Rev.*, 2017, vol. 33, no. 1, pp. 1–25. doi:10.1080/02648725.2017.1309821.
 14. Bairu, M.W., Aremu, A.O., and Staden, J., Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods, *Plant Growth Regulation*, 2010, vol. 63, no. 2, pp. 147–73. doi: 10.1007/s10725-010-9554-x.
 15. Reddy, M.P., Sarla, N., and Siddiq, E.A., Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, *Euphytica*, 2002, vol. 128, pp. 9–17. doi: 10.1023/A:1020691618797.
 16. Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, pp. 473–97.
 17. Rogers, S.O., Bendich, A.J., Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi, *Plant Mol. Biol. Man.*, 1994, pp. 183–90. doi: 10.1007/978-94-011-0511-8_12.
 18. Godwin, I., Aitken, E., and Smith, L., Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics, *Electrophoresis*, 1997, vol. 18, no. 9, pp. 1524–8. doi: 10.1002/elps.1150180906.
 19. Mahjooba, B., Zarinib, H.N., Hashemia, S.H., and Shamasbia, F.V., Comparison of ISSR, IRAP and REMAP Markers for Assessing Genetic Diversity in Different Species of *Brassica* sp., *Russ. J. Genet.*, 2016, vol. 52, no. 12, pp. 1272–81. doi:10.1134/s1022795416120073.
 20. Debergh, P.C., Zimmerman, R.H., *Micropropagation: Technology and Application*, Dordrecht: Kluwer Academic, 1991.
 21. Savelieva, E.M., Tarakanov, I.G., Control of flowering in canola plants with various response to photoperiodic and low-temperature induction, *Izvest. Timiryaz. Agric. Acad.*, 2014, vol. 2, pp. 57–68.
 22. Filek, M., Koscielniak, J., Macháčková, I., and Krekule, J., Generative development of winter rape (*Brassica napus* L.) – The role of vernalization, *Inter. J. Plant Develop. Biol.*, 2007, vol. 1, no. 1, pp. 57–63.
 23. Waalen, W.M., Stavang, J.A., Olsen, J.E., and Rognli, O.A., The relationship between vernalization saturation and the maintenance of freezing tolerance in winter rapeseed, *Environ. Exper. Bot.*, 2014, vol. 106, pp. 164–73. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.02.012.
 24. Sakhno, L.A., Gocheva, E.A., Komarnitskii, I.K., and Kuchuk, N.V., Stable Expression of the Promoterless *bar* Gene in Transformed Rapeseed Plants, *Cytol. Genet.*, 2008, vol. 42, no. 1, pp. 21–8. <https://doi.org/10.1007/s11956-008-1003-7>.

Надійшла в редакцію 09.01.20
Після доопрацювання 28.02.20
Прийнята до друку 18.07.20