

МОБІЛЬНІ ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ РОСЛИН ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ В ГЕНЕТИЦІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ



Огляд присвячено використанню мобільних генетичних елементів рослин в генетико-біотехнологічних дослідженнях. Коротко розглянуто загальні відомості про транспозони та їх можливу роль в еволюційних процесах. Значну увагу приділено питанню використання трансгенних рослин як гетерологічних господарів транспозонів для вивчення процесів транспозиції та клонування генів. Показано можливі шляхи використання мобільних генетичних елементів рослин у біотехнології.

Загальні відомості про мобільні генетичні елементи. Мобільні генетичні елементи, або транспозони, вперше були відкриті у кукурудзи (*Zea mays*) McClintock в 1947 р. та названі контролюючими [1]. Ці генетичні одиниці здатні пересуватися по геному, і досить часто їх активність може бути виявленою фенотипово при інтеграції в ген. Зазвичай такі інсерційні мутації соматично нестабільні, тому вирізання елемента з локусу відновлює активність гена в певній клітині та в її нащадків. Присутність транспозонів проявляється у вигляді строка-тих фенотипів, які було знайдено в багатьох життєвих форм. Після відкриття мобільних елементів у *Escherichia coli* стало очевидним, що вони є природними компонентами більшості геномів [2]. В подальшому ці елементи були виявлені в усіх досліджуваних організмах [3]. Види з великими та складними геномами можуть містити до 78 % транспозонів у ядерному геномі [4]. Часто саме активність транспозонів спричиняє таке поширене явище, як соматональна мінливість [5].

Використання методів молекулярної біології дозволило відкрити у геномах рослин величезну кількість мобільних елементів, які неможливо було виявити за допомогою методів традиційної генетики [6]. Здавалося б така величезна кількість транспозонів повинна швидко дезорганізувати геном, однак цього не відбувається. Дослідження геномів рослин, зроблені останнім часом, показали, що структура генів досить консервативна. Цей феномен можна пояснити тим, що в більшості випадків транспозони знаходяться у рослинах в неактивному стані й активізуються при стресових впливах (іонізуюче випромінення [1, 7], умови культивування *in vitro* [5], інфекція патогенами [8]).

Існує ряд протилежних думок щодо ролі мобільних елементів у процесах еволюції. Досі не виявлено прямої позитивної ролі транспозонів у підвищенні життєздатності окремих особин, але деякі вчені припускають їх значний внесок у процес еволюції: вплив мобільних елементів на геноми рослин полягає в створенні різноманітних геномних перебудов, що дає первинний матеріал для еволюційного процесу.

Транспозони можуть призводити до зміни структури і механізмів регуляції окремих генів та перебудови геномів шляхом транспозиції (інсерції, ексцизиї) [9], хромосомного розриву

[10], альтернативної транспозиції [11], внутрішньохромосомної гомологічної [12] чи ектопічної рекомбінації [3]. Делеції, інверсії, транслокації та дуплікації генів, які при цьому виникають, створюють первинний матеріал для еволюції. Ще McClintock [1] припускала, що основною роллю транспозонів в еволюції є створення ресурсу гіпермутагенності в стресових умовах, що веде до виникнення в популяції особин, здатних вижити, коли основна частина популяції гине.

Хромосомні перебудови вважають одним з основних механізмів еволюції рослинного геному. В роботі Raskina et al. [13] за допомогою флуоресцентної *in situ* гібридизації було виявлено причетність *En/Spm*-подібних елементів у *Aegilops speltoides* до хромосомних перебудов і, відповідно, до створення нових фертильних геномних форм у малих, ізольованих периферійних популяціях. Була виявлена приуроченість транспозонів до гарячих точок хромосомних перебудов. Дослідниками була показана асоціація між кластерами рибосомної ДНК та *En/Spm* транспозонами, а також їх здатність до спільного переміщення по геному.

Друга група дослідників вважають транспозони генетичним тягарем, егоїстичною ДНК, тобто такою, яка не несе ніякої користі для виду-господаря. Однак існує третій погляд на цю проблему. Гени геному розділені на дві групи: мутації в першій групі «заборонені» (летальні або ведуть до стерильності), мутації в другій (варіабельній) ведуть до створення значного різноманіття. Таким чином, вплив транспозонів на першу групу генів буде негативним, і мобільні елементи вестимуть себе, як «егоїстична» ДНК, тоді як потрапляючи до другої групи, вноситимуть вклад в еволюційні процеси. Детально це питання розглянуто в оглядах Bennetzen [3], Fedoroff [6] та Lonngig et al. [14].

В цілому виділяють два основних класи транспозонів. До першого класу належать ретротранспозони, які переносяться за допомогою РНК-копії. Їх в свою чергу поділяють на ретровірусподібні елементи та невірусні ретротранспозони. Ретровірусподібні елементи характеризуються тим, що вони фланковані довгими кінцевими повторами (long terminal repeats — LTRs). До них відносять *BsI* елемент у кукурудзи. Невірусні ретротранспозони ото-

чені полі(А)залишками різної довжини (до них належить *Cin4* елемент, також виділений із кукурудзи). Кодуючі ділянки *BsI* та *Cin4* елементів мають гомологію з вірусною зворотною транскриптазою [2]. До другого класу відносять елементи, які транспозуються шляхом вирізання та переносу ДНК і містять кінцеві інвертовані повтори (terminal inverted repeats — TIRs), розташовані безпосередньо біля ділянок ДНК, що кодують необхідні для транспозиції білки.

Окрім згаданих двох основних класів, нещодавно було відкрито нову групу транспозонів, названу MITE (miniature inverted-repeat transposable elements — транспозони з мініатюрними інвертованими повторами). Ця група транспозонів має риси, характерні як для першого, так і для другого класів, а механізм їх транспозиції досі невідомий. До MITE відносять такі мобільні елементи, як *Tourist* та *Stowaway*, які було знайдено в інтронах, а також вище 5' та нижче 3' ділянок багатьох генів значної кількості вищих рослин [15].

У кукурудзи, яка є одним з видів, де найкраще досліджено гомологічні транспозони, відомо близько десяти систем мобільних генетичних елементів. Серед них найбільший внесок в розуміння молекулярних механізмів процесу транспозиції дали дві системи — *En/Spm* (*Enhancer/Suppressor-mutator*) та *Ac/Ds* (*Activator/Dissociator*) [2].

Використання трансгенних рослин як гетерологічних господарів транспозонів для дослідження процесів транспозиції та клонування генів. Для дослідження активності транспозонів досить зручним є їх перенесення в клітини інших видів (гетерологічна система експресії), оскільки при дослідженні їх активності в геномі господаря (гомологічна експресія) можлива присутність надлишкових копій мобільного елемента, що ускладнює подальший аналіз. Перелік видів, у які вводили гетерологічні мобільні елементи, представлено у таблиці.

При дослідженні процесів транспозиції найбільш зручними виявилися штучно створені системи мобільних генетичних елементів, які, крім власне мобільних елементів (як автономних, так і неавтономних), включали певні селективні та репортерні гени. Останні полег-

Активність мобільних генетичних елементів у гетерологічних рослинах-господарях

Гетерологічна рослина	Фаза розвитку рослини при аналізі активності транспозону	Метод аналізу	Частота ексізиї, %	Інтеграція	Посилання
<i>Ac/Ds</i>					
Пшениця (<i>Triticum aestivum</i>)	Соматична	Мол., GUS	0,56–0,98	Немає	16
Ячмінь (<i>Hordeum vulgare</i>)	Соматична	Мол.	22,2–60,0	+	17
	Нашадки	Мол.	1,5	+	
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	Соматична	Мол., HPT	19,0	+	18
	Соматична	Мол., GFP	15,0–50,0	+	19
Томат (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Соматична	Мол.	81,8	+	20
	Нашадки	Мол.	30,0	+	21
	Нашадки	Мол., BAR	24,0–37,0	+	22
	Нашадки	Мол., GUS, HPT	13,5	+	23
	Нашадки	Мол., LUCA	60,0–75,0	НД	24
Картопля (<i>Solanum tuberosum</i>)	Соматична	Мол., NPTII	50,0	+	25
	Соматична	Мол., HPT	НД	+	26
Дурман (<i>Datura innoxia</i>)	Соматична	Мол., NPTII	25,0	+	27
Ріпак (<i>Brassica napus</i>)	Нашадки	Мол., ALS	0,2	+	28
Капуста-броколі (<i>Brassica oleracea</i> var. 'Italica')	Нашадки	Мол., SPT	65,0	+	29
Тютюн (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Соматична	Мол.	44,0	+	30
	Соматична	Мол., HPT	30,0	+	31
Тютюн (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)	Нашадки	Мол.	6,3	+	32
Морква (<i>Daucus carota</i>)	Соматична	Мол.	28,0	+	33
Арабідопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Соматична	Мол.	50,0	+	33
	Соматична	Мол., SPT	25,0	+	34
	Нашадки	Мол., SPT	0,4	+	
Льон (<i>Linum usitatissimum</i>)	Нашадки	Мол., GUS	3,6	+	35
Петунія (<i>Petunia hybrida</i>)	Соматична	HPT	30,0	НД	31
Латук (<i>Lactuca sativa</i>)	Нашадки	Мол.	Немає	Немає	36
	Соматична	Мол., NPTII	42,0–82,0	+	
<i>En/Spm</i>					
Тютюн (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Нашадки	Мол., GUS	1,3	+	37
		Мол., BAR	10,1	+	
	Соматична	GUS	до 56,0	+	38
Картопля (<i>Solanum tuberosum</i>)	Соматична	Мол.	НД	+	39
Арабідопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Нашадки	Мол., NPTII	7,8–29,2	+	40
	Нашадки	Мол.	5,0–40,0	+	41
	Нашадки	Мол., GUS	0,0006–4,7	+	42
	Соматична	Мол., GUS	7,8–100,0	+	43
Оригофрагмус (<i>Orychophragmus violaceus</i>)	Соматична	Мол., GUS	54,5	+	44
Люцерна (<i>Medicago truncatula</i>)	Соматична	Мол., GUS	6,6	+	43
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	Соматична,	Мол., GUS	20,0–80,0	+	45
	нашадки				
Соматичний гібрид гірчиці сарептської та арабідопсису (<i>Brassica juncea</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>)	Соматична	GUS	56,2	+	46
Соматичний гібрид оригофрагмусу	Соматична	GUS	100,0	+	47

Продовження таблиці

Гетерологічна рослина	Фаза розвитку рослини при аналізі активності транспозону	Метод аналізу	Частота ексцизії, %	Інтеграція	Посилання
та арабідопсису (<i>Orychophragmus violaceus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>) Соматичний гібрид ріпаку та арабідопсису (<i>Brassica napus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>)	Соматична	GUS	72,2	+	48
		<i>Tam3</i>			
Тютюн (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Соматична	Мол., GUS, HPT	13,0–65,0	+	31
Петунія (<i>Petunia hybrida</i>)	Соматична	GUS, HPT	13,0–30,0	НД	31
		<i>Tag1</i>			
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	Соматична	Мол., GUS	36,4	+	49
Тютюн (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Соматична	Мол., GUS	НД	НД	50
		<i>Tip100</i>			
Тютюн (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Соматична	Мол., GUS	100,0	+	51
		<i>Mu 1</i>			
Арабідопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Соматична	Мол.	Немає	—	52

Примітки. *Tag1* — транспозон з *Arabidopsis thaliana*; *Tip100* — транспозон з іпомеї пурпурної (*Ipomoea purpurea*); НД — не досліджували; Мол. — молекулярно-біологічні дослідження; HPT, BAR, SPT, NPTII, ALS, GUS, GFP, LUC — дослідження експресії відповідних селективних та маркерних генів (гігроміцинофосфотрансферази, фосфінотрицинацетилтрансферази, стрептоміцинофосфотрансферази, неоміцинофосфотрансферази II, ацетолактатсинтази, β-глюкуронідази, зеленого флуоресцентного білка, люциферази).

шували моніторинг активності транспозонів. Транспозиція включає ексцизію мобільного елемента та реінтеграцію його у нове геномне оточення. Вона може відбуватися як у соматичних тканинах, так і клітинах зародкової лінії. В першому випадку утворюються сектори тканини, які характеризуються новими інсерціями елемента, тоді як транспозиція у клітинах гаметофіту успадковується усіма клітинами нащадків.

Відповідно, оцінку активності транспозонів, зазвичай, проводять за двома параметрами: визначаючи ексцизію у соматичних тканинах (соматична ексцизія) або у зародкових клітинах (гермінальна ексцизія — від англ. *germinal excision*). Соматичну ексцизію виявляють фенотипово у вигляді строкатого забарвлення тканин організму після спеціальної обробки (гістохімічного виявлення активності β-глюкуронідази [31]) або без неї (з використанням, наприклад, клітинно-автономного селектив-

ного маркера стрептоміцину, який дозволяє виявляти ексцизію у вигляді стійких до антибіотика зелених секторів [34]). У соматичних тканинах досить складно визначити кількісно точну частоту ексцизії транспозону [39]. Соматична ексцизія дозволяє виявити відмінності в активності транспозону на рівні окремих особин [34], показує час ексцизії.

Гермінальна ексцизія при дослідженні проявляється у однорідному забарвленні і показує, що в усіх тканинах даного організму відбулося переміщення транспозону з первинного положення. Гермінальну ексцизію досить легко підраховувати серед нащадків первинного трансформанту. Однак точність досліджень, в яких для порівняння використовують частоту гермінальної ексцизії, страждає від того, що на результат сильно впливає час ексцизії. Одна рання ексцизія може привести до утворення більшої кількості нащадків, які її успадкують, ніж велика кількість незалежних пізніх ексцизій [34].

Час активації мобільних елементів значно залежить від промотора, під яким знаходиться транспозаза. Так, активація *En/Spm*-подібних елементів у *Aegilops speltoides* при експресії під власним промотором була виявлена у мейозі під час чоловічого гаметогенезу [13]. При використанні 35S промотора транспозиція проходила протягом усього періоду онтогенезу рослин: починаючи від кількох днів після запилення і закінчуючи транспозиціями у окремих гаметах [40].

Кількість транспозиційних подій, які буде перенесено до наступного покоління, є важливим показником при визначенні придатності мобільного елемента для інсерційного мутагенезу та експериментів з мічення та клонування генів. Для *Ac* елемента у кукурудзи цей показник становить 1–10 % (цит. по [34]), тоді як у гетерологічних видів частота гермінальної ексцизії коливається від 0,4 до 80,0% (таблиця). Частота гермінальної ексцизії *En/Spm* у кукурудзи становить декілька відсотків, але може іноді підвищуватися при попаданні у певні алелі (до 80 % у *alm1(pa-pu)* 57% (цит. по [37])). Частота гермінальної ексцизії при транспозиції цього елемента у гетерологічних видів становила до 80,0 % у рису та 40% у *Arabidopsis thaliana* (таблиця).

В ряді досліджень було виявлено, що частота транспозиції значною мірою залежить від розміру мобільного елемента, зокрема наявності гена-вставки. Було показано, що присутність у *dSpm* елементі послідовностей, не споріднених з *En/Spm*, не анулює його здатність до транспозиції [37]. Однак Cardon [37], Tissier [42] і d'Erfurth [43] показали, що присутність генів *aadA*, *bar*, *DHFR* у *dSpm* знижувала на порядок ефективність транспозиції порівняно з немодифікованим *dSpm* елементом, природним похідним *En/Spm* з внутрішньою делецією.

Цікаво, що була зазначена різниця у співвідношенні між транскриптами (продуктами альтернативного сплайсингу первинного транскрипту) у різних видів. Так, у кукурудзи найпоширенішим є *trpA* транскрипт, тоді як у картоплі він є мінорним продуктом, а основним — *trpB*. Можлива причина цього — аберантний сплайсинг генів однодольних у видах, що належать до класу дводольних [39]. Було

показано, що сплайсинг *En/Spm* у однодольних (*Zea mays* та *Oryza sativa*) і дводольних (*Nicotiana tabacum* та *Arabidopsis thaliana*) проходить за дещо різними механізмами [45].

Ефективність транспозиції залежить від особливостей геному кожного досліджуваного виду. Було показано, що у ряду видів (*Oryza sativa* [45], *Medicago truncatula* [43]) активність привнесених мобільних елементів невисока і проявляється лише на ранніх стадіях культивування *in vitro*. Було висунуто припущення, що відмінності між рівнями активності транспозонів у різних видах пов'язані з присутністю у геномі виду-господаря власних мобільних елементів. У *A. thaliana*, геном якого майже не містить транспозонів, було показано значну активність транспозиції, тоді як види, для яких характерна велика кількість ендегенних мобільних елементів, зазвичай характеризуються не дуже високим рівнем транспозиції гетерологічних мобільних елементів. Можливо, цим видам притаманні ефективні механізми сайленсингу (мовчання генів), які спроможні попередити поширення нових мобільних елементів [43].

Мобільні елементи широко використовуються як інсерційні мутагени у функціональній геноміці, чому сприяє можливість використання їх послідовностей як молекулярних проб для прямого клонування мутованих генів. Для *Ac/Ds*, *En/Spm*, *Tam3* та *Tag1* елементів була показана здатність до ефективної транспозиції у ряду видів (таблиця), включаючи такі модельні види, як *A. thaliana* та *N. tabacum*. В дослідженнях по міченню та клонуванню генів використовували як види з високоактивними ендегенними системами (кукурудза (*Zea mays*) [54], ротики садові (*Antirrhinum majus*) [55]), так і ті, в які гетерологічні мобільні елементи кукурудзи вводили шляхом трансформації (*A. thaliana* [56], тютюн (*N. tabacum*) [37], *N. plumbaginifolia* [32]).

Транспозоновий мутагенез має ряд переваг перед тим, який проводиться за допомогою Т-ДНК агробактерій: непотрібним стає створення величезної кількості незалежних трансформантів, крім того, можливе отримання ревертантів при реактивації транспозону, що має значення для підтвердження того, що ген було марковано.

Методи транспозонового мутагенезу розвивалися і вдосконалювалися поступово. Перші спроби клонування генів з використанням транспозонів як інсерційних мутагенів та міток були зроблені на гомологічних видах-господарях, таких як кукурудза (*Zea mays*) [54] та ротики (*Antirrhinum majus*) [55]. В той же час існування багатьох видів, у яких не були знайдені ендегенні мобільні елементи, вимагало вдосконалення методів для того, щоб мати можливість клонувати гени цих видів.

Вперше можливість транспозиції гетерологічного транспозону *Ac* була показана Baker et al. [30] на тютюні, що започаткувало велику кількість досліджень (таблиця). Перші спроби полягали у введенні клонованих з кукурудзи немодифікованих транспозонів. Однак попри перші успіхи з тютюном, де елемент мав високу активність, для багатьох видів характерною була низька частота транспозиції. Не було зручного методу для селекції рослин з переміщеними транспозонами. Нові мутації було важко ідентифікувати у поліплоїдних видів. Тому було зроблено ряд удосконалень, які дозволили застосовувати транспозонові системи на будь-яких видах. Першим удосконаленням при розробці ефективної транспозонової системи було введення зручних маркерних генів, які дозволили відслідковувати і відбирати транспозиційні події. Транспозон у цій системі був розміщений у області, що не трансклюється, між промотором і власне маркерним геном. Транспозиція призводить до експресії гена. Для візуалізації процесу транспозиції як маркерні застосовували гени β -глюкуронідази та стійкості до антибіотиків і гербіцидів (таблиця). Ефективність таких конструкцій показана у роботі Yang [36]. Автори вважають, що частота транспозиції *Ac/Ds* системи у латуці була дуже низькою, оскільки конструкції, в яких не було генів для селекції ексцизиї, не дозволили виявити жодного явища транспозиції. При використанні конструкцій, які дозволяли проводити селекцію ексцизійних подій, частота ексцизиї мобільного елемента *Ac* у латуці становила від 42,0 % (*Ac*) до 82,0% (*Ds*) (таблиця).

Більшість маркерних генів не є клітинно-специфічними (гени стійкості), або методи виявлення їх активності деструктивні для росли-

ни (ензиматичний тест на виявлення активності β -глюкуронідази), що перешкоджає отриманню регенерантів з незалежними транспозиціями з однієї рослини-трансформанта. Клітинна специфічність деяких генів (*spt*) може змінюватися залежно від виду і навіть фази розвитку рослини (у *Brassica oleracea* var. *italica* він є клітинно-специфічним лише для калюсів, але не диференційованих пагонів, на відміну від тютюну і арабідопсису [34, 29]). Однак у літературі існують повідомлення про те, що були розроблені системи прижиттєвого виявлення соматичної ексцизиї у трансформантах з використанням генів *gfp* (зеленого флуоресцентного білка медузи) [19] або *LucA* люциферази світляка [24]. Ці методи дозволяють отримувати лінії з незалежними транспозиційними подіями з єдиної трансформованої рослини у тих видів, де транспозони мають високу активність у соматичних тканинах і можлива регенерація з цих тканин.

Подальші удосконалень полягали в застосуванні двокомпонентних систем транспозонів, де неавтономний елемент (*Ds* або *I/dSpm*) використовують як транспозон-мітку, тоді як автономний елемент (*Ac* або *Spm*) надає транспозазу. Іноді для полегшення подальших аналізів автономний елемент модифікують таким чином, що він діє тільки як джерело транспозазу і не здатний до власного переміщення. Для цього, як правило, делетують один з кінцевих повторів елемента.

Двокомпонентні системи мають переваги перед однокомпонентними.

1. У неавтономний елемент може бути введений селективний ген, який майже не впливає на активність транспозону, але дозволить селекцію присутності мобільного елемента у геномі рослин (оскільки реінсерція відбувається не завжди), швидку ідентифікацію потомства, що несе вставку транспозону, та виявить косегрегацію транспозону і мутантного фенотипу у нащадків (перший крок при доведенні того, що ген марковано).

2. При клонуванні генів джерело транспозазу і сам транспозон можуть бути розділені при сегрегації, транспозон у цьому випадку стабілізується. Стабільний транспозон може бути використаний як мітка при клонуванні мутантного гена. Крім того, стабілізація транспо-

позону попереджає мутації генів внаслідок утворення так званих «footprints», послідовностей з кількох пар нуклеотидів, які залишаються на попередньому місці розташування транспозону після його переміщення. Гени з такими мутаціями неактивні, але їх неможливо клонувати через те, що вони не марковані транспозоном. В цьому полягають переваги використання неавтономного елемента двокомпонентної системи перед автономним, який створює нестабільні мутації, бо може переміщуватися.

Ще одним удосконаленням було використання сильних промоторів для гена транспозази (p35S, pNOS). Використання 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти привело до посилення експресії транспозази та, відповідно, до зростання частоти транспозиції. Більш детально питання транспозонового мутагенезу розглянуто в огляді Sundaresan [57].

Мобільні генетичні елементи вводили до гетерологічних видів за допомогою різноманітних методів генетичної трансформації (як правило, агробактеріальної, з використанням *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*, іноді прямої [27, 32]). Використання методу прямої трансформації при введенні гетерологічних транспозонів має ряд недоліків: 1) вбудовується більше однієї копії Т-ДНК, що ускладнює молекулярний аналіз; 2) можливе вбудовування пошкодженої Т-ДНК, що приведе до експресії маркерного гена при відсутності транспозиції; 3) можлива гомологічна рекомбінація [27]. Нами був запропонований метод введення гетерологічних транспозонів до видів, які важко трансформувати, шляхом соматичної гібридизації раніше трансформованого виду-донора транспозону з видом-реципієнтом [46–48]. Ефективність використання цього методу потребує подальших досліджень.

Необхідною умовою для клонування генів за допомогою мобільних елементів є можливість контролю за процесом транспозиції. Як низька, так і занадто висока частота транспозиції небажані, оскільки в першому випадку потрібно буде докласти значних зусиль для отримання інсерційних мутантів, а в другому — велика кількість копій та постійне їх переміщення значно ускладнять можливість молекулярного аналізу та інтерпретації даних [33].

Існує зворотна залежність між рівнем метилювання цитозину геномної ДНК і активністю мобільних елементів [58]. Активність транспозонів зростає на ранніх етапах розвитку рослин, коли відбувається стирання і перенастроювання структури метилювання геному [29, 59, 60]. Продовження часу гіпометилювання може значно збільшувати частоту транспозиції, що може бути корисним в деяких випадках при міченні транспозонами генів для їх подальшого клонування. Kohli et al. [60] було показано, що частота транспозиції мобільного елемента *Ac* у рослинах рису, вирощених з безпосередньо пророщеного насіння, була у 9 разів нижчою, ніж у рослинах, отриманих після проходження насінням стадії дедиференціювання (калюсні культури *in vitro*) і подальшої регенерації. Крім того, частота транспозиції у незчеплені сайти була значно вищою у рослин, отриманих з калюсних ліній.

Досить часто здатність до транспозиції залежить від місця розташування на хромосомі. Позиційний ефект впливає на стан метилювання кінців елемента, а не на активність транспозази. Метилювання ДНК кінців елемента, яке залежить від хромосомної локалізації, пригнічує ексцизійну активність. У тих випадках, коли мобільні елементи представлені в геномі рослин рядом незалежних копій з ідентичною структурою, але різною локалізацією, їх здатність до транспозиції може відрізнитися між копіями в 100 разів [61].

Останнім часом для можливості контролю часу транспозиції при транспозоновому міченні генів була розроблена система *INAc* (від *inducible activator*) з використанням індукбельних промоторів (таких як PR-1a промотор, що індукується саліциловою кислотою) [62].

В роботі van Enckwort et al. [26] був запропонований цікавий підхід для отримання великих популяцій високогетерозиготних рослин з незалежними інсерціями транспозону без проходження генеративної стадії. Проблема одержання таких популяцій актуальна для картоплі, плодових дерев та ряду інших. Дослідники використали переваги методу культивування протопластів для відбору і подальшої регенерації з окремих клітин рослин із соматичними транспозиціями, придатних для клонування

генів. Такий підхід дозволив отримати численне потомство від поодиноких трансформантів, зберігаючи при цьому їх вихідний генотип.

Mckenzie et al. [29] також використали переваги методів культури *in vitro* для підвищення виходу рослин з гермінальними ексцизіями у видів, де активність мобільних елементів низька. В їх досліді лише застосування етапу калюсоутворення та регенерації пагонів у селективних умовах дозволило отримати гермінальні ексцизії у *Brassica oleracea* var. *Italica*. Їх успіх можна пояснити підвищенням активності транспозону при дедиференціюванні та впливом селективного тиску під час регенерації.

Використання *En/Spm* мобільного елемента для масового отримання мутантів, зокрема у *A. thaliana*, виявилось перспективним [56]. Родина *Spm* елементів, на відміну від *Ac/Ds* [34], характеризується транспозицією в інтервалі близько 50 сМ у слабко або взагалі незчеплені локуси [45]. У *A. thaliana* було показано, що частота транспозиції *Spm* у незчеплені локуси становила 8—20 % [42]. Для *Ac* елемента характерним є переміщення переважно у сайти однієї групи зчеплення, хоча можливість переміщення у незчеплені локуси не виключена [22, 63]. Ця особливість *Ac* елемента корисна тоді, коли завданням є насичення певної ділянки геному навколо сайту первинної інсерції. Однак вона зовсім не підходить, коли необхідне отримання інсерцій по всьому геному [60].

Wfiza et al. [22] виявили, що в геномі рослин хромосоми поділяються на дві групи: ті, в яких транспозиція мобільних елементів відбувається переважно у незчеплені локуси, та ті, що не мають такої переваги. Було висунуто припущення, що транспозиція у незчеплені локуси може бути пов'язаною з наявністю хромосомних територій. Тому транспозиція між двома близько розташованими хромосомами буде відбуватися з більшою ймовірністю, ніж між віддаленими [63].

Для *Ac* було показано, що транспозиція відбувається переважно у активно транскрибовані ділянки геному, що є зручним при процедурі клонування генів, оскільки потрібна менша популяція рослин [19, 60].

В роботі Stuurman et al. [23] було продемон-

стровано, що транспозиція мобільних елементів відбувається в межах кластерів по 10—50 т.п.н., що розділені ділянками розміром 60—100 т.п.н. Наявність зон переважного переміщення дозволяє припустити, що є диференційний доступ транспозону до ДНК з різним упорядкуванням хроматину. Тому існує реальна загроза того, що деякі гени буде складно мітити за допомогою мобільних елементів.

Поведінку мобільного елемента неможливо заздалегідь достовірно передбачити не тільки у новому виді-господарі, а навіть на різних стадіях розвитку рослини [35]. Тому при використанні транспозонів для клонування генів у нового виду необхідним етапом є попереднє тестування активності мобільного елемента саме у ньому.

Транспозони як інструмент біотехнологічних досліджень. Основне завдання біотехнології рослин полягає у поліпшенні вже існуючих та створенні нових елітних сортів культурних рослин. Для цього є необхідною розробка методів, які б дозволяли точно маніпулювати рослинними геномами та окремими генами. Останніми роками зусилля були зосереджені на деяких напрямках, зокрема: 1) клонуванні нових генів з рослинних геномів, які в подальшому можна буде вводити до сортів, що становлять інтерес; 2) видаленні селективних та маркерних генів із трансгенних рослин [64].

Використання транспозонів є перспективним підходом для досягнення цих завдань. Застосування мобільних генетичних елементів при міченні та клонуванні генів може допомогти при вирішенні першого завдання. Крім того, було показано успішне застосування транспозонів при створенні безмаркерних трансгенних рослин.

Для створення безмаркерних трансгенних рослин було розроблено ряд підходів з використанням мобільних елементів. Їх суть полягає у тому, що або трансген, що становить інтерес, або селективний маркер поєднують із послідовностями мобільних елементів таким чином, що їх можливо контролювано відділити один від одного після трансформації та селекції. Якщо трансген оточений з обох боків послідовностями транспозону, то при активації останнього в присутності джерела транс-

позази відбувається переміщення цінного гена від локусу первинної інтеграції трансгена. Це дозволяє розділити господарсько-цінний трансген і селективний маркер шляхом сегрегації у наступних поколіннях. Перевагою цього методу є можливість створення серій ліній рослин з інтеграцією трансгена у різні локуси, що є особливо цінним для рослин, які важко трансформувати [65]. Таке переміщення трансгена дозволить досліджувати рівень його експресії при різних положеннях у геномі. Недоліком цього методу є тривалість у часі, обумовлена необхідністю сегрегації трансгена з маркером і тим, що більшість транспозонів переміщується у близько розташовані локуси, які належать до однієї групи зчеплення.

Інший підхід полягає у тому, що селективний маркер розміщується у транспозоні, який або переміщується у незчеплений локус, або втрачається під час транспозиції при відсутності реінсерції. Так, частота втрати мобільного елемента при транспозиції для *Ac/Ds* може становити від 10 [21, 66] до 50 % [57]. В роботі Dash et al. [67] для *En/Spm* також була показана значна частота втрати елемента після ексцизії та розглянуто можливі причини цього явища, яке дослідники пов'язують з транспозицією мобільного елемента під час реплікації хромосом [67]. Перевагами другого методу є можливість його застосування на рослинах, які розмножуються вегетативно, і в тих випадках, коли неможливо отримати сегрегацію генів шляхом схрещування (картопля, яблуна, виноград, суніці, хризантеми, банани, маніока і т. д.). Привабливою є можливість створення такого вектора, від якого після транспозиції залишатиметься лише господарсько-цінний ген, оточений послідовностями T-ДНК [66, 68].

Нові перспективи використання мобільних генетичних елементів у біотехнології рослин. Відомо, що не всі лінії та сорти сільськогосподарських культур навіть в межах одного виду придатні для ефективної генетичної трансформації. Традиційно при отриманні трансгенних рослин таких комерційних сортів трансгени в них переносять шляхом статевих схрещувань з ліній, які легко трансформуються. Для відтворення після цього вихідного генотипу сорту, який цікавить дослідника, не-

обхідне багаторазове проведення повторних зворотних схрещувань. Така методика вимагає значних витрат часу, зусиль та не гарантує повної відсутності генетичного матеріалу лінії-донора. Тому заслуговує на увагу новий підхід, який, можливо, дозволить подолати подібні перешкоди. Суть цього методу полягає у використанні транспозонів, які можуть переміщувати гени по геному. Тому транспозиція гена, що становить інтерес, з геномного оточення первинно трансформованої лінії до геному комерційного сорту порушить групи зчеплення, чим прискорить відбір рослин з генотипом комерційного сорту.

З попереднього аналізу літературних джерел було виявлено, що транспозиція мобільних генетичних елементів між окремими хромосомами в межах одного геному — можлива [22]. Процес транспозиції між геномами різних видів досі ще не був показаний. У процесах транспозиції мобільних елементів в межах одного геному та між геномами може існувати відмінність. Причина її може полягати в тому, що геноми різних видів у гібридному ядрі можуть бути просторово розділеними [69]. В цьому випадку ефективність міжгеномної транспозиції може бути дуже низькою або взагалі відсутньою, що робить необхідною перевірку цієї гіпотези. Якщо буде показана така можливість, то це відкриватиме новий перспективний напрямок біотехнологічних досліджень: швидке створення трансгенних сортів цінних сільськогосподарських видів.

Відомо, що у певних комбінаціях батьківських видів при гібридації відбувається утворення нестабільних гібридів. Останні характеризуються тим, що спонтанно втрачають генетичний матеріал одного з батьківських видів на ранніх стадіях розвитку. Вид, хромосоми якого елімінуються у гібридах, може бути трансформованим конструкцією, що містить оточений послідовностями транспозону ген, який становить інтерес, з подальшим використанням цього виду як донора. Переміщення такого гена з геному виду-донора до геному реципієнта та наступна втрата генетичного матеріалу може привести до швидкого створення трансгенних комерційних сортів. Ймовірними причинами елімінації генетичного матеріалу в нестабільних гібридах є відмінності у мітотич-

ному ритмі та тривалості фаз клітинного циклу в батьківських видів [70].

Отримання таких гібридів можливе як шляхом статевої, так і соматичної гібридизації. Нестабільні гібриди утворюються при статевої гібридизації *Brassica napus* × *Orychophragmus violaceus* [71], *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* [70], *Avena sativa* × *Zea mays* [72, 73], *Triticum turgidum* × *Zea mays* [74], *Triticum aestivum* × *Zea mays* [75, 76, 77], *Triticum aestivum* × *Pennisetum americanum* [76], *Triticum aestivum* × *H. bulbosum* [78]. Деякі з таких гібридів вже використовують у селекційних програмах для отримання цілком гомозиготних дигапloidних ліній сільськогосподарських рослин. Спонтанну елімінацію хромосом та утворення асиметричних соматичних гібридів було показано у *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris* [79], *Brassica juncea* + *Eruca sativa* [80], *Brassica napus* + *Brassica nigra* [81], *B. napus* + *Raphanus sativus* [81], *B. napus* + *E. sativa* [81], *B. napus* + *A. thaliana* [82], *B. napus* + *Lesquerella fendleri* [83], *R. sativus* + *A. thaliana* [84], *Lycopersicon peruvianum* + *Petunia hybrida* [85], *Nicotiana tabacum* + *Atropa belladonna* [86], *Lycopersicon esculentum* + *N. tabacum* [87].

Нами було створено низку віддалених соматичних гібридів для перевірки можливості міжгеномного переміщення транспозону. У міжтрибних соматичних гібридів між модельним об'єктом генетичних досліджень *Arabidopsis thaliana*, геном якого містив *Spm* транспозон кукурудзи, та видами триби Brassicaceae (*Brassica juncea*, *Orychophragmus violaceus*, *Brassica napus*) була показана активність гетерологічної системи транспозонів. Отримання гібридів з активним гетерологічним мобільним генетичним елементом є одним з перших кроків на шляху вирішення низки цікавих теоретичних і практичних проблем.

Заклучення. Пройшло майже 60 років з моменту відкриття мобільних генетичних елементів. Транспозони були відкриті за допомогою класичних генетичних методів. Розвиток методів молекулярної біології дозволив відкрити та дослідити нові групи мобільних генетичних елементів і показати їх універсальну розповсюдженість в біологічних об'єктах. Транспозони грають неабияку роль у реорганізації генетичного матеріалу, внаслідок чого впливають

на еволюцію рослинного геному. Хоча було проведено багато досліджень по вивченню активності транспозонів, не всі механізми транспозиції досі досліджені. Використання гетерологічних видів-господарів дозволяє, поперше, полегшити вивчення транспозиції та, по-друге, використати переваги транспозонів як генетичних інструментів у видів, де вони відсутні. Молекулярно-біологічні методи дозволили модифікувати природні транспозони так, щоб полегшити подальші методи аналізу. Модифікації полягали у введенні до складу транспозонів селективних та маркерних генів, розміщенні транспозону між промотором та кодуючою ділянкою маркерного гена, використанні двокомпонентних систем та делетуванні частини кінцевих повторів. Завдяки унікальним особливостям транспозони використовують при мутагенезі та клонуванні генів. Здатність мобільних генетичних елементів переміщуватися по геному дозволяє застосовувати їх для маніпулювання генами при вирішенні біотехнологічних завдань.

SUMMARY. Data concerning plant transposable elements and their contribution to plant genome evolution are reviewed. Much attention is focused on utilization of transgenic plants as heterologous hosts of transposons for investigation of transposition mechanisms and gene cloning. Probable ways of the use of plant transposons as genetic tools in biotechnology are discussed.

РЕЗЮМЕ. Обзор посвящен использованию мобильных генетических элементов растений в генетико-биотехнологических исследованиях. Коротко рассмотрены общие сведения о транспозонах и их возможной роли в эволюционных процессах. Значительное внимание уделено вопросу использования трансгенных растений как гетерологических хозяев транспозонов для изучения процессов транспозиции и клонирования генов. Показаны возможные пути использования мобильных генетических элементов растений в биотехнологии.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // Science. — 1984. — 226. — P. 792–801.
2. Gierl A., Saedler H. The En/Spm transposable element of *Zea mays* // Plant. Mol. Biol. — 1989. — 13, № 3. — P. 261–266.
3. Bennetzen J.L. Transposable element contribution to plant gene and genome evolution // Plant Mol. Biol. — 2000. — 42, № 1. — P. 251–269.

4. SanMiguel P., Bennetzen J.L. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons // *Ann. Bot.* — 1998. — **82**. — P. 37–44.
5. Grandbastien M.-A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions // *Trends in Plant Science.* — 1998. — **3**, № 5. — P. 181–187.
6. Fedoroff N. Transposons and genome evolution in plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2000. — **97**, № 13. — P. 7002–7007.
7. Peterson P.A. A mutable pale green locus in maize // *Genetics.* — 1953. — **38**. — P. 682–683.
8. Wang G.-D., Tian P.-F., Cheng Z.-K., Wu G., Jiang J.-M., Li D.-B., Li Q., He Z.-H. Genomic characterization of *Rim2/Hipa* elements reveals a CACTA-like transposon superfamily with unique features in the rice genome // *Mol. Gen. Genom.* — 2003. — **270**. — P. 234–242.
9. Nitasaka E. Insertion of an *En/Spm*-related transposable element into a floral homeotic gene *DUPLICATED* causes a double flower phenotype in the Japanese morning glory // *Plant J.* — 2003. — **36**, № 4. — P. 522–531.
10. Cormack J., Peterson P.A. Gene marker loss induced by the transposable element, *En*, in maize // *Genetics.* — 1994. — **136**, № 3. — P. 1151–1156.
11. Gray Y. It takes two transposons to tango transposable-element-mediated chromosomal rearrangements // *Trends Genet.* — 2000. — **16**, № 10. — P. 461–468.
12. Xiao Y.-L., Peterson T. Intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* induced by a maize transposon // *Mol. Gen. Genet.* — 2000. — **263** — P. 22–29.
13. Raskina O., Belyayev A., Nevo E. Activity of the *En/Spm*-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. // *Chromosome Res.* — 2004. — **12**. — P. 153–161.
14. Lonig W.-E., Saedler H. Plant transposons: contributors to evolution? // *Gene.* — 1997. — **205**, № 1/2. — P. 245–253.
15. Kanazava A., Akimoto M., Morishima H., Shimamoto Y. Inter- and intra-specific distribution of *Stowaway* transposable elements in AA-genome species of wild rice // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — **101**, № 3. — P. 327–335.
16. Takumi S., Murai K., Mori N., Nakamura C. Trans-activation of a maize *Ds* transposable element in transgenic wheat plants expressing the *Ac* transposase gene // *Theor. Appl. Genet.* — 1999. — **98**. — P. 947–953.
17. Scholz S., Lorz H., Lutjike S. Transposition of the maize transposable element *Ac* in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Mol. Gen. Genet.* — 2001. — **264**. — P. 653–661.
18. Murai N., Li Z., Kawagoe Y., Hayashimoto A. Transposition of the maize activator element in transgenic rice plants // *Nucl. Acids Res.* — 1991. — **19**, № 3. — P. 617–622.
19. Greco R., Ouwerkerk P.B.F., Taal A.J.C., Favalli C., Beguiristain T., Puigdomenech P., Colombo L., Hoge J.H.C., Pereira A. Early and multiple *Ac* transpositions in rice suitable for efficient insertional mutagenesis // *Plant Mol. Biol.* — 2001. — **46**. — P. 215–227.
20. Yoder J.I., Palys J., Alpert K., Lassner M. *Ac* transposition in transgenic tomato plants // *Mol. Gen. Genet.* — 1988. — **213**. — P. 291–296.
21. Belzile F., Lassner M.W., Tong Y., Khush R., Yoder J.I. Sexual transmission of transposed Activator elements in transgenic tomato // *Genetics.* — 1989. — **123**. — P. 181–189.
22. Břizva J., Niedermeierova H., Pavingerova D., Thomas C.M., Klimyuk V., Jones J.D.G. Transposition patterns of unlinked transposed *Ds* elements from two T-DNA loci on tomato chromosomes 7 and 8 // *Mol. Genet. Genom.* — 2002. — **266**. — P. 882–890.
23. Stuurman J., Nijkamp H.J., van Haaren M.J.J. Molecular insertion site-selectivity of *Ds* in tomato // *Plant J.* — 1998. — **14**, № 2. — P. 215–223.
24. Chang Y.-Ch., Pfitzner A.J.P. The firefly luciferase gene as a reporter for in vivo detection of *Ac* transposition in tomato plants // *Plant Sci.* — 1994. — **98**. — P. 175–183.
25. Knapp S., Coupland G., Uhrig H., Starlinger P. et al. Transposition of the maize transposable element *Ac* in *Solanum tuberosum* // *Mol. Gen. Genet.* — 1988. — **213**. — P. 285–290.
26. Enckwort L.J.G. van, Bergervoet J.E.M., Stickema W.J., Pereira A., Jacobsen E. Selection of independent *Ds* transposon in somatic tissue of potato by protoplast regeneration // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — **101**, № 4. — P. 503–510.
27. Schmidt-Rogge T., Weber B., Borner T., Brandenburg E., Schieder O., Meixner M. Transposition and behaviour of the maize transposable element *Ac* in transgenic haploid *Datura innoxia* Mill. // *Plant Sci.* — 1994. — **99**. — P. 63–74.
28. Babwah A. V., Waddell C.S. Trans-activation of the maize transposable element, *Ds*, in *Brassica napus* // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — **104**. — P. 1141–1149.
29. McKenzie N., Wen L.-Y., Dale P.J. Tissue-culture enhanced transposition of the maize transposable element Dissociation in *Brassica oleracea* var. *Italica* // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — **105**. — P. 23–33.
30. Baker B., Schell J., Lorz H., Fedoroff N. Transposition of the maize controlling element «Activator» in tobacco // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1986. — **83**, № 13. — P. 4844–4848.
31. Haring M.A., Gao J., Volbeda T., Rommens C.M.T. et al. A comparative study of *Tam3* and *Ac* transposition in transgenic tobacco and *Petunia* plants // *Plant Mol. Biol.* — 1989. — **13**. — P. 189–201.
32. Majira A., Domin M., Grandjean O., Gofron K., Houba-Herlin N. Seedling lethality in *Nicotiana glauca* // *Plant Mol. Biol.* — 2001. — **46**. — P. 215–227.

- lia conferred by Ds transposable element insertion into a plant-specific gene // *Plant Mol. Biol.* — 2002. — **50**. — P. 551–562.
33. Van Sluys M.A., Tempe J., Federoff N. Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* // *EMBO J.* — 1987. — **6**. — P. 3881–3889.
 34. Dean C., Sjodin K., Page T., Jones J., Lister C. Behaviour of the maize transposable element Ac in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* — 1992. — **2**, № 1. — P. 69–81.
 35. Finnegan E.J., Lawrence G.J., Dennis R.S., Ellis J.G. Behavior of modified Ac elements in flax callus and regenerated plants // *Plant Mol. Biol.* — 1993. — **22**. — P. 625–633.
 36. Yang C.H., Ellis J.G., Michelmore R.W. Infrequent transposition of Ac in lettuce, *Lactuca sativa* // *Plant Mol. Biol.* — 1993. — **22**. — P. 793–805.
 37. Cardon G.H., Frey M., Saedler H., Gierl A. Definition and characterization of an artificial En/Spm-based transposon tagging system in transgenic tobacco // *Plant Mol. Biol.* — 1993. — **23**, № 1. — P. 157–178.
 38. Masson P., Fedoroff N.V. Mobility of the Maize Suppressor-Mutator Element in Transgenic Tobacco Cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1989. — **86**, № 7. — P. 2219–2223.
 39. Frey M., Tavantsiz S.M., Saedler H. The maize En1/Spm element transposes in potato // *Mol. Gen. Genet.* — 1989. — **217**. — P. 172–177.
 40. Aarts M.G.M., Corzaan P., Stiekema W.J., Pereira A. A two-element Enhancer-Inhibitor transposon system in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Gen. Genet.* — 1995. — **247**, № 5. — P. 555–564.
 41. Wisman E., Cardon G.H., Fransz P., Saedler H. The behavior of the autonomous maize transposable element En/SPM in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis // *Plant Mol. Biol.* — 1998. — **37**, № 6. — P. 989–999.
 42. Tissier A.F., Marillonnet S., Klimyuk V., Patel K., Torres M.A., Murphy G., Jones J.D.G. Multiple independent defective Suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: A tool for functional genomics // *Plant Cell.* — 1999. — **11**, № 10. — P. 1841–1852.
 43. d'Erforth I., Cosson V., Eschstruth A., Rippa S., Messinese E., Durand P., Trinh H., Kondorosi A., Ratet P. Rapid inactivation of the maize transposable element En/Spm in *Medicago truncatula* // *Mol. Gen. Genom.* — 2003. — **269**. — P. 732–745.
 44. Сахно Л.А., Сытник Е.С., Череп Н.Н., Комарницький І.К., Кучук Н.В., Климяк В.И. Активность системы Spm транспозонов кукурузы у трансгенных растений *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shultz, полученных путем как прямого переноса ДНК в протопласты, так и агробактериальной трансформацией корневых эксплантов // *Цитология и генетика.* — 2002. — **36**, № 6. — С. 3–8.
 45. Greco R., Ouwerkerk P.B.F., Taal A.J.C., Sallaud C., Guiderdoni E., Meijer A.H., Hoge J.H.C., Pereira A. Transcription and somatic transposition of the maize En/ Spm transposon system in rice // *Mol. Gen. Genom.* — 2004. — **270**. — P. 514–523.
 46. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.М., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Отримання міжтрибних соматичних гібридів *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana* та дослідження поведінки трансгенних ознак // *Цитология и генетика.* — 2004. — **38**, № 3. — С. 3–8.
 47. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.М., Рудас В.А., Кучук М.В. Отримання міжтрибних соматичних гібридів дигеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Arabidopsis thaliana*) та тетрагеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana*) походження та їх використання для вивчення поведінки гетерологічної системи транспозонів Spm/dSpm // *Біополімери та клітина.* — 2005. — **21**, № 1. — С. 35–41.
 48. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.М., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Отримання і аналіз соматичних гібридів *Brassica napus*+*Arabidopsis thaliana*, що містять гетерологічну систему транспозонів Spm/dSpm // *Цитология и генетика.* — 2005. — **9**, № 3. — С. 50–56.
 49. Liu D., Zhang S., Fauquet C., Crawford N.M. The *Arabidopsis* transposon Tag1 is active in rice, undergoing germinal transposition and restricted, late somatic excision // *Mol. Gen. Genet.* — 1999. — **262**. — P. 413–420.
 50. Frank M.J., Liu D., Tsay Y.F., Ustach C., Crawford N.M. Tag1 is an autonomous transposable element that shows somatic excision in both *Arabidopsis* and tobacco // *Plant Cell.* — 1997. — **9**. — P. 1745–1756.
 51. Ishikawa N., Jozuka-Hisatomi Y., Sugita K., Ebinuma H., Iida S. The transposon *Tip100* from the common morning glory is an autonomous element that can transpose in tobacco plants // *Mol. Genet. Genom.* — 2002. — **266**. — P. 732–739.
 52. Zhang H., Somerville C.R. Transfer of the maize transposable element Mu 1 into *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci.* — 1987. — **48**. — P. 165–173.
 53. Peterson P.A. The En mutable system in maize. 3. Transposition associated with mutational events // *Theor. Appl. Genet.* — 1970. — **40**. — P. 367–377 (цит по Cardon et al., 1993).
 54. Fedoroff N., Furtak D., Nelson O. Cloning of the *Bronze* locus in maize by simple and generalizable procedure using the transposable controlling element Ac // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1984. — **81**. — P. 3825–3839.
 55. Luo D., Coen E.S., Doyle S., Carpenter R. Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus* // *Plant J.* — 1991. — **1**. — P. 59–69.
 56. Aarts M.G.M., Dirkse W.G., Stiekema W.J., Pereira A. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidop-*

- sis thaliana* // Nature. — 1993. — 363, № 6431. — P. 715—718.
57. Sundaesan V. Horizontal spread of transposon mutagenesis: new uses for old elements // Trends Plant Sci. — 1996. — 1, № 6. — P. 184—190.
 58. Doring H.-P., Starlinger P. Molecular genetics of transposable elements in plants // Ann. Rev. Genet. — 1986. — 20. — P. 175—200.
 59. Peschke V.M., Phillips R.L. Activation of the maize transposable element *Suppressor-mutator (Spm)* in tissue culture // Theor. Appl. Genet. — 1991. — 81. — P. 90—97.
 60. Kohli A., Prynne M. Q., Miro B., Pereira A., Twyman R. M., Capell T., Christou P. Dedifferentiation-mediated changes in transposition behavior make the *Activator* transposon an ideal tool for functional genomics in rice // Mol. Breed. — 2004. — 13. — P. 177—191.
 61. Kitamura K., Hashida Sh., Mikami T., Kishima Y. Position effect of the excision frequency of the *Antirrhinum* transposon Tam3: implications for the degree of position-dependent methylation in the ends of the element // Plant Mol. Biol. — 2001. — 47. — P. 475—490.
 62. Chang Y.-Ch., Pfitzner A. J. P., Pfitzner U. M., Chang-Chang K.-F., Chen C., Tu J., Kuo T.-T. Construction of an inducible transposon, *INAc*, to develop a gene tagging system in higher plants // Mol. Breed. — 2000. — 6. — P. 353—367.
 63. Mckenzie N., Dale P.J. Mapping of transposable element *Dissociation inserts* in *Brassica oleracea* following plant regeneration from streptomycin selection of callus // Theor. Appl. Genet. — 2004. — 109. — P. 333—341.
 64. Puchta H. Towards the ideal GMP: Homologous recombination and marker gene excision // J. Plant Physiol. — 2003. — 160. — P. 743—754.
 65. Goldsborough A.P., Lastrella C.N., Yoder J.I. Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato // Biotechnology. — 1993. — 11. — P. 1286—1292.
 66. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamacado M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1997. — 94. — P. 2117—2121.
 67. Dash S., Peterson P.A. Frequent loss of the *En* transposable element after excision and its relation to chromosome replication in maize (*Zea mays* L.) // Genetics. — 1994. — 136, № 2 — P. 653 — 671.
 68. Yoder J.I., Goldsborough A.P. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants // Biotechnology. — 1994. — 12, № 3. — P. 263—267.
 69. Gleba Yu.Yu., Parokonyy A., Kotov V., Negrutii I., Motot V. Spatial separation of parental genomes in hybrids of somatic plant cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — 84, № 11. — P. 3709—3713.
 70. Subrahmanyam N.C., Kasha K.J. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridisation // Chromosoma. — 1973. — 42, № 2. — P. 111—125.
 71. Li Z.Y., Liu H.L., Heneen W.K. Meiotic behavior in intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* // Hereditas. — 1996. — 125, № 1. — P. 69—75.
 72. Rines H.W., Dahleen L.S. Haploid oat plants produced by application of maize pollen to emasculated oat florets // Crop Sci. — 1990. — 30. — P. 1073—1078.
 73. Riera-Lizarazu O., Rines H.W., Phyllips R.L. Cytological and molecular characterization of oat×maize partial hybrids // Theor. Appl. Genet. — 1996. — 93. — P. 123—135.
 74. O'Donoghue L.S., Bennett M.D. Durum wheat haploid production using maize wide-crossing // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 89. — P. 559—566.
 75. Laurie D.A., Snape J.W. The agronomic performance of wheat doubled haploid lines derived from wheat×maize crosses // Theor. Appl. Genet. — 1990. — 79. — P. 813—816.
 76. Matzk F., Mahn A. Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination // Plant Breed. — 1994. — 113. — P. 125—129.
 77. Lefebvre D., Devaux P. Doubled haploid of wheat from wheat×maize crosses: genotypic influence, fertility and inheritance of the 1BL-1RS chromosome // Theor. Appl. Genet. — 1996. — 93. — P. 1267—1273.
 78. Sitch L.A., Snape J.W. Doubled haploid production in winter wheat and triticale genotypes // Euphytica. — 1986. — 35. — P. 1045—1051.
 79. Gleba Y.Y., Hoffman F. "Arabidobrassica": a novel plant obtained by protoplast fusion // Planta. — 1980. — 149, № 2 — P. 112—117.
 80. Sikdar S.R., Chatterjee G., Das S., Sen S.K. Erussica, the intergeneric fertile somatic hybrid developed through protoplast fusion between *Eruca sativa* Lam and *Brassica juncea* (L) Czern // Theor. Appl. Genet. — 1990. — 79, № 4. — P. 561—567.
 81. Sundberg E., Glimelius K. Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within Brassicaceae // Theor. Appl. Genet. — 1991. — 83. — P. — 81—88.
 82. Forsberg J., Landgren M., Glimelius K. Fertile somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* // Plant Sci. — 1994. — 95, № 2 — P. 213—223.
 83. Skarzhinskaya M., Fahleson J., Glimelius K., Mouras A. Genome organisation of *B. napus* and *L. fendleri* and analysis of their somatic hybrids using in situ hybridization // Genome. — 1998. — 41. — P. 691—701.
 84. Yamagishi H., Glimelius K. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*) // Plant Cell Rep. — 2003. — 22. — P. 52—58.

85. *Tabaeizadeh Z., Perennes C., Bergounioux C.* Increasing the variability of *Lycopersicon peruvianum* Mill. by protoplast fusion with *Petunia hybrida* L. // *Plant Cell Rep.* — 1985. — **4**, № 1. — P. 7–11.
86. *Babiychuk E., Kushnir S., Gleba Y.Y.* Spontaneous extensive chromosome elimination in somatic hybrids between somatically congruent species *Nicotiana tabacum* L. and *Atropa belladonna* L. // *Theor. Appl. Genet.* — 1992. — **84**. — P. 87–91.
87. *Turpin C.* Attempt of male cytoplasmic sterility introduction by intergeneric fusion in cultivated tomato // *Acta Hort.* — 1986. — **191**. — P. 377–379.

Надійшла 05.12.05