



# БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



## ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПЛОДОВ У ПЕРВИЧНЫХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Кононенко Н.В., Чабан И.А., Баранова Е.Н., Богоутдинова Л.Р., Халилуев М.Р.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 г. Москва, Тимирязевская ул., 42, e-mail: marat131084@rambler.ru

### Резюме

Среди трансгенных растений томата с генами, кодирующими хитинсвязывающие белки из *Amaranthus caudatus* L. (*ac*) и *Amaranthus retroflexus* L. (*RS-intron-Shir*), а также гевеиноподобные антимикробные пептиды из *Stellaria media* L. (*SmAMP1* и *SmAMP2*), выделены линии, у которых формировались нормальные и партенокарпические плоды. Проведено сравнение структуры плодов у трансгенных растений. Установлены существенные различия между контрольными и трансгенными растениями с нормальным и аномальным фенотипом по количественному соотношению диплоидных и полиплоидных клеток в перикарпии плодов. Обсуждаются возможные причины формирования партенокарпических плодов у полученных трансгенных растений.

**Ключевые слова:** томат (*Solanum lycopersicum* L.), агробактериальная трансформация, партенокарпия, плоидность клеток перикарпия

**Цитирование** - Кононенко Н.В., Чабан И.А., Баранова Е.Н., Богоутдинова Л.Р., Халилуев М.Р. Особенности формирования плодов у первичных трансгенных растений томата, полученных методом агробактериальной трансформации. *Биомика*. 2018. 10(1). С. 37-41. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-9

## CHARACTERISTICS OF TOMATO FRUIT DEVELOPMENT IN PRIMARY TRANSGENIC PLANTS CREATED BY AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION

Kononenko N.V., Chaban I.A., Baranova E.N., Bogoutdinova L.R., Khaliluev M.R.

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Timiryazevskaya 42, e-mail: marat131084@rambler.ru

### Resume

Among transgenic tomato plants with genes encoding chitin-binding proteins from *Amaranthus caudatus* L. (*ac*) and *Amaranthus retroflexus* L. (*RS intron-Shir*) as well as hevein-like antimicrobial peptides from *Stellaria media* L. (*SmAMP1* and *SmAMP2*) were identified lines with normal and parthenocarpic fruits. The fruit structure in transgenic plants is compared. Significant differences between control and transgenic plants with a normal and abnormal phenotype were found in the quantitative ratio of diploid and polyploid cells in the pericarp of the fruit. Possible reasons for the formation of parthenocarpic fruits in transgenic plants are discussed.

**Keywords:** tomato (*Solanum lycopersicum* L.), *Agrobacterium*-mediated transformation, parthenocarpy, pericarp cell ploidy

**Citation** - Kononenko N.V., Chaban I.A., Baranova E.N., Bogoutdinova L.R., Khaliluev M.R. Characteristics of tomato fruit development in primary transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biomics*. 2018. 10(1). P. 37-41. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-9 [In Russian]

Партенокарпия – частный случай партеногенеза, при котором развитие плода происходит в отсутствие опыления и/или оплодотворения. Это явление широко распространено среди растений рода *Solanum*. Создание партенокарпических томатов является актуальным направлением современной селекции и представляет хозяйственное значение как для

салатных, так и промышленных сортов и гибридов, поскольку бессемянные плоды характеризуются большей сочностью и мясистой, обладают более высокими вкусовыми качествами, а также имеют преимущества при технологической обработке (например, при изготовлении паст и соусов). На современном этапе развития физиологии растений

принято считать, что партенокарпия у томата обусловлена гормональным дисбалансом, о чем свидетельствуют экспериментальные данные, полученные при экзогенной обработке растений гормонами и регуляторами роста, а также при их выращивании в неблагоприятных условиях (преимущественно при пониженных или повышенных температурах) [Gorguet et al., 2005]. Однако физиологические механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются в значительной степени неизвестными. В настоящее время охарактеризованы генотипы томата, которые содержат гены, индуцирующие партенокарпическое развитие плодов (*pat*, *pat-2*, *pat3*, *pat4*, *pat4.1*, *pat4.2*, *pat5.1*, *pat9.1*, *Pat-k*) [Gorguet et al., 2005; Takisawa et al., 2017]. Партенокарпия у культурного томата была достигнута также за счет применения различных генно-инженерных стратегий, приводящих к изменению уровня биосинтеза ауксинов и гиббереллинов. Одной из них является подавление экспрессии ауксин-регулируемых генов транскрипционных факторов *SHAA9* [Wang et al., 2005] и *SIARF7* [de Jong et al., 2009]. Нокаут гена *SHAA9* в геноме культурного томата был осуществлен японскими исследователями посредством системы CRISPR/Cas9 редактирования генома [Ueta et al., 2017]. Кроме того, образование партенокарпических плодов у трансгенных растений томата было достигнуто за счет экспрессии химерного гена *DefH9-iaaM*, который состоит из кодирующей области гена *iaaM* из *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* под контролем семяспецифичного *DefH9* промотора из *Anthirrhinum majus* L. Ген *iaaM* участвует в триптофан-зависимом пути биосинтеза 3-индолилуксусной кислоты (ИУК) через индолацетамид [Fiscadenti et al., 1999]. Накопление GA-20-оксидазы (фермента, катализирующего синтез ряда гиббереллинов) за счет сверхэкспрессии гена *CcGA20ox1*, выделенного из цитранжа (гибрида *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), также приводила к развитию бессемянных плодов у трансгенных растений томата сорта Micro-Tom [García-Hurtado et al., 2012].

Среди независимых первичных трансгенных линий томата, полученных методом агробактериальной трансформации, достаточно часто встречаются растения, у которых происходит формирование бессемянных плодов или же плоды не образуются вовсе, что исключает возможность их применения в дальнейших исследованиях. Цель настоящего исследования – изучить особенности формирования плодов у T0-трансгенных растений томата, содержащих гетерологичные гены, кодирующие защитные хитинсвязывающие белки, классифицированные в PR-4 семейство, а также гевеиноподобные антимикробные пептиды.

## Материалы и методы

Растительным материалом для исследований служили растения томата дикого вида *Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner, *S. lycopersicum* L. селекционной линии ЯЛФ, используемой для агробактериальной трансформации (дикий тип), а также независимые первичные трансгенные линии, содержащие гены, кодирующие хитинсвязывающие белки из *Amaranthus caudatus* L. (*ac*) и *A. retroflexus* L. (*RS-intron-Shir*), а также гевеиноподобные антимикробные пептиды из *Stellaria media* L. (*SmAMP1* и *SmAMP2*) [Халилуев и др. / Khaliluev et al., 2010]. Контрольные и трансгенные растения были выращены в условиях теплицы при температуре 22–25°C днем и 18–19°C ночью, влажности 60–70% и освещенности 4000-5000 люкс.

Для цитофотометрического анализа использовали фрагменты перикарпия плодов, которые фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (соотношение 3:1) в течение 3 ч, после чего проводили гидролиз 5N HCl в течение 40 мин при 22°C. Окрашивание препаратов проводили реактивом Шиффа (Merck, Германия). Содержание ДНК в клетках перикарпия плодов определяли в относительных единицах с помощью цитофотометра SMP-20 (Opton, Германия) с объективом ×16, окуляром ×10 и зондами 0.08–2.5 мм.

## Результаты и обсуждение

В результате серии экспериментов по агробактериальной трансформации были получены независимые трансгенные растения томата с чужеродными генами, кодирующими хитинсвязывающие белки и антимикробные пептиды. В зависимости от целевого гена эффективность трансформации варьировала от 6.7 до 11.3% [Халилуев и др. / Khaliluev et al., 2010]. При выращивании в условиях защищенного грунта T0-трансгенные растения были условно разделены на 4 группы: линии, у которых не происходило образования плодов (I); линии, у которых формировались плоды с полноценными жизнеспособными семенами (II); линии с партенокарпическими плодами (III). Кроме того, с каждым из целевых генов отмечены линии, существенно отличающиеся по фенотипу от растений дикого типа, у которых наблюдались кардинальные изменения генеративных органов в результате нарушения идентичности флоральной меристемы. Это выражалось в формировании эктопических генеративных побегов, что, в ряде случаев, приводило к образованию многоярусных партенокарпических плодов (IV) [Khaliluev et al., 2014]. Частота встречаемости растений с нормальными и партенокарпическими плодами представлена в табл. 1.

Частота встречаемости T0-трансгенных растений томата с нормальным и партенокарпическим развитием плодов  
Table 1. Frequency of occurrence of T0-transgenic tomato plants with normal and parthenocarpic fruit development

Целевой ген Target gene	T0-трансгенные линии томата (число/процент)				
	Всего Total	Не образовавшие плоды No fruiting occurred	Формирующие плоды с полноценными семенами Fruits with viable seeds	Формирующие нормальные партенокарпические плоды Normal parthenocarpic fruits	Формирующие аномальные партенокарпические плоды Abnormal parthenocarpic fruits
<i>ac</i>	6/100	3/49,9	1/16,7	1/16,7	1/16,7
<i>rs-intron-shir</i>	10/100	2/20,0	3/30,0	4/40,0	1/10,0
<i>amp1</i>	13/100	3/23,1	4/30,8	5/38,4	1/7,7
<i>amp2</i>	11/100	3/27,3	3/27,3	4/36,3	1/9,1

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о высокой частоте встречаемости трансгенных растений с каждым из целевых генов, у которых происходило формирование бессемянных плодов. Это позволяет сделать вывод о том, что явление партенокарпии у трансгенных растений не зависит от вида перенесенного гена. С уверенностью можно также сказать, что индукция партенокарпического развития плодов у трансгенных линий не связана с климатическими факторами, поскольку все плоды растений дикого типа содержали полноценные жизнеспособные семена при одинаковых условиях выращивания. Наиболее вероятной причиной формирования партенокарпических плодов у трансгенных линий томата является изменение гормонального статуса, которое, скорее всего, обусловлено образованием избыточного количества активных форм кислорода в процессе культивирования *in vitro*. Так, к настоящему времени хорошо известно, что при проведении

агробактериальной трансформации растительная ткань подвергается целому ряду стрессовых воздействий (заражение патогенным микроорганизмом, поранение эксплантов, а также их длительное культивирование на питательных средах с добавлением регуляторов роста и высоких концентраций селективных агентов). Все это сопровождается явлениями, характерными для первичного неспецифического стрессового ответа, который выражается в окислительном взрыве и активации окислительных ферментов [S, en 2012].

Впоследствии было проведено сравнение структуры плодов трансгенных линий, у которых происходило формирование полноценных семян, а также партенокарпических плодов с аномальным фенотипом. В качестве контроля использовали плоды селекционной линии ЯЛФ (дикий тип), а также дикого вида *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner (рис. 1а).

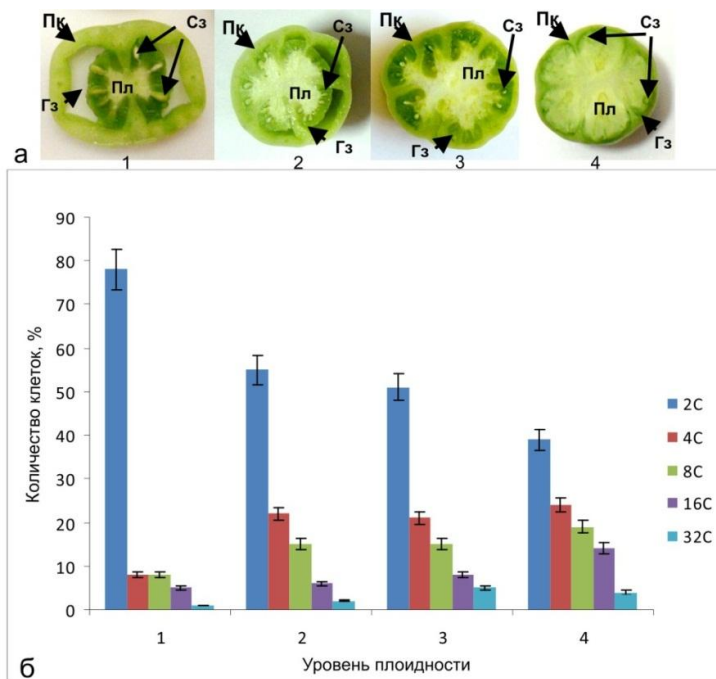


Рис. 1. Поперечные срезы плодов (а) и пloidность клеток перикарпия (б) растений томата *S. habrochaites* (1), *S. lycopersicum* линия ЯЛФ (2), а также T0-трансгенных линий с нормальным (3) и аномальным фенотипом (4).  
Fig. 1. Transverse section of fruits (a) and ploidy of pericarp cells (b) of tomato plants *S. habrochaites* (1), *S. lycopersicum* line YALF (2), as well as T0-transgenic lines with normal (3) and abnormal phenotype (4).

На поперечном срезе плода дикого вида томата можно отчетливо видеть 2 гнезда со сравнительно массивным перикарпием и небольшими плацентами, на которых располагаются семена. Плод томата линии ЯЛФ обычно содержит 5-7 правильно расположенных гнезд. Семена формируются на выпуклых массивных плацентах. Плоды трансгенных растений, содержащих полноценные семена, характеризуются увеличенным числом (10 и более) хаотично расположенных гнезд. У трансгенных линий с аномальным фенотипом плоды схожи по числу гнезд и их расположению с плодами растений дикого типа. Однако в них наблюдались сильно разросшиеся плаценты, на поверхности которых располагались мелкие неразвившиеся семязачатки.

Цитофотометрический анализ показал, что плоидность клеток перикарпия плодов всех изученных растений варьирует от 2С до 32С (рис. 1б). Существенные различия между ними оказались в количественном соотношении диплоидных (2С и 4С) и полиплоидных клеток (8С и более). Так, в перикарпии плодов *S. habrochaites* только 14% клеток содержали полиплоидные ядра, тогда как у растений дикого типа (линия ЯЛФ), а также трансгенных линий с нормальным и аномальным фенотипом – около 23, 29 и 37% соответственно.

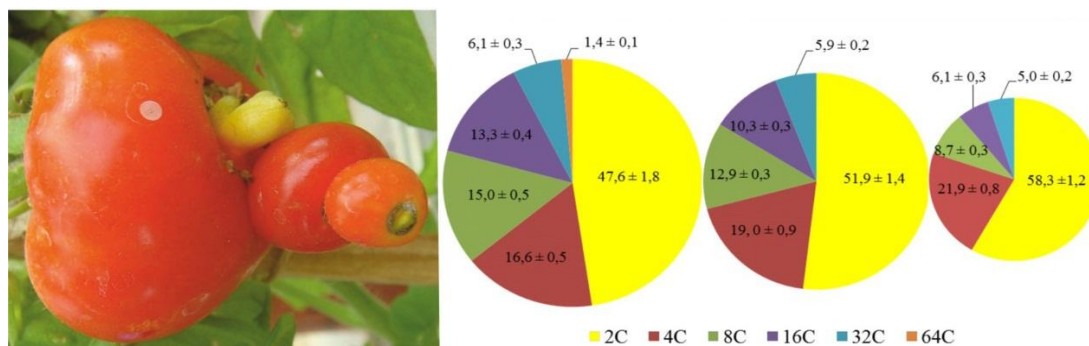


Рис. 2. Количество полиплоидных клеток перикарпия трехъярусного плода томата трансгенной линии с аномальным фенотипом, экспрессирующей ген *ac*.

Fig. 2. Polyploid pericarp cells number of multilayered tomato fruit of transgenic line expressing the *ac* gene with an abnormal phenotype.

По современным данным процесс роста плода на клеточном уровне осуществляется преимущественно за счет эндоредупликации ДНК в клетках тканей перикарпия [de Jong et al., 2009; Bourdon et al., 2011]. Удобным объектом для изучения влияния количественного содержания ДНК на размер ядра и клетки в целом служил трехъярусный плод трансгенной линии, у которой размер плодов разных ярусов уменьшался в соотношении 5:2:1 (рис. 2).

Установлено, что количество полиплоидных клеток в тканях перикарпия нижнего плода составляет около 36%, а максимальная плоидность достигает 64С. В среднем плоде количество полиплоидных клеток составляет 29%, а в верхнем – 20%. При этом максимальная плоидность клеток в среднем и верхнем плодах одинакова и составляет 32С. Действительно, как показал цитофотометрический анализ многоярусного плода исследуемой трансгенной линии томата, размер одинаковых по зрелости плодов непосредственно связан с количеством полиплоидных клеток и уровнем их плоидности. Увеличение плоидности в клетках перикарпия партенокарпического плода свидетельствует о том, что в ядрах происходит эндоредупликация ДНК, приводящая к формированию полиплоидных соматических клеток. Как установлено ранее, этот процесс сопровождается изменением структуры хроматина, числа и структуры хромосом [Bourdon et al., 2011] и соответственно уровнем плоидности клеток перикарпия. В то же время, в одинаковых по величине и зрелости плодах контрольных и трансгенных растений с аномальным

фенотипом максимальная плоидность клеток одинакова (32С), а количество полиплоидных клеток у последних достоверно выше. Это означает, что в данном случае эндоредупликация ДНК (или полиплоидизация клеток) не является единственным способом увеличения размера плодов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России № АААА-А17-117091460013-5 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00658.

#### Литература / References

- Bourdon M., Coriton O., Pirrello J., Cheniclet C., Brown S.C., Poujol C., Chevalier C., Renaudin J.P., Frangne N. In Planta quantification of endoreduplication using fluorescent in situ hybridization (FISH) // *J. Plant Sci.* 2011. V. 66. № 6. P. 1089–1099. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04568.x
- Ficcadenti N., Sestili S., Pandolfini T., Cirillo C., Rotino G.L., Spena A. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato // *Mol. Breeding.* 1999. V. 5. № 5. P. 463–470. DOI: 10.1023/A:100966540
- de Jong M., Mariani C., Vriezen W.H. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. № 5. P. 1523–1532. DOI: 10.1093/jxb/erp094
- García-Hurtado N., Carrera E., Ruiz-Rivero O., López-Gresa M.P., Hedden P., Gong F., García-Martínez J.L. The characterization of transgenic tomato overexpressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration

- of the gibberellin biosynthetic pathway // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. № 16. P. 5803-5813. DOI:10.1093/jxb/ers229
5. Gorquet B., van Heusden A.W., Lindhout P. Parthenocarpic fruit development in tomato // Plant Biol. 2005. V. 7. № 2. P. 131–139. DOI: 10.1055/s-2005-837494
6. Khaliluev M.R., Kharchenko P.N., Dolgov S.V. Genetic Transformation of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by protective chitin binding protein and antimicrobial peptide genes // Izv. TSKhA. 2010. № 6. P. 75–83. [In Russian]. Халилуев М.Р., Харченко П.Н., Долгов С.В. Генетическая трансформация томата (*Solanum lycopersicum* L.) генами защитных хитин-связывающих белков и антимикробных пептидов // Известия ТСХА. 2010. № 6. С. 75–83.
7. Khaliluev M.R., Chaban I.A., Kononenko N.V., Baranova E.N., Dolgov S.V., Kharchenko P.N., Polyakov V.Yu. Abnormal floral meristem development in transgenic tomato plants do not depend on the expression of genes encoding defense-related PR-proteins and antimicrobial peptides // Russ. J. Dev. Biol. 2014. V. 45. № 1. P. 22-33. DOI: 10.1134/S1062360414010044
8. Sen A. Oxidative stress studies in plant tissue culture. In Antioxidant Enzyme. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. P. 59– 88. DOI:10.5772/48292
9. Takisawa R., Maruyama T., Nakazaki T., Kataoka K., Saito H., Koeda S., Nunome T., Fukuoka H., Kitajima A. Parthenocarp in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar ‘MPK-1’ is controlled by a novel parthenocarpic gene // Horticult. J. 2017. V. 86. № 4. P 487–492. DOI: 10.2503/hortj.OKD-042
10. Ueta R., Abe C., Watanabe T., Sugano S.S., Ishihara R., Ezura H., Osakabe Y., Osakabe K. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9 // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 507. DOI: 10.1038/s41598-017-00501-4