

**АНОМАЛИИ В РАЗВИТИИ ФЛОРАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ
У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА НЕ ЗАВИСЯТ
ОТ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЗАЩИТНЫЕ PR-БЕЛКИ
И АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ**

© 2014 г. М. Р. Халилуев*, **, И. А. Чабан*, Н. В. Кононенко*, Е. Н. Баранова*,
С. В. Долгов*, ***, П. Н. Харченко*, В. Ю. Поляков*

*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН
127550 Москва, Тимирязевская ул., 42

**Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева
127550 Москва, Тимирязевская ул., 49

*** Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290 Московская область, Пущино, просп. Науки, 6

E-mail: marat131084@rambler.ru

Поступила в редакцию 11.02.13 г.

Окончательный вариант получен 17.06.13 г.

В работе проведен морфологический и цитоэмбриологический анализ растений томата, трансформированных генами, кодирующими хитинсвязывающие белки из *Amaranthus caudatus* L. (*ac*) и *A. retroflexus* L. (*RS-intron-Shir*), а также гевеиноподобные антимикробные пептиды из *Stellaria media* L. (*amp2*). Полученные трансгенные линии были адаптированы к почвенным условиям и выращены в защищенном грунте. Анализ трансгенных растений поколения T₀ выявил линии, фенотипически не отличающиеся от растений дикого типа, и три линии (по одной линии с каждым из вышеперечисленных генов), которые имели существенные нарушения в дифференцировке цветonoсных побегов, строении цветков и плодов. Продемонстрировано сохранение нарушений в развитии генеративных органов в 6 вегетативных поколениях. Показано, что у трансгенных растений с вегетативно наследуемыми аномалиями наблюдаются нарушения в формировании мужского гаметофита, отсутствие нормального оплодотворения и, как следствие, развитие партенокарпических плодов. Детальный анализ растущих семяночек аномальных трансгенных линий показал, что на месте неоплодотворенного зародышевого мешка формируется и разрастается замещающая ткань, по структуре отличающаяся как от зародышевой, так и от эндоспермальной ткани нормальной семяночки. Формирование замещающей ткани происходит в результате продолжающейся пролиферации клеток эндотелия, утративших способность к нормальной дифференцировке. Конечным этапом развития замещающей ткани является ее гибель, сопровождающаяся лизисом клеток. Методом ОТ-ПЦР экспрессия целевых генов была подтверждена у всех трех линий с аномальным фенотипом, а также у ряда линий, фенотипически не отличающихся от нетрансформированного контроля. Это означает, что нарушения органов генеративной сферы у трансформированных растений не зависят от экспрессии привнесенных в геном томата гетерологичных генов. Обсуждается, что причиной возникновения нарушений у трансгенных растений является прямое или опосредованное влияние агробактериальной трансформации на изменение экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы и контролирующих включение каскада генов, необходимых для нормального развития растений.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, трансгенные растения, хитинсвязывающие белки, гевеиноподобные антимикробные пептиды, нарушение идентичности флоральной меристемы, замещающая ткань зародышевого мешка.

DOI: 10.7868/S0475145014010042

В настоящее время известно, что в популяции трансгенных растений, полученных методом агробактериальной трансформации, достаточно часто встречаются растения с необычным (аномаль-

ным) фенотипом, существенно отличающимся от фенотипа дикого типа (Wilson et al., 2006). При этом диапазон наблюдаемой изменчивости крайне широк: изменение высоты растений (Feld-

mann, 1991), размеров и формы листовых пластинок (Lin et al., 2008), структуры цветка (Ohshima et al., 1997). Существенные нарушения могут возникать в генеративной сфере, которые приводят к снижению фертильности (Bavrina et al., 2007) и нарушению развития зародыша на ранних этапах эмбриогенеза (Castle, Meinke, 1994).

В современной литературе обсуждаются две основные причины этого явления. Во-первых, соматоклональная изменчивость, которая может возникать в процессе культивирования *in vitro* (Kaerpler et al., 2000; Jain, 2001). Показано, что высокая степень разнообразия соматоклонов зависит от исходного генотипа, типа и возраста экспланта (Veilleux, Johnson, 1998; Jain, 2001). Кроме того, соматоклональная изменчивость у трансгенных растений может возникать по причине генетической гетерогенности соматических клеток экспланта и регенерации побегов через стадию формирования каллусной ткани, а также индуцироваться факторами среды (Evans et al., 1984; Kaerpler et al., 2000; Jain, 2001). Возникновение соматоклонов при проведении агробактериальной трансформации может быть обусловлено воздействием на растительную ткань различных стрессовых факторов. Среди них можно отметить поранение экспланта, непосредственный контакт с патогенным микроорганизмом, а также длительное культивирование каллусной ткани на питательных средах с добавлением фитогормонов и высоких концентраций селективных агентов для органогенеза трансгенных побегов. Все перечисленные стрессовые факторы сопровождаются явлениями, которые характерны для первичного неспецифического стрессового ответа, выражающиеся в образовании активных форм кислорода (окислительном “взрыве”), активации окислительных ферментов и других реакциях (Cassells, Curry, 2001; Enikeev et al., 2008).

Другой причиной возникновения растений с аномальным фенотипом может служить инсерция Т-ДНК (Koncz et al., 1992; Wilson et al., 2006; Deineko et al., 2007) и/или последовательностей селективных генов, бактериальных плазмид, фрагментов бактериального генома и дополнительных полных либо частичных копий вставки трансгена (Tinland, 1996; Tzfira et al., 2004).

Несмотря на то, что в ряде случаев достаточно сложно установить непосредственные причины появления растений с аномальным фенотипом, трансформационно-индуцируемые мутации широко используются для идентификации и клонирования генов, что является важным направлением по анализу структурно-функциональной орга-

низации генома растений (Ampomah-Dwamena et al., 2002).

В теоретическом плане большой интерес представляют трансгенные растения, у которых выявляются кардинальные нарушения морфогенеза генеративных органов (Avivi et al., 2000; Ampomah-Dwamena et al., 2002; Wang, Campbell, 2008). Перечисленные работы направлены на изучение и установление сигнальных путей, возникающих в ходе эмбриогенеза и необходимых для нормального развития растений. В то же время, в цитированных работах практически не затрагиваются структурные аспекты, связанные с аномалиями в формировании и развитии зародыша и окружающих его тканей, а также пыльцы.

В настоящей работе проведен детальный морфологический и цитоэмбриологический анализ трансгенных растений томата, экспрессирующих гены, кодирующие хитинсвязывающие белки из *Amaranthus caudatus* L. (*ac*) и *A. retroflexus* L. (*RS-intron-Shir*), а также геветиноподобные антимикробные пептиды из *Stellaria media* L. (*amp2*), с выраженными нарушениями развития генеративных органов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Агробактериальная трансформация

Для генетической трансформации использовали бинарные векторы, в состав Т-ДНК которых в качестве целевого гена входили гены *ac* (pBI121ac) и *RS-intron-Shir* (pR830), кодирующие хитинсвязывающий белок из *Amaranthus caudatus* L. и *A. retroflexus* L. соответственно, а также ген *amp2* (pBAMP2), кодирующий два геветиноподобных антимикробных пептида (SmAMP1 и SmAMP2) из *Stellaria media* L. (Халилуев и др., 2010). Т-ДНК бинарных векторов содержала также ген *nptII*, обуславливающий устойчивость к антибиотику канамицину, для отбора трансгенной каллусной ткани и регенерантов.

Агробактериальную трансформацию проводили методом кокультивации эксплантов семядолей, полученных от двенадцати дневных проростков томата селекционной линии ЯЛФ, с разбавленной суспензией агробактерии (оптическая плотность, равная 0.4–0.6).

Индукцию процессов каллусо- и органогенеза побегов томата осуществляли при культивировании эксплантов на питательной среде MS (Murashige, Skoog, 1962), дополненной 5 мг/л 6-бензиламинопурина (Sigma, США) и 0.01 мг/л индолуксусной кислоты (Sigma, США). Для отбора каллусной ткани, устойчивой к канамицину, была использована стратегия постепенной адаптации

эксплантов семядолей к селективному агенту, исключаяющая их шок и массовую гибель (первый пассаж без канамицина, второй – 10 мг/л, третий и последующие – 25 мг/л). Продолжительность каждого пассажа составляла 15 дней. Элиминацию агробактерии осуществляли за счет добавления в состав питательной среды антибиотика тиментина (СмитКляйн Бичем Фармасьютикалз, Великобритания) в концентрации 150 мг/л. Регенерирующие канамицин-устойчивые побеги отделяли от каллусной ткани и укореняли на среде MS, содержащей половинную концентрацию макро- и микросолей, 0.2 мг/л индолилмасляной кислоты (Sigma, США) и канамицин в концентрации 100 мг/л. Укорененные регенеранты были адаптированы к почвенным условиям и выращены в защищенном грунте при температуре 22–25°C днем и 18–19°C ночью, влажности 60–70% и освещенности 2500 люкс. Размножение трансгенных линий томата, а также получение вегетативных поколений осуществляли при помощи черенкования формирующихся на взрослых растениях боковых побегов с последующим их укоренением.

ОТ-ПЦР

Выделение суммарной клеточной РНК из листьев трансгенных растений томата осуществляли с помощью набора реагентов RNA-ExtraSorb (лаборатория молекулярной диагностики и геноинженерных конструкций ВНИИСБ) в соответствии с протоколом изготовителя. Синтез кДНК проводили в стандартных условиях (Maniatis et al., 1984) с использованием шестичленных случайных праймеров (Синтол, Россия). В качестве контроля для подтверждения сохранности РНК и синтезированной на ее основе кДНК проводили амплификацию на последовательность гена актина томата *Tom 52* (NCBI, U60482). Реакцию осуществляли на амплификаторе MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BioRad, США) с использованием специфичных праймеров (Khaliluev et al., 2011).

Цитозэмбриологический анализ

Цельные завязи или их фрагменты на ранних этапах развития, а также семязачатки и пыльники фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида (Merck, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере Серенсена (рН = 7.2) с добавлением 1.5% сахарозы. После отмывки от фиксирующей смеси растительный материал дофиксировали 1% раствором четырехоксида осмия (OsO₄) (Sigma, США), обезвоживали в этаноле повышающейся концентрации (30, 50, 70, 96 и 100%), затем в окиси пропилена

(Fluka, Германия) и заключали в смесь эпоксидных смол Эпона-812 и Аралдита, (Merck, Германия) по стандартной методике (Уикли, 1975). Для светооптического анализа полутонкие (1–2 мкм) срезы монтировали на предметные стекла, окрашивали 0.1% водным раствором метиленового синего (Merck, Германия) и заключали в эпоксидную смолу. Препараты анализировали и фотографировали в микроскопе Olympus BX51 (Olympus, Япония), оборудованном камерой Color View II (Soft Imaging System, Германия).

Цитофотометрический анализ

Фрагменты перикарпия плодов томата фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (3 : 1) в течение 3 ч, гидролиз проводили 5 N HCl в течение 40 мин при 22°C, препараты окрашивали реактивом Шиффа (Merck, Германия). Содержание ДНК определяли в относительных единицах на цитофотометре SMP-20 (Opton, Германия) с объективом ×16, окуляром ×10 и зондами 0.08–2.5 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение трансгенных растений томата поколения T₀ и их морфологическая характеристика

В серии экспериментов по агробактериальной трансформации томата линии ЯЛФ с использованием бинарных векторов pBI121ac, pR830, и pB-AMP2 получено 6, 10, и 13 первичных трансформантов, содержащих различные целевые гены *ac*, *Rs-intron-Shir* и *amp2*, соответственно (Халилуев и др., 2010).

Трансгенные линии томата были адаптированы к почвенным условиям и выращены в защищенном грунте. Скрининг трансгенных растений выявил линии, фенотипически не отличающиеся от растений дикого типа, и три линии (по одной линии с каждым из вышеперечисленных генов), которые имели существенные нарушения в развитии цветков и плодов. Методом ОТ-ПЦР экспрессия соответствующих целевых генов была подтверждена у ряда линий, фенотипически не отличающихся от нетрансформированных растений, а также у всех трех линий с аномальным фенотипом (рис. 1).

По сравнению с контролем (рис. 2а, 2б), наиболее значительные изменения у аномальных трансгенных линий наблюдаются в развитии гинецея.

Во-первых, это полное или частичное нарушение синкарпности, когда плодолистики образуют

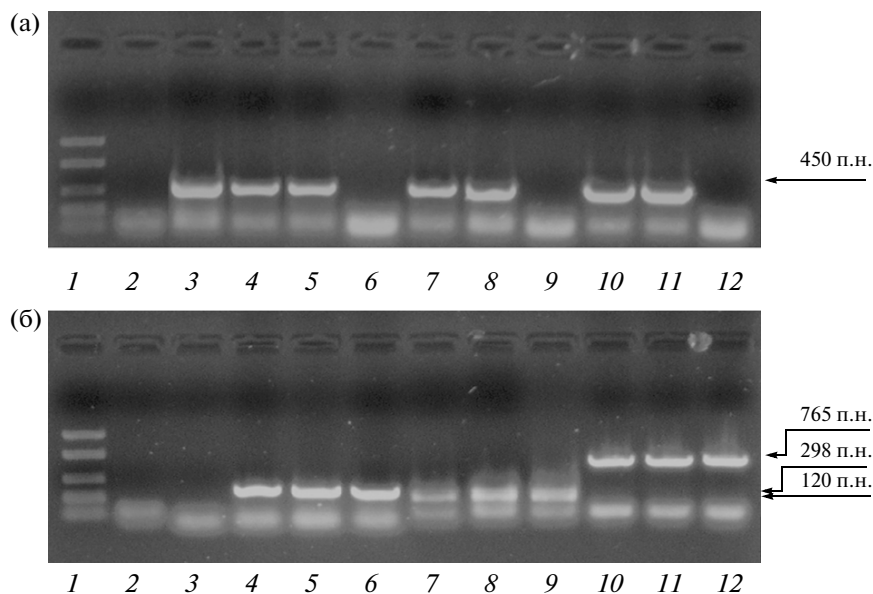


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР анализа на последовательность генов, кодирующих актин (*Tom 52*) (а), а также хитинсвязывающие белки (*ac*, *RS-intron-Shir*) и гевеиноподобные антимикробные пептиды (*amp2*) (б): 1 – молекулярный маркер FastRuler™ Low Range DNA ladder (Fermentas, Литва); 2 – вода; 3 – отрицательный контроль (линия ЯЛФ); 4, 7, 10 – трансгенные растения томата, содержащие соответственно ген *ac*, *RS-intron-Shir* и *amp2*, с аномальным фенотипом; 5, 8, 11 – трансгенные растения томата, содержащие соответственно ген *ac*, *RS-intron-Shir* и *amp2*, без фенотипических отклонений; 6, 9, 12 – положительный контроль (плазмидная ДНК бинарных векторов pB112lac, pR830 и pVAMP2 соответственно).

отдельные пестики, формируя апокарпный гинецей, или срastaются основаниями (рис. 2в). В результате образуются аномальные по форме плоды (рис. 2г).

Во-вторых, прорастание из цветоложа через сформированный плод эктопических генеративных побегов, на которых образуются новые завязи. В этом случае наблюдаются различные варианты аномалий. Если эктопических генеративных побегов немного, то на одном цветке формируется новый плод с последующим прорастанием через него нового побега и формированием еще одного плода и т.д. (рис. 2д). В итоге происходит образование многоярусного (иногда до 7–8 ярусов) плода (рис. 2е). Если из цветоложа формируется большое количество эктопических побегов (рис. 2в, 2к), их пролонгированный рост приводит к разрыву плода, в результате чего семязачатки оказываются на поверхности. На таких побегах образуется много дополнительных ярусов цветков (рис. 2ж, 2з), но плоды из них не развиваются. В цветках верхних ярусов чаще всего формируется апокарпный гинецей, который состоит из нескольких пестиков, обрамленных многочисленными чашелистиками (рис. 2з). Если происходит образование укороченных эктопических генеративных побегов, то внутри зрелого

плода возможно формирование нескольких новообразованных мелких плодов (рис. 2и, 2к).

По сравнению с контролем, цветки всех проанализированных трансгенных линий с аномальным фенотипом характеризуются большим количеством (7–8 и более) сильно гипертрофированных в размере чашелистиков и лепестков (рис. 2в).

У всех проанализированных трансгенных растений наблюдаются существенные изменения в строении завязей. Если для контрольной линии ЯЛФ характерна пяти- или семи-гнездная завязь (рис. 3а), то количество гнезд в завязи у трансгенных растений с нормально развитыми семенами заметно больше и расположение их неправильное (хаотичное) (рис. 3б). У внешне нормальных плодов трансгенных растений с аномальным фенотипом в гнездах формируются более массивные плаценты, на поверхности которых располагаются мелкие семязачатки (рис. 3в).

Размеры плодов и плоидность клеток перикарпия

Для определения плоидности клеток тканей перикарпия использовались плоды одинаковой зрелости растений исходной линии ЯЛФ, трансгенной линии без нарушения развития генеративных органов, а также многоярусные и парте-

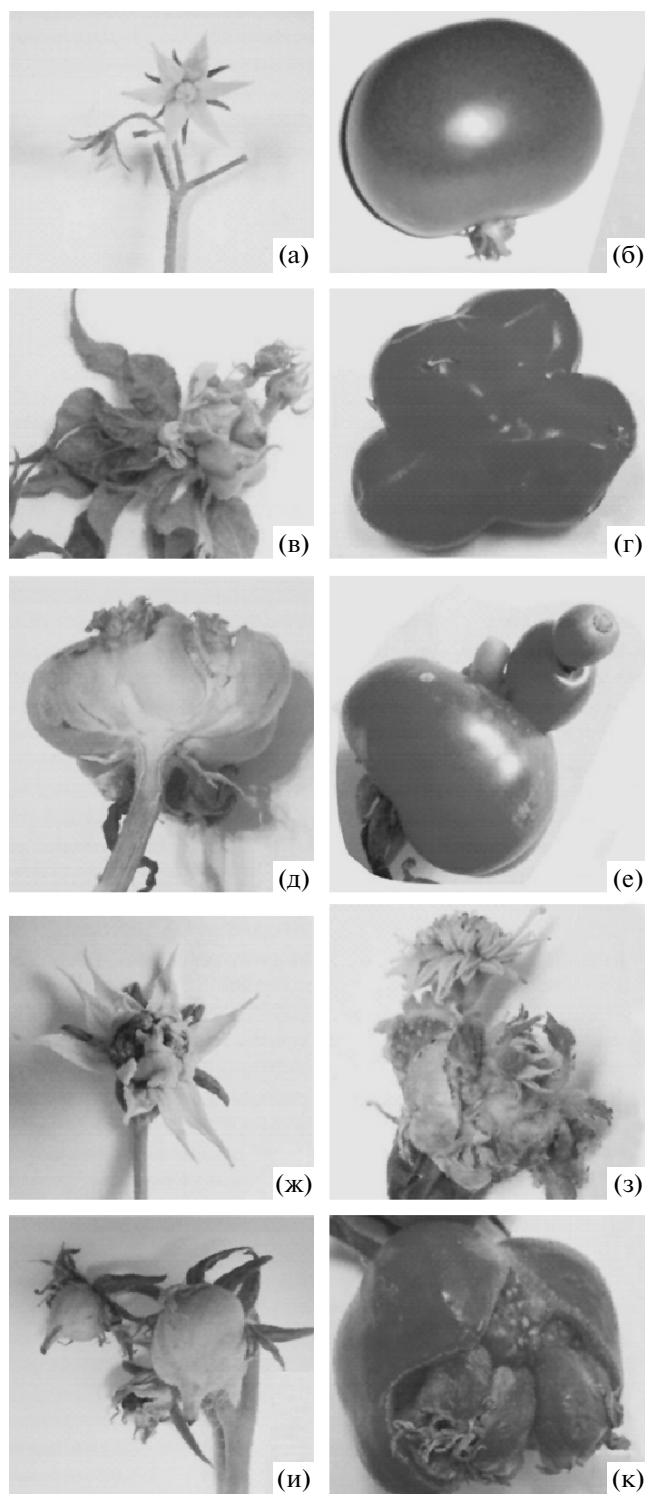


Рис. 2. Аномалии в развитии цветков и плодов у трансгенных линий томата, экспрессирующих гены хитинсвязывающих белков и геветиноподобных антимикробных пептидов. Цветки (а) и плод (б) растений исходной линии ЯЛФ. Аналогичную морфологию имеют цветки и плоды трансгенных растений без фенотипических отклонений (не иллюстрировано). (в–к) – Типы аномалий в развитии цветков и плодов у аномальных трансгенных растений. (в) – Цветок с несколькими пестиками, сросшимися основаниям (нарушение синкарпности гинецея). (г) – Сложный плод, сформированный на цветке с апокарпным гинецеом. (д) – Продольный срез завязи цветка, показывающий прорастание из цветоложа двух эктопических генеративных побегов, на которых формируются дополнительные ярусы цветков. (е) – Трехъярусный плод, сформированный из цветков нескольких эктопических побегов. (ж) – Цветок с большим количеством эктопических побегов, на которых образуется много дополнительных ярусов цветков с апокарпным гинецеом. На таких цветках формирование плодов блокировано (з). (и) – Цветки с короткими эктопическими генеративными побегами. На таких цветках формируются плоды, внутри которых располагается несколько мелких плодов (к).

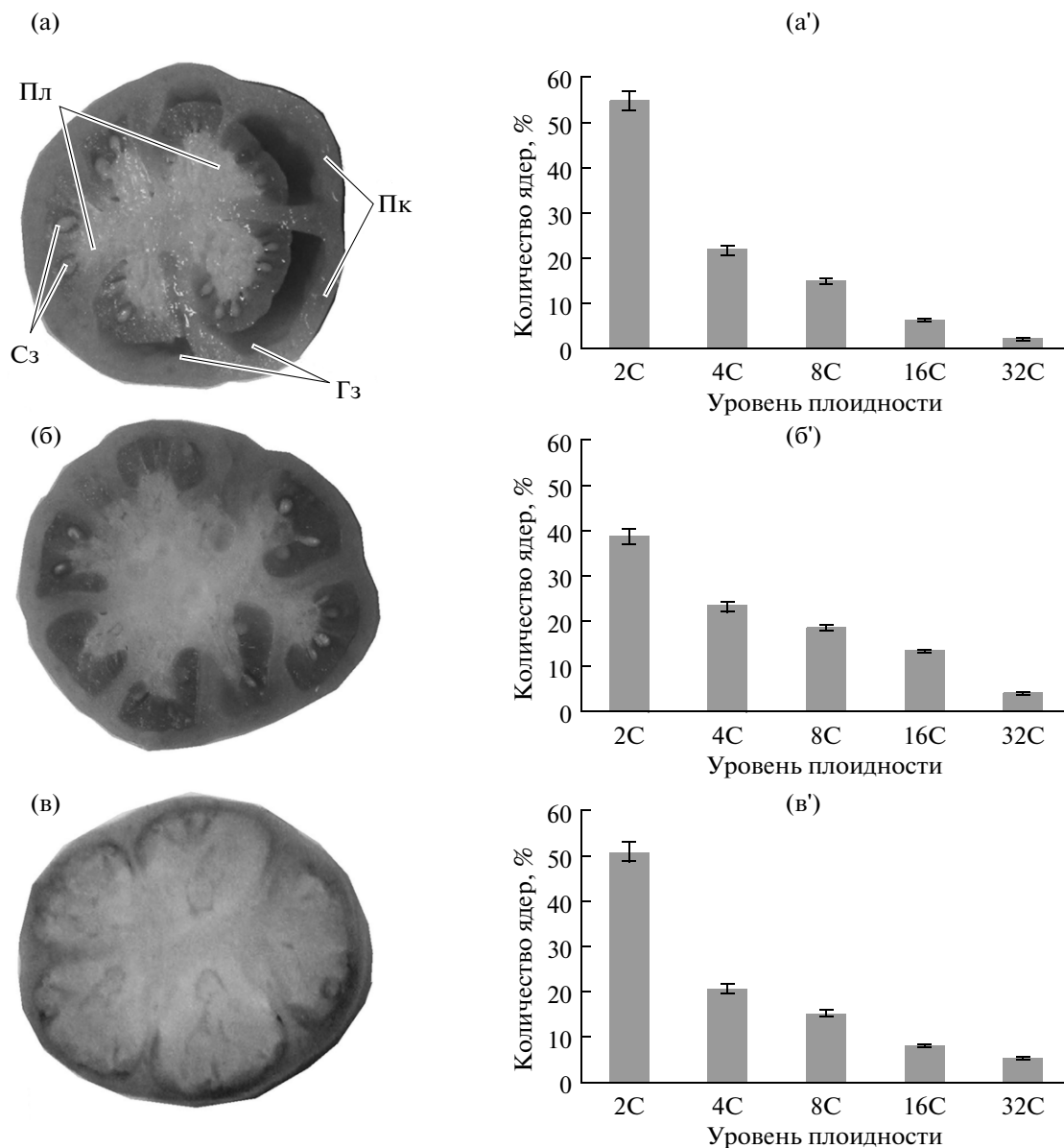


Рис. 3. Поперечные срезы плодов и плоидность клеток перикарпия контрольной линии ЯЛФ и трансгенных растений томата с нормальным и аномальным фенотипом. (а) – Плод линии ЯЛФ с правильным расположением гнезд. (б) – Характерное расположение гнезд плода трансгенной линии с нормально развитыми семенами. (в) – Массивные плаценты плода трансгенной линии с аномальным фенотипом, на поверхности которых располагаются мелкие, не развившиеся семязачатки. Обозначения: Пл – плацента; Пк – перикарпий; Сз – семязачаток; Гз – гнездо завязи. (а'–в') – Плоидность клеток перикарпия плодов линии ЯЛФ (а') и трансгенных растений с нормальным (б') и аномальным (в') фенотипом.

нокарпические плоды аномально развивающихся растений.

Для изучения возможного влияния привнесения чужеродных генов на плоидность клеток перикарпия использовались одинаковые по размеру плоды растений исходной линии ЯЛФ, а также трансгенных линий как без нарушений, так и с нарушениями развития генеративных органов.

Цитофотометрический анализ показал, что в перикарпии плодов всех изученных растений плоидность клеток варьирует от 2С до 32С (рис. 3а'–3в'). При этом в плодах исходной линии ЯЛФ количество полиплоидных клеток составляет около 23% (рис. 3а'), в плодах трансгенных растений без фенотипических отклонений – около 29% (рис. 3б'), а у трансгенных линий с нарушением развития генеративных органов – около 37% (рис. 3в').

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

Ярус	Уровень ploидности					
	2С	4С	8С	16С	32С	64С
Нижний	47.6 ± 1.8	16.6 ± 0.5	15.0 ± 0.5	13.3 ± 0.4	6.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1
Средний	51.9 ± 1.4	19.0 ± 0.9	12.9 ± 0.3	10.3 ± 0.4	5.9 ± 0.2	–
Верхний	58.3 ± 1.2	21.9 ± 0.8	8.7 ± 0.3	6.1 ± 0.3	5.0 ± 0.2	–

Объектом для изучения ploидности клеток тканей перикарпия плодов, различающихся по размеру, служил трехъярусный плод трансгенной линии, экспрессирующей ген *ac*, у которого размер плодов разных ярусов уменьшается в соотношении 5 : 2 : 1 (рис. 2е). Полученные данные показали, что количество полиплоидных клеток в тканях перикарпия нижнего плода составляет около 36%, а максимальная ploидность достигает 64С (таблица). В среднем плоде количество полиплоидных клеток составляет 29%, а в верхнем – 20%. При этом максимальная ploидность клеток в среднем и верхнем плодах одинакова и составляет 32С.

Формирование женского гаметофита

Сравнительное исследование завязей и семязачатков не выявило изменений в развитии семяпочек и женского гаметофита у исходной линии ЯЛФ, а также трансгенных растений с нормаль-

ным и аномальным фенотипом. Во всех случаях зародышевые мешки содержали яйцевой аппарат (синергиды и яйцеклетку), вторичное ядро и антиподы (рис. 4а, 4б).

После оплодотворения у растений исходной линии ЯЛФ и трансгенных растений без фенотипических отклонений наблюдали нормальное развитие зародышевого мешка, сопровождающееся ростом всей семяпочки. На рис. 5 представлены продольные срединные срезы семяпочек томата линии ЯЛФ в фазах раннего (рис. 5а) и глобулярного зародыша (рис. 5б). Зародыши погружены в ткань целлюлярного эндосперма, в клетках которого выявляются многочисленные цитоплазматические структуры и запасные вещества (крахмал, липиды).

У трансгенных линий с аномальным развитием генеративных органов в связи с отсутствием оплодотворения зародыш и соответственно эндосперм не формируются. Однако при этом диффе-

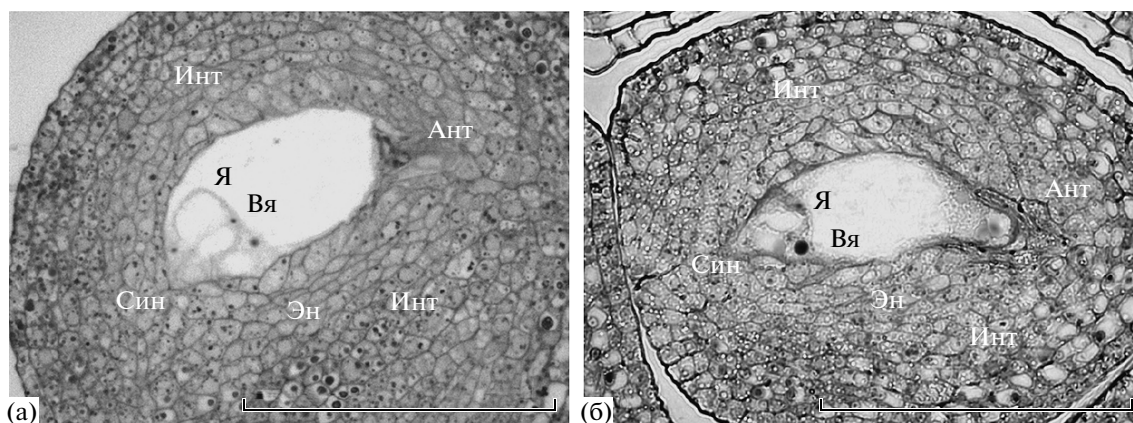


Рис. 4. Сформированный женский гаметофит в семяпочках томата исходной линии ЯЛФ (а) и трансгенной линии с аномальным фенотипом (б). Зародышевые мешки содержат яйцевой аппарат (синергиды и яйцеклетку), вторичное ядро и антиподы. Обозначения: Я – яйцеклетка; Син – синергиды; Вя – вторичное ядро зародышевого мешка; Ант – антиподы; Эн – эндотелий; Инт – интегумент. Масштаб 100 мкм.

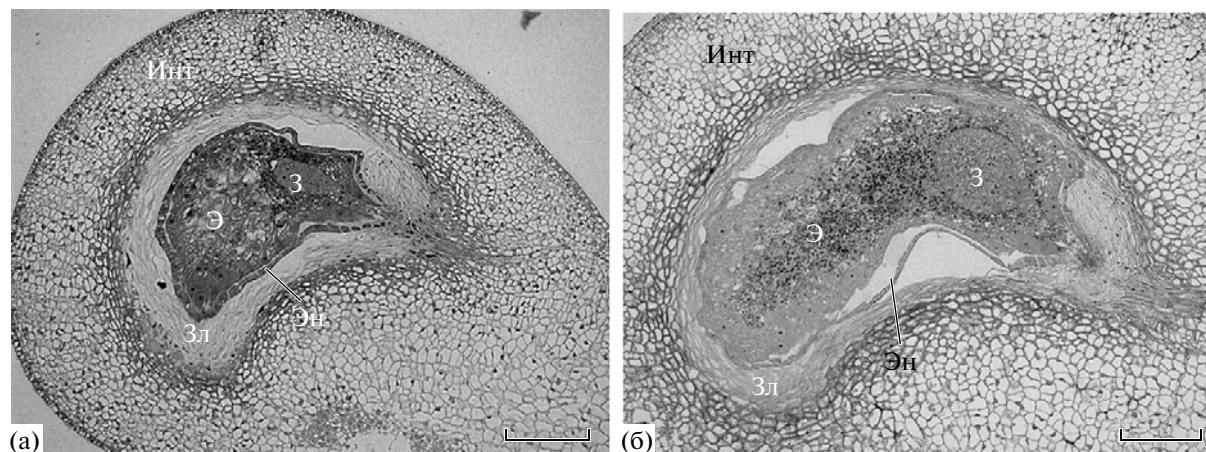


Рис. 5. Продольный срединный срез семячатков томата исходной линии ЯЛФ в фазах раннего (а) и шаровидного (б) зародыша. Обозначения: З – зародыш; Э – эндосперм; Эн – эндотелий; Зл – зона лизиса; Инт – интегумент. Масштаб 100 мкм.

ренцировка интегумента и пролиферация клеток эндотелия не блокируется, что кардинально изменяет картину развития семяпочки. Подробный анализ растущих семяпочек дает возможность выделить несколько ключевых этапов их развития. На ранних этапах роста неоплодотворенной семяпочки пролиферирующие клетки эндотелия постепенно заполняют область, ранее занятую зародышевым мешком, вызывая его сжатие и деградацию (рис. 6а). В результате на месте зародышевого мешка формируется замещающая ткань. Важной особенностью клеток замещающей ткани является наличие вакуолизированной цитоплазмы и крупных, возможно, полиплоидных ядер. Интересно, что сама ткань по структуре неоднородна и состоит из отдельных, обособленных кластеров клеток, заключенных в общую утолщенную оболочку (рис. 6б).

По мере роста семяпочки зона, занимаемая замещающей тканью, увеличивается в размере, по видимому, за счет продолжающейся пролиферации клеток. На этом этапе роста новообразованная ткань отделяется от интегумента зоной сплюснутых мертвых клеток с утолщенными оболочками (рис. 6в).

На более поздних этапах роста семяпочки слой мертвых клеток вокруг ткани, заместившей зародышевый мешок, увеличивается в размерах и полностью изолирует ее от интегумента. В конечном итоге у зрелых плодов замещающая ткань полностью деградирует, что сопровождается лизисом составляющих ее клеток (рис. 6г).

Формирование мужского гаметофита

У трансгенных растений томата с аномальным фенотипом наблюдались существенные нарушения в формировании мужского гаметофита. На рис. 7 представлена пыльца на двух этапах развития: стадии микроспор и зрелых пыльцевых зерен у контрольных растений (линии ЯЛФ) (рис. 7а, 7б) и трансгенных линий с нарушениями развития генеративных органов (рис. 7в, 7г). На стадии формирования микроспор в пыльниках цветков аномальных растений содержится много деформированных клеток с сильно вакуолизированной цитоплазмой, различающихся по размеру и форме (рис. 7в). Анализ зрелых пыльников показал, что сформированные пыльцевые зерна резко отличались от контрольных по структуре цитоплазматического компартмента (рис. 5г). Оставшаяся часть клеток (около половины) останавливалась в своем развитии на стадии микроспоры.

ОБСУЖДЕНИЕ

Детальный анализ завязей и семячатков показал, что у полученных в результате агробактериальной трансформации растений томата с аномальным фенотипом, экспрессирующих гены хитинсвязывающих белков (*ac*, *Rs-intron-Shir*) и гевеиноподобных антимикробных пептидов (*amp2*), нарушена идентичность флоральной меристемы. Это проявляется в образовании эктопических побегов внутри завязи и формировании на них новых цветоносов, что приводит к развитию многоярусных соцветий и плодов, число которых, вероятно, ограничивается только ресурсами самого растения.

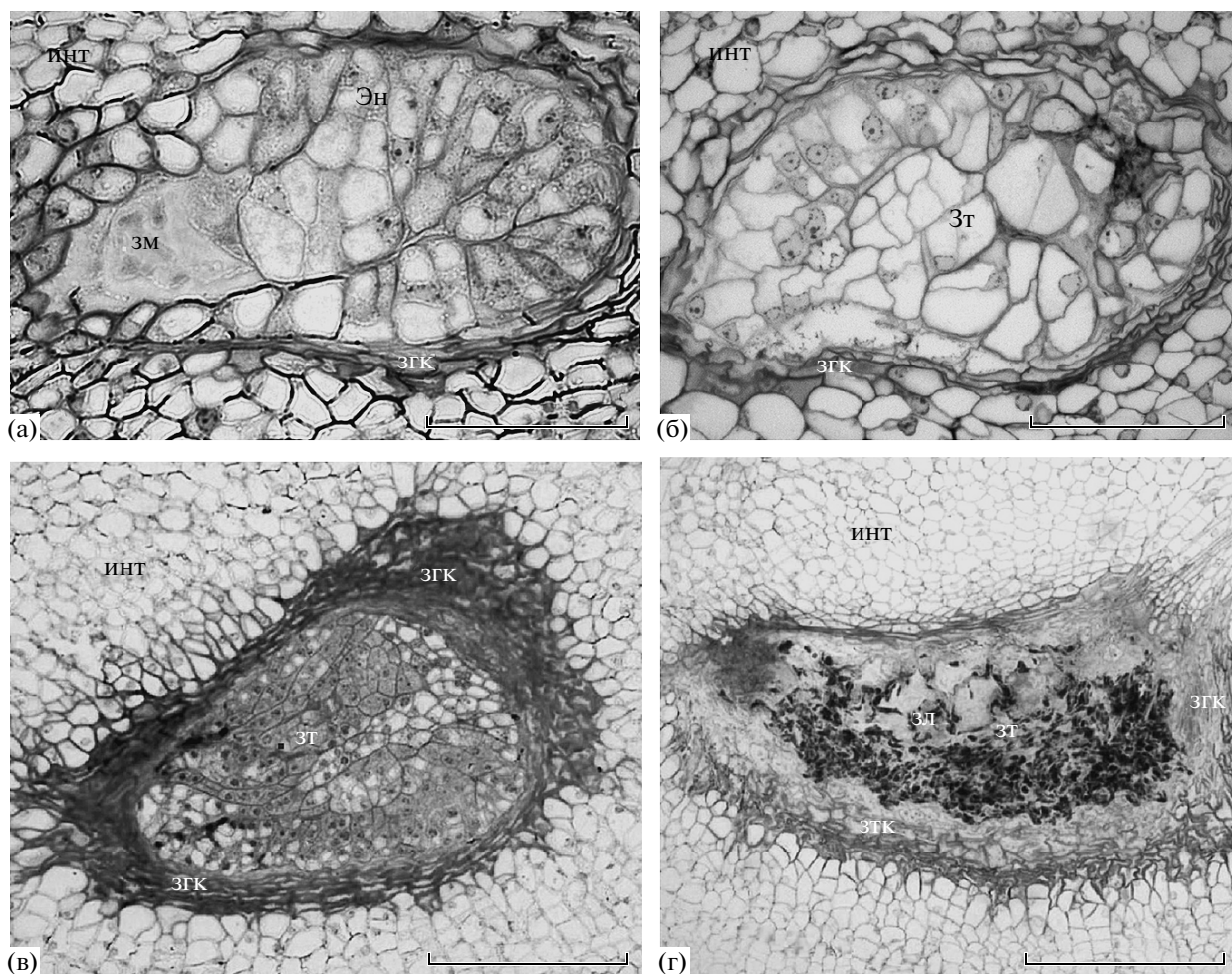


Рис. 6. Последовательные этапы формирования ткани, замещающей зародышевый мешок, в семячатках партенокарпического плода трансгенной линии с аномальным фенотипом. (а) – Начало пролиферации клеток эндотелия. (б) – Сформированная эндотелием замещающая ткань, окруженная слоем мертвых сплюснутых клеток интегумента. (в) – Разросшаяся замещающая ткань зрелого плода. Замещающую ткань окружает толстый слой мертвых клеток интегумента. (г) – Деградация замещающей ткани и лизис ее клеток. Обозначения: зм – зародышевый мешок; Эн – клетки эндотелия; инт – интегумент; зт – замещающая ткань; згк – зона гибели клеток; зл – зона лизиса. Масштаб 100 мкм.

Перечисленные трансгенные линии томата были получены в 2006–2007 гг. Трансгенные линии с каждым из перечисленных генов, у которых отмечены нарушения генеративных органов, до настоящего времени выращиваются в условиях защищенного грунта. Поддержание растений проводится с 2007 г. путем вегетативного размножения (черенкования). При этом в каждом вегетативном поколении у растений сохранялись изменения, отмеченные у первичных трансгенных растений. Таким образом, с 2007 г. и по настоящее время было получено, как минимум, 6 вегетативных поколений. На основании этих данных можно сделать вывод, что отмеченные аномалии в развитии генеративных органов не являются мор-

фозами, так как они сохраняются в последующих вегетативных поколениях.

Сопоставление с данными литературы показывает, что изученные трансгенные линии с длительно наследующимися вегетативными изменениями сходны с естественным мутантом томата *Clausa* (Avivi et al., 2000). Кроме того, они являются практически полными фенокопиями трансгенных растений, у которых блокирована экспрессия генов *LeTGA1* и *SOLly GLB1* (Wang, Campbell, 2008), а также одного из представителей класса MADS-боксов генов (*TM29*) (Amromah-Dwamena et al., 2002). На основании этих данных логично предположить, что возможная причина появления подобных нарушений в наших экспериментах – прямое или опосредованное влияние

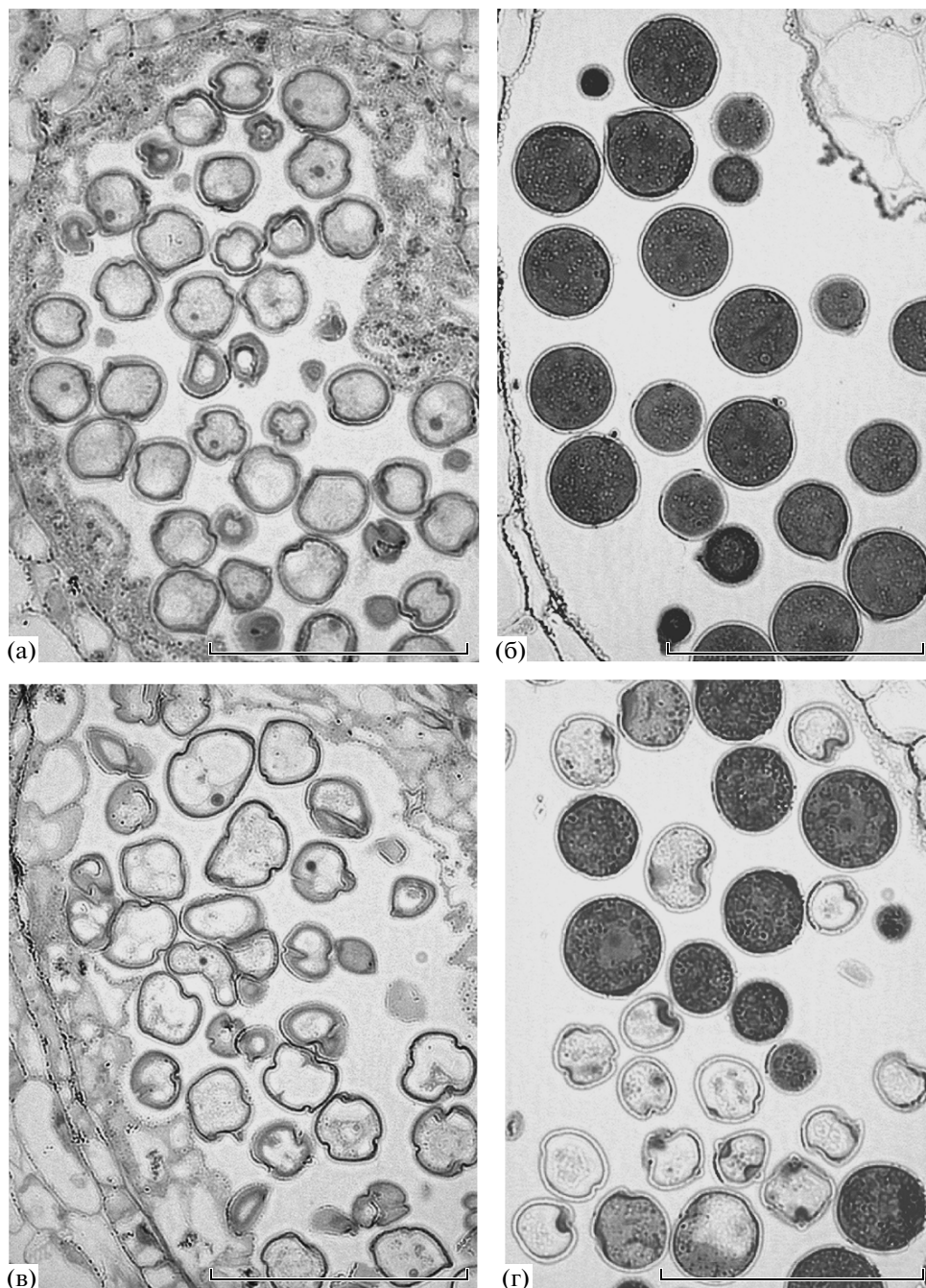


Рис. 7. Пыльца томата линии ЯЛФ (а, б) и трансгенных растений с аномальным фенотипом (в, г) на стадиях микро-спор (а, в) и зрелых пыльцевых зерен (б, г). Масштаб 100 мкм.

агробактериальной трансформации на изменение экспрессии генов транскрипционных факторов, содержащих MADS-домены и контролирующих включение каскада генов, необходимых для нормального развития растений (Gramzow, Theissen, 2010).

Точные причины, по которым у трансгенных линий нарушается координированная экспрес-

сия MADS-боксов генов, остаются неизвестными. Одной из них может служить инсерция Т-ДНК в транскрипционно активные районы генома (Wilson et al., 2006; Deineko et al., 2007). Изменения в структуре генов, кодирующих факторы транскрипции, могут вызвать каскад нарушений экспрессии комплекса различных генов, в том числе MADS-боксов генов (Colombo et al., 2008).

В связи с тем, что нарушения в развитии генеративных органов у изученных трансгенных линий имеют сходный характер, можно сделать предположение об интеграции трансгена в один и тот же участок генома, то есть о наличии предпочтительного района встраивания экзогенной ДНК (“горячих точек” интеграции). Однако это предположение плохо согласуется с экспериментальными данными, показывающими высокую частоту встречаемости трансгенных растений с аномальным фенотипом среди всей популяции трансформантов (16.7; 10.0 и 9.1% с геном *ac*, *RS-intron-Shir* и *amp2* соответственно). Отсутствие “горячих точек” интеграции чужеродной ДНК в геноме томата отмечено также другими исследователями (Chyi et al., 1986).

Данные молекулярно-генетического анализа свидетельствуют о том, что возникновение аномалий у трансгенных растений не связано с видом привнесенного в растительный геном защитного гена, а также его экспрессией. По результатам ОТ-ПЦР экспрессия генов *ac*, *RS-intron-Shir* и *amp2* отмечена также у ряда линий, у которых в норме происходило формирование плодов с полноценными семенами.

Возникает вопрос, возможно ли возникновение аналогичных изменений у нетрансгенных растений, прошедших через культуру *in vitro*. По данным литературы (Bhatia, Ashwath, 2004; Cristea et al., 2010; Osman et al., 2010) ни у одного из многочисленных растений томата, полученных *in vitro* из различных соматических тканей при культивировании на средах с широким диапазоном регуляторов роста, не отмечено нарушений развития генеративных органов. Все они характеризовались нормальным цветением, плодоношением и образованием полноценных жизнеспособных семян.

По нашему мнению, наиболее вероятной причиной появления трансгенных линий с нарушением идентичности флоральной меристемы является соматическая изменчивость. Скорее всего, это обусловлено тем, что процессу органогенеза побегов предшествовало формирование каллусной ткани, которая, в свою очередь, в течение длительного времени (3–4 месяцев) культивировалась на среде с высокими концентрациями селективного агента и регуляторов роста. Действительно, в настоящее время установлено, что сопровождающая в условиях *in vitro* стресс активация эпигенетических факторов таких, как, например, метилирование ДНК или ацетилирование белков хроматина (Hirayama, Shinozaki, 2010), влияет на экспрессию MADS-боксов генов (Gaffe et al., 2011).

Сравнительное исследование завязей в фазе сформированного зародышевого мешка показало, что у всех проанализированных растений (исходной линии ЯЛФ, трансгенных растений без фенотипических отклонений и с нарушением развития генеративных органов) не наблюдается аномалий в формировании яйцевого аппарата, антипод и вторичных ядер. Это означает, что у аномальных трансгенных растений мейоз при образовании мегаспор не блокируется и, по-видимому, проходит без отклонений. В то же время, у них наблюдаются существенные нарушения в формировании мужского гаметофита, что, по нашему мнению, является основной причиной отсутствия нормального оплодотворения. В связи с этим, дальнейшая судьба зародышевого мешка у растений без и с нарушением развития генеративных органов кардинально различается. После оплодотворения у растений линии ЯЛФ и трансгенных растений без выраженных фенотипических отклонений наблюдалось полноценное развитие зародышевого мешка, тогда как у аномальных линий зародышевый мешок дегенерировал. Детальный анализ растущих семязпочек показал, что на месте зародышевого мешка формируется и разрастается ткань, по структуре отличающаяся как от зародышевой, так и от эндоспермальной ткани типичной семязпочки. Морфогенез этой ткани остается недостаточно изученным. По нашим наблюдениям ее формирование происходит в результате продолжающейся пролиферации клеток эндотелия, которые утратили способность к характерной им дифференцировке в связи с деградацией зародышевого мешка. Это согласуется с данными исследователей, отмечавших разрастание эндотелия в семязчатках гибридных плодов у представителей семейства пасленовых (Cooper, Brink, 1945; Банникова, 1975; Kataoka et al., 2003). Конечным этапом развития замещающей ткани является ее гибель, сопровождающаяся лизисом клеток. В конечном итоге, у полученных в результате агробактериальной трансформации аномальных растений формируются партенокарпические плоды, не содержащие полноценных семян. Процесс, при котором развитие зародышевого мешка блокируется, а развитие и дифференцировка соматических тканей продолжается, принято называть стимулятивной партенокарпией (Поддубная-Арнольди, 1976).

У представителей семейства Solanaceae партенокарпия — довольно частое явление, наблюдающееся при гибридизации или в связи с изменениями условий культивирования (Bianchi, Soressi, 1969; Gorquet et al., 2005). Известно, что партенокарпию у томатов можно индуцировать искус-

ственно путем аппликации фитогормонов (Serrani et al., 2007; Serrani et al., 2008; de Jong et al., 2009). В партенокарпическом сорте томата Северянин аппликация униконазола — реагента, ингибирующего эндогенный синтез гиббереллина, супрессирует развитие псевдоэмбриональной ткани и соответственно блокирует формирование партенокарпических плодов (Kataoka et al., 2003). На основании этих экспериментов авторы высказали предположение, что фитогормоны генерирует именно такая псевдоэмбриональная ткань, имитирующая развитие зародышевого мешка.

В то же время, в ранних работах было показано, что образование партенокарпических плодов у томата можно индуцировать аппликацией экстрактов пыльцы на рыльце пестика (Gustafson, 1937). Это означает, что определенной гормональной активностью обладают клетки пыльцевых зерен. Возможно, у полученных нами аномальных растений дефектная пыльца, не способная к нормальному оплодотворению, но продуцирующая фитогормоны, является своего рода триггером, запускающим процесс партенокарпического развития семян. Естественно, это не исключает влияния на дальнейшее развитие плода фитогормонов (ауксинов и гиббереллинов), которые контролируют рост плода на клеточном уровне (Gorquet et al., 2005; Serrani et al., 2008; de Jong et al., 2009). По современным данным этот процесс осуществляется преимущественно за счет эндоредупликации ДНК в клетках тканей перикарпия (Cheniclet et al., 2005; Mathieu-Rivet et al., 2010; Bourdon et al., 2011). Действительно, как показал цитофотометрический анализ многоярусного плода исследуемой трансгенной линии томата, размеры одинаковых по зрелости плодов непосредственно связаны с количеством полиплоидных клеток и с уровнем их плоидности.

В то же время, в одинаковых по величине и зрелости плодах контрольных растений и трансгенных растений с нарушением развития генеративных органов максимальная плоидность клеток одинакова (32С), а количество полиплоидных клеток у последних достоверно выше. Это означает, что эндоредупликация ДНК (или полиплоидизация клеток) не является единственным способом увеличения размера плодов (по крайней мере, в рамках использованной модели).

Суммируя полученные в работе результаты, можно прийти к выводу, что независимо от причин, которые лежат в основе появления аномалий в развитии генеративных органов, трансгенные растения с нарушениями идентичности флоральной меристемы представляют собой уникальную модель для анализа различных аспектов взаимо-

отношений между репродуктивными и соматическими (материнскими) тканями покрытосеменных растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-32214.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова В.П.* Цитоэмбриология межвидовой несовместимости у растений. Киев: Науково думко, 1975. 283 с.
- Поддубная-Арнольди В.А.* Цитоэмбриология покрытосеменных растений. Основы и перспективы. М.: Наука, 1976. 507с.
- Уикли Б.* Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с.
- Халилуев М.Р., Харченко П.Н., Долгов С.В.* Генетическая трансформация томата (*Solanum lycopersicum* L.) генами защитных хитинсвязывающих белков и антимикробных пептидов // Известия ТСХА. 2010. № 6. С. 75–83.
- Ampomah-Dwamena C., Morris B.A., Sutherland P. et al.* Down-regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. № 2. P. 605–617.
- Avivi Y., Lev-Yadun S., Morozova N. et al.* *Clausa*, a tomato mutant with a wide range of phenotypic perturbations, displays a cell type-dependent expression of the homeobox gene *LeT6/TKn2* // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. № 2. P. 541–551.
- Bavrina T.V., Milyaeva E.L., Getman I.A. et al.* Manifestation and inheritance of *tpd1* phenotype in the tobacco insertion mutant with extended flowering period // *Russ. J. Plant Physiol.* 2007. V. 54. № 5. P. 646–652.
- Bianchi A., Soressi G.P.* Mutanti di pomodoro artificialmente indotti suscettibili di utilizzazione nel miglioramento genetico // *Sementi Elette XV.* 1969. V. 3. P. 2–6.
- Bhatia P., Ashwath N.* Comparative performance of micropropagated and seed-grown tomato plants // *Biol. Plant.* 2004. V. 48. № 4. P. 625–628.
- Bourdon M., Coriton O., Pirrello J. et al.* In *Planta* quantification of endoreduplication using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) // *J. Plant Sci.* 2011. V. 66. № 6. P. 1089–1099.
- Cassells A.C., Curry R.F.* Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers // *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 2001. V. 64. P. 145–157.
- Castle L.A., Meinke D.W.* A *FUSCA* gene of *Arabidopsis* encodes a novel protein essential for plant development // *Plant Cell.* 1994. V. 6. № 1. P. 25–41.
- Cheniclet C., Rong W.Y., Causse M. et al.* Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit

- growth // *Plant Physiol.* 2005. V. 139. № 4. P. 1984–1994.
- Chyi Y.S., Jorgensen R.A., Goldstein D. et al. Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated transfer DNA insertions in the *Lycopersicon* genome // *Mol. Gen. Genet.* 1986. V. 204. № 1. P. 64–69.
- Colombo M., Masiero S., Vanzulli S. et al. *AGL23*, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2008. V. 54. № 6. P. 1037–1048.
- Cooper D.C., Brink R.A. Seed collapse following matings between diploid and tetraploid races of *Lycopersicon pimpinellifolium* // *Genetics.* 1945. V. 30. P. 376–401.
- Cristea T.O., Prisecaru M., Calin M. A comparative study regarding some phenotypic and genetic features *in vitro* micropropagated and seed-borne tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants // *Sci. Studies and Res. Ser. Biology.* V. 18 P. 51–54.
- 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.
- Deineko E.V., Zagorskaya A.A., Shumny V.K. T-DNA-induced mutations in transgenic plants // *Russ. J. Genet.* 2003. V. 43. № 1. P. 5–17.
- Enikeev A.G., Kopytina T.V., Semenova L.A. et al. *Agrobacterium* transformation as complex biotical factor // *J. Stress Physiol. Biochem.* 2008. V. 4. № 1. P. 11–19.
- Evans D.A., Sharp W.R., Medina-Filho H.P. Somaclonal and gametoclonal variation // *Amer. J. Bot.* 1984. V. 71. № 6. P. 759–774.
- Feldmann K.A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutation spectrum // *Plant J.* 1991. V. 1. № 1. P. 71–82.
- Gaffe J., Lemercier C., Alcaraz J.P. et al. Identification of three tomato flower and fruit MADS-box proteins with a putative histone deacetylase binding domain // *Gene.* 2011. V. 471. P. 19–26.
- Gorquet B., van Heusden A.W., Lindhout P. Parthenocarpic fruit development in tomato // *Plant Biol.* 2005. V. 7. № 2. P. 131–139.
- Gramzow L., Theissen G.A. A hitchhiker's guide to the MADS world of plants // *Genome Biol.* 2010. V. 11. № 6. P. 214–224.
- Gustafson F.G. Parthenocarpy induced by pollen extracts // *Am. J. Bot.* 1937. V. 24. № 2. P. 102–107.
- Hirayama T., Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future // *Plant J.* 2010. V. 61. № 6. P. 1041–1052.
- Jain S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement // *Euphytica.* 2001. V. 118. № 2. P. 153–166.
- Kaeppler S.M., Kaeppler H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // *Plant Mol Biol.* 2000. V. 43. P. 179–188.
- Kataoka K., Uemachi A., Yazawa S. Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in pat-2 and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits // *Sci. Hort.* 2003. V. 98. № 1. P. 9–16.
- Khaliluev M.R., Mamonov A.G., Smirnov A.N. et al. Expression of genes encoding chitin-binding proteins (PR-4) and hevein-like antimicrobial peptides in transgenic tomato plants enhanced resistance to *Phytophthora infestans* // *Russ. Agricult. Sci.* 2011. V. 37. № 4. P. 297–302.
- Koncz C., Nemeth K., Redei G.P. et al. T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis* // *Plant Mol. Biol.* 1992. V. 20. P. 963–976.
- Lin Z., Arciga-Reyes L., Zhong S. et al. SITPR1, a tomato tetratricopeptide repeat protein, interacts with the ethylene receptors NR and LeETR1, modulating ethylene and auxin responses and development // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. № 15. P. 4271–4287.
- Maniatis T., Frisch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1982. 545 p.
- Mathieu-Rivet E., Gevaudant F., Cheniclet C. et al. The anaphase promoting complex activator CCS52A, a key factor for fruit growth and endoreduplication in tomato // *Plant Signaling and Behavior.* 2010. V. 5. № 8. P. 985–987.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. № 3. P. 473–497.
- Ohshima S., Murata M., Sanamoto W., et al. Cloning and molecular analysis of *Arabidopsis* gene Terminal Flower 1 // *Mol. Gen. Genet.* 1997. V. 254. № 2. P. 186–194.
- Osman M.G., Khalafalla M.M. Promotion of *in vitro* shoot formation from shoot tip of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Omdurman) by ethylene inhibitors // *Int. J. Curr. Res.* 2010. V. 4. P. 082–086.
- Serrani J.C., Fos M., Atares A. et al. Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv. Micro-tom of tomato // *J. Plant Growth Regulation.* 2007. V. 26. № 3. P. 211–221.
- Serrani J.C., Ruiz-Rivero O., Fos M. et al. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins // *Plant J.* 2008. V. 56. № 6. P. 922–934.
- Tinland B. The integration of T-DNA into plant genomes // *Trends Plant Sci.* 1996. V. 1. № 6. P. 178–183.
- Tzfira T., Li J., Lacroix B. et al. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models // *Trends Genet.* 2004. V. 20. № 8. P. 375–383.
- Veilleux R.E., Johnson A.A.T. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization // *Plant Breed. Rev.* 1998. V. 16. P. 229–268.
- Wang Y.-H., Campbell M.A. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato elicits unexpected flower phenotypes with similar gene expression profiles // *PLoS ONE.* 2008. V. 3. № 8. P. 1–7.
- Wilson A.K., Latham J.R., Steinbrecher R.A. Transformation-induced mutations in transgenic plants: analysis and biosafety implications // *Biotech. Gen. Engineer.* 2006. V. 23. P. 209–237.

Abnormal Floral Meristem Development in Transgenic Tomato Plants Do Not Depend on the Expression of Genes Encoding Defense-Related PR-Proteins and Antimicrobial Peptides

M. R. Khaliluev^{a, b}, I. A. Chaban^a, N. V. Kononenko^a, E. N. Baranova^a,
S. V. Dolgov^{a, c}, P. N. Kharchenko^a, and V. Yu. Polyakov^a

^a All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences,
ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 Russia
e-mail: marat131084@rambler.ru

^b Russian State Agrarian University, Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev,
Russian Academy of Agricultural Sciences,
ul. Timiryazevskaya 49, Moscow, 127550 Russia

^c Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

Received February 11, 2013; in final form, June 17, 2013

Abstract—In this study, the morphological and cytoembryological analyses of the tomato plants transformed with the genes encoding chitin-binding proteins (*ac* and *RS-intron-Shir*) from *Amaranthus caudatus* L. and *A. retroflexus* L., respectively, as well as the gene *amp2* encoding hevein-like antimicrobial peptides from *Stellaria media* L., have been performed. The transgenic lines were adapted to soil and grown in the greenhouse. The analysis of putative transgenic tomato plants revealed several lines that did not differ phenotypically from the wild type plants and three lines with disruption in differentiation of the inflorescence shoot and the flower, as well as the fruit formation (modified plants of each line were transformed with a single gene as noted before). Abnormalities in the development of the generative organs were maintained for at least six vegetative generations. These transgenic plants were shown to be defective in the male gametophyte formation, fertilization, and, consequently, led to parthenocarpic fruits. The detailed analysis of growing ovules in the abnormal transgenic plants showed that the replacement tissue was formed and proliferated instead of unfertilized embryo sac. The structure of the replacement tissue differed from both embryonic and endosperm tissue of the normal ovule. The formation of the replacement tissue occurred due to continuing proliferation of the endothelial cells that lost their ability for differentiation. The final step in the development of the replacement tissue was its death, which resulted in the cell lysis. The expression of the genes used was confirmed by RT-PCR in all three lines with abnormal phenotype, as well as in several lines that did not phenotypically differ from the untransformed control. This suggests that abnormalities in the organs of the generative sphere in the transgenic plants do not depend on the expression of the foreign genes that were introduced in the tomato genome. Here, we argue that agrobacterial transformation affects, directly or indirectly, expression of genes encoding for transcription factors that can activate a gene cascade responsible for the normal plant development.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, transgenic plants, chitin-binding proteins, hevein-like antimicrobial peptides, abnormalities in the floral meristem, replacement tissue of the embryo sac