

**Обзоры, проблемы**

УДК 635.64:579.254.2:581.143.6

doi: 10.15389/agrobiol.2022.3.518rus

**ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ТОМАТА (*Solanum lycopersicum* L.):  
ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ГЕНОВ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ  
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСФОРМАЦИИ\***  
(обзор)И.М. МИХЕЛЬ<sup>1</sup>, М.Р. ХАЛИЛУЕВ<sup>1, 2</sup> ✉

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) — важнейшая продовольственная культура, которая также находит широкое применение в качестве модельного объекта в различных молекулярно-генетических исследованиях, затрагивающих вопросы вегетативного развития и репродуктивной биологии, механизмов устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам, ассоциативного симбиоза с микроорганизмами и многие другие, имеющие как фундаментальное, так и прикладное значение. Получение трансгенных растений томата, экспрессирующих чужеродные гетерологичные гены, а также растений с индуцированным сайленсингом или нокаутом собственных генов, — важная составляющая исследований в современной физиологии растений. Существует два принципиально отличающихся друг от друга подхода для введения чужеродной ДНК в геном томата. Первый (метод агробактериальной, или *Agrobacterim*-опосредованной, трансформации) основан на естественном механизме заражения растений бактериальным патогеном рода *Agrobacterim* (*A. tumefaciens* или *A. rhizogenes*) и опосредованном им переносе чужеродной ДНК в растительный геном. Второй подход основан на непосредственной доставке чужеродной ДНК в растительную клетку сквозь плазмалемму с помощью химических веществ ( $Ca^{2+}$ , полиэтиленгликоль — ПЭГ) или физических воздействий (электрический импульс или повышенное давление) (так называемые прямые методы генетической трансформации томата). При этом трансгенные растения томата можно получать как классическим способом с использованием метода культуры изолированных органов и тканей *in vitro*, так и без него (трансформация *in planta*). В представленном обзоре рассмотрены классические методы прямого введения чужеродной ДНК в геном томата (химически опосредованная трансфекция, электропорация протопластов, микроинъекция, биобаллистическая трансформация), а также методы трансформации томата *in planta* (метод пыльцевых трубок или pollen-tube pathway, электропорация зародышей зрелых семян) и проведен подробный анализ физических, генетических и физиологических факторов, влияющих на эффективность трансформации (ЭТ). Обсуждаются особенности получения растений томата как с транзientной экспрессией трансгена, так и со стабильно наследуемой вставкой в ядерный или пластидный геном. Отдельно рассмотрено применение прямых методов генетической трансформации для доставки различных систем геномного редактирования (ZFNs, TALEN, CRISPR/Cas, редакторов оснований, prime editing), получивших широкое распространение в последние 5 лет.

**Ключевые слова:** *Solanum lycopersicum* L., электропорация, ПЭГ-опосредованная трансформация, микроинъекция, биобаллистическая трансформация, трансформация *in planta*, геномное редактирование.

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) — важнейшая продовольственная культура, занимающее второе место после картофеля среди сельскохозяйственных овощных растений по валовому сбору товарной продукции. Так, по данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (FAO), мировой валовой сбор плодов томата составил в 2020 году около 186,8 млн т при выращивании на площади 5,1 млн га, из этих показателей на долю России приходилось 2,9 млн т (около 1,6 %) при площади 80,7 тыс. га (1). В России томат выращивают в различных агроэкологических условиях как в открытом, так и защищенном грунте (соответственно около 60 и 40 % валового сбора) (2, 3). Основные зоны возделывания этой культуры сосредоточены преимущественно в южных регионах страны (Краснодарский и Ставропольский края, а также Поволжский и Центрально-Черноземный районы), территории которых в большей или

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания № 0431-2022-0003.

меньшей степени подвержены первичному и/или вторичному засолению, а также другим эдафическим стрессам (4). Так, более 31 % почв в Астраханской области характеризуются высокой степенью засоления (концентрация ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{SO}_4^{2-}$  достигает соответственно 7,1 и 12,5 мМ на 100 г почвы), а также около 20 % почв представлены солонцовыми комплексами (5). Кроме того, у томата насчитывается более 45 инфекционных болезней бактериальной, грибной, вирусной и виroidной этиологии, которые в различной степени распространены на территории Российской Федерации (6, 7). Как следствие, повышение устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам — одно из приоритетных требований, предъявляемых к современным сортам и гибридам томата для реализации потенциальной урожайности. Поэтому необходимо постоянное расширение сортимента культуры с использованием как традиционных селекционных подходов, так и современных методов биотехнологии и геномной инженерии (8-10).

Помимо большой практической значимости томат находит широкое применение в качестве модельного объекта в различных фундаментальных исследованиях, затрагивающих вопросы вегетативного развития и репродуктивной биологии (11, 12), изучения механизмов устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам (9, 10, 13), ассоциативного симбиоза с микроорганизмами (14, 15), мейотической рекомбинации (16) и многие другие. Выбор такого модельного объекта обусловлено тем, что томат — относительно неприхотливое в выращивании самоопыляемое растение с коротким вегетационным периодом, высоким репродуктивным потенциалом, способное также к быстрому вегетативному размножению и отдаленной гибридизации с некоторыми видами рода *Solanum* (17). Культурный томат и родственные ему дикорастущие виды — диплоиды, кариотип которых представлен 24 хромосомами ( $2n = 2 \times 12 = 24$ ). Кроме того, томат служит удобным модельным объектом благодаря большому числу морфологических признаков, четко идентифицируемых на разных этапах онтогенеза (18, 19), а также наличию подробных генетических и молекулярных карт (20) (в особенности после полного секвенирования генома томата в 2012 году) (21) и разработанных эффективных и воспроизводимых протоколов культивирования изолированных тканей *in vitro* (10, 22). Перечисленные факторы обеспечили широкое распространение трансгенных растений томата в качестве экспериментальной модели для изучения роли экспрессии гетерологичных генов различного происхождения в основополагающих биологических процессах.

Накопленные многочисленные данные свидетельствуют, что различные генно-инженерные стратегии позволяют значительно ускорить создание новых генотипов томата с признаками, которые трудно или невозможно достичь с помощью традиционной селекции. Так, например, повышения устойчивости растений томата к фитопатогенам возможно добиться посредством гибридизации томата с родственными дикорастущими видами, например *S. pimpinellifolium* L. и *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner, с последующими многочисленными беккроссами (23, 24). Однако в таких селекционных программах могут участвовать только сравнительно близкородственные виды, способные к скрещиванию с культурным томатом; при этом процесс занимает до 15–20 лет (25). Растения *S. lycopersicum* L. с повышенной устойчивостью к грибным и бактериальным патогенам можно получать с применением различных генно-инженерных стратегий: экспрессией гетерологичных генов PR-белков (pathogenesis-related proteins — белки, синте-

зируемые в растительной клетке при атаке патогена) и антимикробных пептидов растительного, животного и грибного происхождения; метаболической инженерией фитоалексинов и гормонов; использованием генов устойчивости (R-генов); ингибированием токсичных продуктов патогена; лигнификацией растительной клеточной стенки; активацией защитных реакций растения и др.) (9). При этом длительность селекционного процесса значительно сокращается.

Генетической трансформации может быть подвергнут как ядерный, так и пластидный геном. Последний вариант имеет ряд несомненных преимуществ, поскольку чужеродные гены, интегрированные в пластидный геном, характеризуются повышенной экспрессией за счет особенностей пластидной ДНК (26, 27) — большого числа копий пластомных генов на клетку (особенно в случае гомоплазии) (26, 28), высокого уровня экспрессии трансгена вне зависимости от положения инсерции в пластидной ДНК из-за отсутствия компактной укладки хроматина (30); отсутствия эпигенетических эффектов и обусловленного ими сайленсинга трансгенов (29, 30). Все эти факторы позволяют довести выход продукта экспрессии транспластомных генов до 40 % от количества общего растворимого белка (ОРБ) (28, 29, 31). Таким образом, транспластомные растения служат перспективными биореакторами для производства гетерологичных белков медицинского и ветеринарного назначения (32-34). Также в пластидах успешно экспрессируются полицистронные кассеты, что упрощает ко-трансформацию одной мишени множеством разных генов (29). Несомненным экологическим преимуществом локализации трансгена в пластидах является наследование пластома по материнской линии, что приводит к отсутствию трансгена в пыльце и невозможности генетического загрязнения популяции (29, 33).



**Классификация прямых методов генетической трансформации растений томата.**

Существуют два принципиально отличающихся друг от друга подхода для введения чужеродной ДНК в геном томата (рис.). Первый (метод агробактериальной, или *Agrobacterim*-опосредованной, трансформации) базируется на естественном механизме заражения растений бактериальным

патогеном рода *Agrobacterim* (*A. tumefaciens* или *A. rhizogenes*) и опосредованном им переносе чужеродной ДНК в растительный геном (35-37). Вторым подходом (см. рис.) основан на непосредственной доставке чужеродной ДНК в растительную клетку сквозь плазмалемму с помощью химических веществ ( $\text{Ca}^{2+}$ , полиэтиленгликоль — ПЭГ) или физических воздействий (электрического импульса или повышенного давления) (так называемые прямые методы генетической трансформации томата). При этом трансгенные растения можно получать как классическим способом с использованием метода культуры изолированных органов и тканей *in vitro*, так и без него (трансформация *in planta*) (см. рис.). Вне зависимости от метода, применяемого для введения чужеродной ДНК в геном томата, процесс интеграции носит случайный характер (38).

Следует отметить, что каждый из прямых методов введения трансгена в геном томата имеет как преимущества, так и недостатки (39), однако все эти приемы применяются значительно реже, чем агробактериальная трансформация. Основные причины заключаются в их низкой эффективности (особенно в случае химически опосредованной трансфекции, электропорации протопластов и микроинъекции), необходимости наличия специализированного оборудования («генной пушки», микроманипулятора) и высококвалифицированного персонала, а также высокой копийности tandemно расположенных инсерций в растительной ДНК при биобаллистической трансформации, приводящей к низкой экспрессии или сайленсингу трансгена (39-41). Однако в последнее десятилетие в связи с развитием технологий сайт-специфичного редактирования генома растительных клеток (в том числе на модели томата) (42) с участием химерных белков и нуклеопротеидов, созданных на основе бактериальных или дрожжевых эндонуклеаз (43-46), прямые методы генетической трансформации находят все большее применение.

Кроме того, биобаллистическая, а также ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов остаются неотъемлемым инструментарием при создании транспластомных растений томата (34, 47).

В настоящей обзорной статье мы систематизировали имеющиеся экспериментальные данные по генетической трансформации томата перечисленными выше прямыми методами, а также проанализировали различные факторы, определяющие эффективность процесса трансформации.

Химически опосредованная трансфекция. Трансформация клеток с помощью химических соединений, облегчающих перенос ДНК через мембрану, была впервые осуществлена в 1970-х годах. В частности, была показана принципиальная возможность введения меченой экзогенной ДНК в протопласты *Ammi visnaga* (L.) Lam. (48) и *Nicotiana tabacum* (L.) (49) с помощью различных химических соединений.

Кальций-фосфатный метод был впервые использован в 1973 году для генетической трансформации клеток человека чужеродной ДНК в работе F.L. Graham и A.J. Van der Eb (50). Суть метода заключается в следующем: к буферному раствору, содержащему ДНК, добавляют сначала раствор  $\text{CaCl}_2$ , в результате чего отрицательно заряженные фосфатные группы молекул ДНК связываются с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , а затем фосфатный буфер для получения осадка  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Полученный ДНК-содержащий раствор добавляют к суспензионной культуре изолированных протопластов, лишенных клеточной стенки, которая существенно затрудняет проникновение макромолекул внутрь клетки. В первой работе по трансформации протопластов томата описанным методом ее максимальная эффективность составила 2 %

(51). Трансгенная природа шести каллусных агрегатов была доказана, однако впоследствии получить из них полноценные регенерированные побеги не удалось. Авторами продемонстрировано, что выбор типа плазмиды для генетической трансформации оказывает определяющее влияние на эффективность получения трансгенных каллусных тканей.

Применение ПЭГ для переноса ДНК через плазмалемму впервые было апробировано для генетической трансформации протопластов двух видов табака (52). В состав буферного раствора для осаждения ДНК, помимо ПЭГ, входит также  $MgCl_2$ . Впоследствии в результате ПЭГ-опосредованной трансформации пластид томата плазмидой pSSH1 были получены транспластомные растения, устойчивые к селективному антибиотику спектиномицину. ЭТ, рассчитанная на основании рестрикционного картирования, составила  $1,5 \times 10^{-6}$  (53). S. Ray с соавт. (54) модифицировали метод химически опосредованной трансфекции пластидного генома томата за счет одновременного присутствия ПЭГ и  $CaCl_2$  в буферном растворе для осаждения ДНК, а также добавления в раствор осмотика — маннитола. В результате с использованием плазмиды pCambia1302 в пластидную ДНК были интегрированы селективный и репортерный гены (соответственно *nptII* и *gfp*). Авторы установили, что вследствие большей выживаемости протопластов ПЭГ-4000 предпочтительнее, чем ПЭГ-6000. Кроме того, важным критическим параметром для сохранения жизнеспособности протопластов оказалась длительность их инкубирования в буферном растворе после трансформации и до перенесения на питательную среду для индукции процессов морфогенеза. Оптимальное значение составило 24 ч, тогда как более продолжительное инкубирование негативно влияло на жизнеспособность протопластов из-за токсического действия ПЭГ. Трансгенный статус полученных регенерантов был подтвержден полимеразной цепной реакцией (ПЦР), а также флуоресцентным анализом экспрессии репортерного гена; ЭТ авторы не определяли (54).

**М и к р о и н ъ е к ц и я.** Метод был разработан для доставки макромолекул нуклеиновых кислот в клетки человека и животных (55, 56). При этом плазмалемма клетки механически прокалывается микроиглой — очень тонкой стеклянной пипеткой с наружным диаметром 1-2 мкм, внутри которой содержится растворенная ДНК. Трансформация выполняется специально обученным оператором под микроскопом, укомплектованным микроманипулятором.

Применение этого метода существенно осложняется наличием прочной клеточной стенки и крупной вакуоли у растительной клетки. Клеточная стенка затрудняет визуализацию ядра, а ее фрагменты засоряют микроиглу, поэтому метод микроинъекций разрабатывался для трансформации голых протопластов. Точность попадания микроиглы в определенные клеточные компартменты повышается за счет иммобилизации протопластов во время микроинъекции, например если клетки помещают на агаризованную среду (57) либо прикрепляют к предметному стеклу поли-L-лизинном (58). Н. Morioka и Y. Yamada (59) разработали механический способ удержания протопластов с помощью дополнительных пипеток; ими также были применены флуоресцентные метки, обеспечивающие визуализацию введенной внутрь клетки ДНК (59). Точность микроманипуляций имеет критическое значение, поскольку при попадании микроиглы в вакуоль чужеродная ДНК разрушается гидролитическими ферментами; кроме того, нарушение целостности вакуоли может вызвать разрыв и гибель клетки из-за попадания в цитоплазму токсичных метаболитов (60).

В первых работах на модели протопластов, выделенных из гипокотилей *Brassica napus* L., была оценена выживаемость протопластов после введения в них чужеродной ДНК, а также их последующая способность к делению и формированию микрокалуса с частотой соответственно до 70, 65 и 50 %. Авторами установлено, что на эффективность этих процессов влияют следующие факторы: генотип, возраст интактного экспланта, состав питательной среды для культивирования протопластов, а также рН буферного раствора (61). Однако трансгенные растения впоследствии были получены только для ограниченного числа культур, в том числе растений семейства *Solanaceae* — петунии (62), табака (63), а также для ячменя (64). Экспериментальная работа японских исследователей по генетической трансформации интактных каллусных клеток томата методом микроинъекции была опубликована одной из первых в 1988 году. Использовав плазмиду pE2KX, содержащую ген *npt II*, который обуславливает устойчивость к аминогликозидным антибиотикам, авторы оптимизировали параметры, определяющие ЭТ, — размер микроиглы (применение микроиглы с наружным диаметром более 0,3 мкм приводит к необратимым повреждениям клеточных структур и гибели 90-95 % трансформированных клеток) и длительность процедуры микроинъекции (если она превышает 20 с, происходит необратимая структурно-функциональная дезорганизация ядра и других мембранных органелл). В результате селективного отбора выживших инъецированных клеток на питательной среде с добавлением канамицина частота формирования каллусных агрегатов спустя 1 мес культивирования составила 22 %, их трансгенная природа была подтверждена ПЦР-анализом по наличию гена *npt II* (65). Значения ЭТ, варьирующие в зависимости от изученных факторов в пределах 15-20 %, были сопоставимы с полученными на культуре протопластов люцерны (15-26 %) при введении различных плазмид (pTiC58, pMON8015, pMON120, pAL4404/pMON120) (66).

**Электропорация.** Суть метода заключается в том, что при воздействии электрического импульса в плазмалемме клетки образуются поры диаметром порядка 30 нм, существующие несколько минут, с последующим восстановлением нормального состояния мембраны. Кратковременное формирование пор достаточно для проникновения в цитоплазму клетки крупных водорастворимых макромолекул, в частности ДНК (67-70). Трансформация осуществляется с помощью прибора — электропоратора, который состоит из кюветы, пары электродов и генератора импульсов заданной формы (71). В кювету с буферным раствором добавляют суспензию трансформируемых клеток и векторные конструкции с целевыми генами, после чего сквозь раствор пропускают электрический импульс (обычно прямоугольный либо экспоненциальный) (72). Наибольшая ЭТ достигается при напряженности поля 1-20 кВ/см и длительности импульса 1-30 мс, однако для каждого типа клеток оптимальные значения подбираются эмпирически. Критические значения этих физических параметров для формирования пор и успешного транспорта ДНК сквозь плазмалемму клетки определяются ее собственным мембранным потенциалом, а также потенциалом, возникающим под действием внешнего электрического поля (73). При этом ЭТ в большинстве случаев имеет случайную составляющую, поскольку клетки в растворе находятся в неодинаковых условиях и, следовательно, приобретают различные потенциалы (74). ЭТ может быть увеличена за счет добавления в буферный раствор для электропорации различных компонентов, например ионов  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$ , ПЭГ для увеличения пермеабиллизации мембран (75) или 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновоу кислоты (HEPES) для поддержания оптимального значения рН (76).

Существенным ограничением широкого применения метода электропорации для растительных объектов является наличие клеточной стенки (77, 78). Применение культуры протопластов, лишенных клеточной стенки, значительно снижает ЭТ, поскольку последующее получение из них полноценных растений-регенерантов крайне затруднено для многих видов. Получение стабильных трансгенных линий ряда культур оказалось возможным в случае адаптации методики электропорации, разработанной для изолированных протопластов, для применения на интактных клетках. Такой подход показал свою эффективность при получении стабильно наследуемой инсерции трансгена в геноме кукурузы, однако для достижения положительного результата авторами продемонстрирована необходимость частичного нарушения клеточной стенки и увеличения пермеабиллизации мембран у трансформируемых клеток (79).

О получении трансгенных растений томата методом электропорации впервые сообщили еще в 1989 году две независимые группы исследователей (80, 81). Так, С. Bellini с соавт. (80) вводили чужеродную ДНК в протопласты двух видов рода *Solanum* — *S. lycopersicum* L. и дикорастущего вида томата *S. peruvianum* L. ЭТ, рассчитанная как отношение числа устойчивых к селективному антибиотику трансформированных колоний к их общему числу, варьировала в пределах 0,3-2,5 %. Максимальная ЭТ достигалась при обработке протопластов трехкратным импульсом длительностью 100 мкс, создающим напряжение 250 В либо 300 В. Из трансформированных протопластов впоследствии были успешно получены растения-регенеранты (80). В работе М. Tsukada с соавт. (81) для генетической трансформации протопластов культурного томата сорта Petit Tomato использовали однократные импульсы экспоненциальной формы, возникающие в результате быстрого разряда предварительно заряженного конденсатора. Наилучшие результаты были достигнуты в случае напряженности электрического поля 1 кВ/см при разряде конденсатора 47 мкФ (81).

На модели протопластов дикого вида *S. peruvianum* L. была проведена оптимизация ряда физических и физиологических факторов, влияющих на процесс введения чужеродной ДНК, — состава буферного раствора для электропорации ( $\text{Ca}^{2+}$ - либо  $\text{Mg}^{2+}$ -содержащий буферный раствор при наличии или отсутствии ПЭГ), концентрации клеток в суспензии протопластов, их предобработки (тепловой шок), а также параметров импульса (75). Максимальная эффективность процесса электропорации была достигнута при соблюдении следующих условий: применение  $\text{Ca}^{2+}$ -буферного раствора и теплового шока в течение 5 мин при температуре 45 °С с последующим добавлением 8 % ПЭГ, а также прямоугольного импульса длительностью 30 мкс с напряженностью электрического поля 1,5 кВ/см.

Биобаллистическая трансформация. Этот прямой метод доставки макромолекул нуклеиновых кислот в растительные клетки был разработан Джоном Сэнфордом (John Sanford) в Корнельском университете (США) в 1984 году (82). Суть метода заключается в том, что молекулы ДНК наносят на поверхность носителей — золотых или вольфрамовых микрочастиц (83-95) (табл. 1) либо наночастиц (96), которые разгоняются до скорости 300-600 м/с за счет величины давления гелия. Ими осуществляют бомбардировку различных эксплантов, размещенных на мишени. Поскольку частицы, имеющие такую высокую скорость, успешно проникают сквозь клеточную стенку, биобаллистический метод пригоден для трансформации интактных клеток, что служит важным преимуществом, позволяя избежать этапов изоляции протопластов и последующего низкоэффективного морфогенеза (83).

### 1. Биобаллистический метод генетической трансформации томата и факторы, влияющие на его эффективность

Вид трансформации <sup>1</sup> и локализация трансгена <sup>2</sup>	Эксплант, генотип	Модель установки (производитель)	Параметры биобаллистической трансформации			Селективный и/или репортерный ген <sup>4</sup>	ЭТ, %	Примечание	Ссылка
			расстояние между макроносителем частиц и стоп-экраном, см	давление гелия, psi	тип <sup>3</sup> и размер микрочастиц, мкм				
T	Суспензионная культура клеток томата сорта VFNT Cherry и <i>Solanum pennellii</i> Correll.	PDS-1000/He <sup>TM</sup> («Bio-Rad»)	8,5	нд	W, 1,0	<i>nptII, uidA (gus)</i>	1,2 (VFNT Cherry) и 45,0	ЭТ определяли как отношение числа устойчивых к канамицину каллусов к числу клеток, у которых наблюдалась транзистентная экспрессия репортерного гена после 48 ч обстрела	(83)
T	Листья, незрелые плоды диаметром 5-8 мм томата сорта VFNT Cherry LA 1221	PDS-1000/He <sup>TM</sup> («Bio-Rad»)	8,5	1500, 1800 (оптимум — 1800)	Au, 0,4-1,2	<i>luc uau uidA (gus)</i>	нд	Оптимизированы параметры биобаллистической трансформации для транзистентной экспрессии	(89)
СП	Листья томата сорта IAC-Santa Clara	PDS-1000/He <sup>TM</sup> («DuPont»)	нд	1100	Au, 0,6	<i>aadA</i>	2,5* 1,15**	* Отношение числа каллусов, устойчивых к спектиномицину, к общему числу трансформированных эксплантов ** Отношение числа регенерантов с подтвержденной посредством ПЦР инсерцией трансгена к исходному числу трансформированных эксплантов	(28)
СП	Листья томата линии IPA-6	PDS-1000/He <sup>TM</sup> (Bio-Rad) с Hepta Adaptor («Mologen»)	нд	нд	Au, 0,6	<i>aadA</i>	нд	Получение стабильно наследуемых транспластомных растений, экспрессирующих бактериальную ликопин-β-циклазу, с повышенной устойчивостью к гербицидам и 4-кратным увеличением содержания провитамина А в плодах	(90)



<i>Продолжение таблицы</i>										
СЯ	Фрагменты гипокотыля томата сорта CastleRock	PDS-1000/He™ («Bio-Rad»)	6,0 и 9,0	1350	Au, нд	<i>bar, uidA (gus)</i>	26,5	ЭТ определяли как отношение числа первичных трансформантов с подтвержденным посредством ПЦР статусом к общему числу регенерантов	(91)	
Т	Апикальная меристема, семядоли и фрагменты гипокотыля <i>S</i> томата линии IPA-3	PDS-1000/He™ («Bio-Rad»)	2,5-10,0 (оптимум — 7,5)	1100	W, 0,6	<i>uidA (gus)</i>	от 22,69 до 36,56	ЭТ определяли как отношение числа эксплантов с активностью GUS к общему числу трансформированных эксплантов; максимальную ЭТ (36,56 %) отмечали при использовании фрагментов гипокотилей	(84)	
СЯ	Фрагменты гипокотыля томата сорта CastleRock	PDS-1000/He™ («Bio-Rad»)	6,0 и 9,0	1350	Au, 1,0	<i>hpt</i>	42,5	ЭТ определяли как отношение числа подтвержденных ПЦР-анализом трансгенных регенерантов к общему числу гигромицин-устойчивых регенерантов	(92)	
СЯ	Фрагменты гипокотыля с семядолей (гиподольные экспланты) томата сорта CastleRock	PDS-1000/He™ («Bio-Rad»)	6,0 и 9,0	1350	Au, 1,0	<i>hpt</i>	52,3	То же, что и (92)	(93)	
Т, СЯ	Фрагменты листьев и плодов томата сорта Ferum	Gene Gun Helios System («Bio-Rad»)	нд	210	W, 1,1	<i>luc</i> или <i>uidA (gus)</i>	нд	Изучение активности плодоспецифичного промотора гена <i>SIPPC2</i> , кодирующего фосфоенолпируваткарбоксилазу (ЕС 4.1.1.31) томата	(85)	
Т	Фрагменты различных частей плода томата линии F-144	Scientz GJ-1000 («Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd»)	1,0, 3,0 и 6,0 (оптимум — 6,0)	500, 650 и 1100 (оптимум — 1100) <sup>5</sup>	W, 1,0	<i>uidA (gus)</i>	нд	Наибольшее число окрашенных в результате GUS-реакции синих точек составило 2456,91/см <sup>2</sup> в районе места крепления плода томата к плодоножке	(86)	
СЯ	Каллусная ткань, полученная из листьев томата сорта Pusa Ruby	PDS-1000/He™ («Bio-Rad»)	6,0, 9,0 и 12,0 (оптимум — 9,0)	1100	нд	<i>nptII, uidA (gus)</i>	75,0	Максимальную ЭТ (75 %) отмечали в случае, когда расстояние между макроносителем частиц и стоп-экраном составляло 9,0 см.	(102)	

Продолжение таблицы

Т	Каллусная ткань, полученная из зрелых зародышей томата сорта Венгура	Пневматическая генная пушка конструкции Саляева (102)	нд	нд	W, 1,1-1,2	<i>uidA (gus)</i>	80,0	Транзистентная экспрессия гена <i>gus</i> подтверждена гистохимическим методом с использованием субстрата X-Gluc <sup>5</sup>	(87)
СП	Каллусная ткань, полученная из зрелых зародышей томата сорта Венгура	Пневматическая генная пушка конструкции Саляева (102)	нд	нд	W, 1,1-1,2	нд	нд	Получены транспластомные растения томата, содержащие ген <i>hvp16 L1</i> , кодирующий синтез основного антигенного белка папилломавируса человека высокоонкогенного типа HPV16 L1, содержание которого составляет до 5300 нг/мг общего растворимого белка	(88)
СЯ	Фрагменты гипокотила томата сорта Rutgers	PDS-1000/He™ («DuPont»)	6,0 и 9,0 (оптимум — 9,0)	1200	Au, 0,73	<i>nptII, uidA (gus)</i>	нд	Трансгенная природа полученных растений подтверждена ПЦР-анализом, а также экспрессией репортерного гена на основании гистохимического окрашивания на β-глоконолидазную активность	(94)
СП	Листья томата сорта Microtom	PDS-1000/He™ («Bio-Rad»)	12,0	1100	Au, 0,6	<i>aadA</i>	нд	Получение стабильных транспластомных растений с индуцированной РНК-интерференцией для борьбы с насекомыми-вредителями	(95)

Примечание. <sup>1</sup> — стабильная трансформация (С) или транзистентная экспрессия (Т); <sup>2</sup> — ядерная (Я) или пластидная (П) трансформация; <sup>3</sup> — микрочастицы золота (Au) или вольфрама (W); <sup>4</sup> — *npt II* и *hpt*, селективные гены соответственно неомицинфосфотрансферазы II и гигромицинфосфотрансферазы *Escherichia coli*; *aadA*, селективный ген, кодирующий фермент аминогликозид-3'-аденилтрансферазу; *uidA (gus)* и *luc*, репортерные гены соответственно β-глокуронидазы и люциферазы; <sup>5</sup> — X-Gluc (5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-глокуронид); <sup>5</sup> — избыточное давление, создаваемое не гелием, а азотом, в связи с особенностями модели «генной пушки»; нд — нет данных.

Разработка прибора для обстрела микрочастицами (так называемой генной пушки) началась в 1984 году, и впоследствии идея была запатентована разработчиками (97). В дальнейшем первоначальная модель получила развитие в модификациях: He Biolistics Particle Delivery System (PDS-1000/He™; лицензирована фирмой «DuPont», США); некоммерческий вариант ускорителя Accel™ Particle Gun (98); пушка для запуска частиц Particle Inflow Gun (99); микронацеливающее устройство, разработанное для трансформации апикальных меристем (100) и Helios Gene Gun («Bio-Rad», США). Последний из перечисленных вариантов не требует вакуумной камеры для удержания ткани-мишени и может быть использован как портативное устройство (101).

Биобаллистическая трансформация — наиболее широко применяемый прямой метод введения чужеродной ДНК в клетки томата, который используется как для изучения транзientной экспрессии гетерологичных генов (83-87, 99), так и для получения трансгенных растений со стабильно наследуемой ядерной (85, 91-94, 102) или пластидной (28, 88, 90, 95) инсерцией трансгена (см. табл. 1). Наиболее часто обстрел микрочастицами растительных тканей томата осуществляют с помощью установки PDS-1000/He™ фирмы «DuPont» или «Bio-Rad» (28, 83, 84, 89-93, 94, 95) (см. табл. 1), значительно реже — серийными устройствами других производителей (86) либо устройствами, разработанными самостоятельно (103). Мишень с трансформируемыми изолированными клетками или эксплантами устанавливается в вакуумной камере с давлением порядка 0,1 атм. В момент сброса давления частицы выбрасываются из пушки в сторону мишени. Как правило, клетки, находящиеся в центре мишени, погибают из-за физического повреждения (104). Применяемая модель установки определяет следующую совокупность физических параметров биобаллистической трансформации, влияющих на эффективность процесса: концентрация ДНК, вид микрочастиц и их размер, варьирующий от 0,4 до 1,2 мкм, расстояние между макроносителем частиц и останавливающим экраном (от 6,0 до 9,0 мм), давление гелия (от 200 до 1800 psi), а также кратность выстрелов (один или несколько). Эти параметры оптимизируют с учетом возрастных и физиологических особенностей конкретных эксплантов, клетки которых подвергают обстрелу. Разработаны протоколы трансформации томата для получения стабильной и транзientной экспрессии гетерологичных генов на модели суспензионных (83) и каллусных (87, 88, 102) культур клеток, апикальной меристемы (84), фрагментов гипокотыля (84, 91, 92, 94), семядолей (84), листьев (85, 89, 90, 95) и плодов различной степени зрелости (85, 86, 89). При этом ЭТ варьирует в широких пределах (от 1,2 до 80,0 %) в зависимости от вида трансформации (стабильная или транзientная), особенностей генотипа, типа экспланта и многих других физиологических и физических факторов (см. табл. 1). Важно также отметить отсутствие универсальной методики определения ЭТ, в результате чего авторы предлагают кардинально различающиеся способы расчета этого показателя (см. табл. 1, примечание), значения которого могут различаться даже на порядок.

В 1995 году стабильные трансгенные растения томата и его дикорастущего родственного вида *S. pennellii* Correll были впервые получены методом биобаллистической трансформации (83). Обстрелу подвергались клетки суспензионной культуры, которые впоследствии культивировали на питательной среде для индукции процессов морфогенеза с добавлением селективного агента — канамицина. В исследовании использовали вектор на основе дрожжевой хромосомы (YAC) и три типа плазмид, несущих гены *uidA* (*gus*) и *nptII*. Авторы продемонстрировали транзientную экспрессию GUS

во всех случаях, однако число отобранных канамицин-устойчивых каллусов у дикого вида было значительно больше, чем у культурного сорта при сопоставимом уровне транзientной экспрессии. Отмеченный факт свидетельствует о том, что стабильная трансформация генотип-специфична, и причиной тому служит генетическая детерминированность различных генотипов и соматических тканей к морфогенезу *in vitro* (10, 22, 105, 106). В целом генотипы представителей рода *Solanum* можно расположить в следующем порядке по морфогенетическому потенциалу: близкородственные дикие виды томата *S. pimpinellifolium* L., *S. peruvianum* L. и *S. glandulosum* (L.) Mongong > *S. lycopersicum* L. (107); модельные генотипы, не имеющие практического значения > коммерчески значимые сорта и гибриды F<sub>1</sub> (10); сорта *S. lycopersicum* L. > гибриды F<sub>1</sub> *S. lycopersicum* L. (108).

В исследовании D. Ruma с соавт. (84) проведена оптимизация физических параметров биобаллистической трансформации при транзientной экспрессии репортерного гена *uidA* (*gus*) в различных эксплантах томата линии IPA-3. Максимальная ЭТ, которая для апикальной меристемы, фрагментов гипокотилей и семядолей составила соответственно 34,12; 36,56 и 22,69 %, была достигнута при двукратном обстреле экспланта микрочастицами с расстояния 7,5 см и давлении гелия 1100 psi (84). Кроме того, авторы изучили биологические факторы, влияющие на частоту транзientной экспрессии репортерного гена. На один выстрел оптимальное количество плазмидной ДНК составило 1,89 мкг из расчета на 1125 мкг микрочастиц. Использование ДНК в избыточных концентрациях снижает ЭТ из-за слипания микрочастиц (109). Прекультивирование эксплантов снижало ЭТ вследствие потери механической прочности клеточных стенок у компетентных клеток. Аналогичные результаты наблюдали в случае предобработки эксплантов томата 0,3 М раствором маннитола (84). В другой работе, напротив, предобработка листьев и плодов томата осмотиком (12 % маннитолом) перед обстрелом приводила к 30-кратному повышению уровня экспрессии гетерологичного гена люциферазы (89). В исследовании L. Sun с соавт. (86) при обстреле вольфрамовыми частицами плодов томата разной степени зрелости «генной пушкой» Scientz GJ-1000 («Scientz», КНР), в которой избыточное давление достигается не гелием, а азотом, максимальная ЭТ была достигнута при однократном обстреле эксплантов микрочастицами (концентрация ДНК — 0,83 мкг из расчета на один выстрел) с расстояния 6 см при давлении азота 1100 psi (86).

Чтобы с высокой частотой (26,5 %) получить трансгенные растения томата со стабильно наследуемым геном из эксплантов гипокотыля G.A. Abu-El-Neba с соавт. (91) предложили иные значения биобаллистической трансформации: концентрация ДНК — 1 мкг; двукратный обстрел микрочастицами золота при расстоянии между макронесителем и стоп-экраном 6 и 9 см соответственно для первого и второго выстрела; давление гелия — 1350 psi (91). Указанные значения успешно применены в ряде исследовательских работ для обстрела фрагментов гипокотилей, а также других типов растительной ткани томата (92, 93, 102) с учетом индивидуальных особенностей состава питательной среды для индукции морфогенеза.

Биобаллистическая трансформация — главный метод создания транспластомных растений томата, которые впервые были получены в начале XXI века на основе коммерческого сорта IAC-Santa Clara (28). Особенность таких растений заключается в наследовании трансгена в поколениях по материнской линии. Отбор гомопластомных клеток и растений осуществляют на селективной питательной среде с добавлением спектиномицина в концентрациях 300-500 мг/л (28, 90, 95) при фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) и

пониженной освещенности (15 или 25  $\mu\text{E}$ ) (28, 95). Экспрессия целевого гена наблюдалась в разных типах пластид: хлоропластах листа, в хромопластах плодов и цветков (28).

**Трансформация in planta.** Трансформация in planta позволяет получать трансгенные растения, минуя длительный и трудоемкий этап культивирования изолированных органов и тканей in vitro. Главные преимущества трансформации растений in planta — относительная простота и быстрота, поскольку эти методы не подразумевают оснащения лаборатории специализированным биотехнологическим оборудованием вследствие отсутствия этапа культуры in vitro, тем самым исключая соматическую изменчивость (110, 111). Наилучшим материалом для трансформации in planta может считаться пыльца: ее можно получить в большом количестве, она содержит гаплоидные клетки и для трансформации можно применять практически любой из методов, апробированных ранее для трансформации протопластов и интактных клеток, — электропорацию, микроинъекцию, упаковку ДНК в липосомы, биобаллистический метод, а также *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию (112).

При прорастании трансформированной пыльцы in planta экзогенная ДНК попадает в зародышевый мешок с последующим возможным формированием трансгенного диплоидного зародыша (113, 114). Этот прием, получивший название метода пыльцевых трубок, или pollen tube pathway, был разработан и впервые применен в 1974 году на растениях семейства *Solanaceae* — *Petunia hybrida* Vilm. (115, 116) и *Nicotiana glauca* Graham (115), а также на растениях ячменя (117). Впоследствии с помощью метода пыльцевых трубок были также получены трансгенные растения хлопчатника (118), ячменя (119), ржи (120) и других сельскохозяйственных культур, в том числе различных генотипов томата (121-126).

Первая работа, где была показана возможность генетической трансформации томата с использованием метода пыльцевых трубок, была опубликована в 1989 году (121). Продолжением этого исследования стали другие работы, в частности, были получены трансгенные гибриды *S. lycopersicum* L. сорта Факел и *S. penelii* Cor. (125). При этом генетическую трансформацию пыльцы и процесс опыления проводили одновременно. Свежевысушенную пыльцу помещали в питательную среду с добавлением 15 % сахарозы, 0,018 % борной кислоты и 0,04 %  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , к которой затем добавляли раствор плазмидной ДНК. Сразу после добавления ДНК проводили опыление трансформированной пыльцой предварительно кастрированных и изолированных цветков. ЭТ, рассчитанная как отношение числа канамицин-устойчивых проростков, полученных из незрелых зародышей, к общему числу трансформированных зародышей, составила 2,2 %. Соотношение числа полученных из семян канамицин-устойчивых и канамицин-чувствительных проростков составило 3:1, что доказывает их трансгенный статус и свидетельствует об однолокусной модели наследования трансгена. Сравнительно низкая эффективность трансформации методом pollen tube pathway в значительной степени связана с нуклеазной активностью прорастающей пыльцы, в результате которой большая часть экзогенной ДНК деградирует (112).

Другая модификация метода пыльцевых трубок, основанная на более ранней работе Н.В. Турбина с соавт. (117), предполагает введение содержащего ДНК раствора в семязачаток уже оплодотворенного цветка. После опыления рыльце пестика удаляют и с помощью тонкой иглы вводят раствор, содержащий целевую последовательность ДНК (114). Этот метод также применялся для получения трансгенных растений томата (122-124).

Так, в работе R. Wang с соавт. (124) изучено влияние генотипа, концентрации плазмидной ДНК, а также компонентов буферного раствора для инъекции на ЭТ сортов томата Zhongshu 6, Liaoyuanduoli и Jinguan 9 при использовании векторной конструкции, содержащей селективный ген *bar*, обуславливающий устойчивость к фосфинотрицину, а также репортерный ген желтого флуоресцирующего белка (*yfp*). Авторами установлено отсутствие достоверных различий по ЭТ между изученными сортами. При этом наибольший выход трансгенных растений обеспечивало добавление в раствор для инъекции 600 нг/мкл плазмидной ДНК, а также 5 % сахарозы и 0,05 % сурфактанта Silvet-L-77 (124). Для описанной модификации метода pollen tube pathway критически значимы промежуток времени от опыления до трансформации и сохранность семязачатка при удалении пестика (123, 127). Установлено, что введение чужеродной ДНК следует осуществлять через 24 ч после опыления; уменьшение продолжительности этого периода снижает ЭТ (123). Что касается сохранности семязачатка, то применяются различные способы нарушения целостности пестика перед введением чужеродной ДНК, например полное удаление пестика перед инъекцией (123) либо удаление только его части (рыльца с частью столбика) (122). Вклад последнего фактора трудно оценить из-за низкой эффективности метода в целом. В зависимости от вышеперечисленных факторов ЭТ варьирует от 0,2 (124) до 1,4 % (128).

Разновидностью метода pollen tube pathway является агроинfiltrация чужеродной ДНК в различные генеративные органы растений (129, 130). Эффективность разных модификаций указанного метода достигает в среднем 3–4 %. Процедура активно используется для получения трансгенных растений арабидопсиса и других культур семейства *Brassicaceae* (131). Этот метод можно считать гибридным между pollen tube pathway и агробактериальной трансформацией. На томате обсуждаемый метод был успешно применен для введения генов *LFY* и *GUS* (132).

Высокоэффективный протокол электропорации зрелых семян томата был предложен в работе Z. Nilioti с соавт. (133) для доставки систем геномного редактирования. Стерилизованные семена инкубировали в течение 12 ч в темноте при пониженной температуре (10 °C) в растворе с добавлением 5 % сахарозы, 3 %  $\text{H}_3\text{BO}_3$  и 1,3 мМ  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Набухшие семена вакуумировали в буферном растворе (80 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 10 мМ  $\text{HEPES}$  и 0,5 М маннитол) и выдерживали на льду в течение 1 ч. Электропорацию предобработанных семян проводили в присутствии буферного раствора с добавлением плазмидной ДНК (из расчета 50 мкг на 200 мкл буфера) в режиме трех импульсов длительностью по 4 мс каждый при напряженности поля 6,25 кВ/см. Авторами продемонстрировано, что 65 % растений томата, выращенных из трансфицированных семян, содержали различные мутации целевого гена, что свидетельствует об успешной трансформации зародышей используемым вектором, кодирующим нуклеазы ZFN, и их последующей экспрессии в электропорированных зародышах (133).

Использование прямых методов генетической трансформации томата для доставки систем геномного редактирования. За последние 5 лет отмечается бум исследовательских работ, посвященных направленному внесению изменений в геном томата с помощью систем геномного редактирования ZFNs (zinc-finger nucleases — нуклеазы «цинковых пальцев»), TALEN (transcription activator-like effector nucleases — эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats — короткие палиндромные повторяющиеся элементы, расположенные группами

и равномерно удаленные друг от друга) (43, 134). В зависимости от применяемой системы можно осуществлять различные варианты геномного редактирования — посредством нокаутных мутаций, возникающих в результате инсерций или делеций части нуклеотидов в участке редактирования за счет негомологичного объединения репарируемых концов или посредством гомологичной рекомбинации; нокин-редактирование гена (knock-in) за счет введения экзогенных олигонуклеотидов или более протяженных фрагментов ДНК после внесения разрывов и последующей гомологичной рекомбинации; внесение точечных одонуклеотидных замен за счет дезаминирования азотистых оснований (CBE — cytosine base editors, редактор оснований цитозина, ABE — adenine base editors, редактор оснований аденина). Механизмы действия систем геномного редактирования ZFNs, TALEN, CRISPR/Cas, CBE и ABE подробно рассмотрены в ряде обзорных статей (135-139).

На сегодняшний день различные методы редактирования генома томата широко применяются в исследованиях как фундаментального (140), так и ярко выраженного прикладного характера, например с целью повышения устойчивости растений к абиотическим (141, 142) и биотическим (143-146) стрессорам разной природы, повышения лежкости плодов и улучшения их качества (147-152), а также для ускорения процесса доместикации диких видов *Solanum* (153, 154). Доставка систем геномного редактирования осуществляется преимущественно посредством агробактериальной трансформации векторными конструкциями, экспрессирующими эти системы. Прямые методы введения чужеродной ДНК для получения растений томата с отредактированным геномом также занимают значимое место в этом списке (табл. 2).

## 2. Прямые методы доставки систем геномного редактирования в растения томата

Система редактирования	Способ доставки	Генотип	Ген	Контролируемый признак	Эффективность редактирования, %	Ссылка
TALEN	ПЭГ-Са <sup>2+</sup> -опосредованная трансформация	Micro-Tom	<i>ANT1</i>	Ген, контролирующий биосинтез антоциана; признак фиолетовой окраски	7,28	(155)
CRISPR/Cas9	ПЭГ-Са <sup>2+</sup> -опосредованная трансформация	Micro-Tom	<i>ANT1</i>	Ген, контролирующий биосинтез антоциана; признак фиолетовой окраски	2,75-8,8	(155)
		Micro-Tom	<i>CCD7</i> <i>CCD8</i>	Гены, вовлеченные в биосинтез стриголактона	30 90	(156)
ZFNs	ПЭГ-Са <sup>2+</sup> -опосредованная трансформация	<i>Solanum peruvianum</i> L.	<i>SpRDR6</i>	Гены, опосредующие устойчивость к фитопатогенам	13,2	(157)
			<i>SpSGS3</i>		8,3	
			<i>SpPR-1</i>		13,9	
			<i>SpMlo1</i> <i>SpProSys</i>		63,6 45,8	
ZFNs	Электропорация зародышей зрелых семян	Heinz 1706	<i>LIL4</i>	Транскрипционный фактор, контролирующий развитие семядольных и настоящих листьев, а также цветение и созревание плодов	65	(133)
Prime editing	Биобаллистика	Micro-Tom	<i>NanoLucM</i>	Обратная мутация, восстанавливающая активность люциферазы NanoLuc	0,26 <sup>a</sup>	(158)

Примечание. <sup>a</sup> — эффективность транзientной экспрессии.

Так, с помощью систем TALEN и CRISPR/Cas9 и ПЭГ-Са<sup>2+</sup>-опосредованной трансформации протопластов томата модельного сорта Micro-Tom была осуществлена точная вставка промотора CaMV35S между промоторным и транскрибируемым участками гена *ANT1*, контролирующего биосинтез антоцианов. Обусловленная конститутивным промотором сверх-

экспрессия гена *ANTI* способствовала эктопическому накоплению пигмента в растительных тканях. В зависимости от типа генетической конструкции и системы геномного редактирования ЭТ варьировала от 2,75 до 8,8 %. Более двух третей инсерций трансгена оказались точными и стабильно наследовались в T<sub>1</sub> семенном поколении согласно менделевскому расщеплению (155).

ПЭГ-опосредованная доставка системы CRISPR/Cas9 в протопласты томатов позволила провести редактирование двух генов каротиноид-расщепляющих диоксигеназ (*CCD7* и *CCD8*), вовлеченных в биосинтез стриголактона. При этом применили мультиплексирование, то есть одновременное нацеливание нескольких гидовых РНК на оба гена. Для трансфекции протопластов авторы использовали многокомпонентный буферный раствор, содержащий 12,5 % ПЭГ-4000. В результате из 50 случайно отобранных каллусных агрегатов, образовавшихся в культуре протопластов, у одного (2 %) и пяти (10 %) выявили моноаллельные мутации (соответственно в генах *CCD7* и *CCD8*), тогда как 13 (26 %) и 36 (72 %) каллусов содержали биаллельные мутации тех же генов (гомозиготное или гетерозиготное состояние) (156).

Y.C. Lin с соавт. (157) получили из культуры протопластов *S. peruvianum* L. независимые регенеранты с точечными мутациями, внесенными CRISPR/Cas9 в следующие гены, продукты экспрессии которых обуславливают устойчивость к фитопатогенам: *SpRDR6* (РНК-зависимая РНК-полимераза 6), *SpSGS3* (супрессор сайленсинга гена 3) (два ключевых гена РНК-сайленсинга, опосредующие защиту от вируса желтой курчавости листьев томата), *SpPR-1* (pathogenesis-related protein-1), *SpProSys* (просистемин), а также *SpMlo1* (один из представителей семейства генов локуса O, обуславливающий устойчивость к снежной плесени). В результате частота редактирования в зависимости от гена варьировала в пределах 8,3-63,6 % (157).

Использование зрелых зародышей семян томата сорта Heinz 1706 в качестве эксплантов для электропорации плазмидами с последовательностью ZFN позволило получить независимые линии с отредактированным геном *LIL4*, кодирующим транскрипционный фактор LEAFY COTYLEDON1-LIKE4, который контролирует развитие семядольных и настоящих листьев, а также цветение и плодоношение. Установлено, что 65 % растений томата, выращенных из трансфицированных семян, содержали различные мутации целевого гена (133).

Доставка систем геномного редактирования осуществляется также и с помощью биобаллистического метода. Примером служит редактирование генома томата сорта Micro-Tom посредством системы prime editing на основе нуклеазы Cas9, сшитой с обратной транскриптазой вируса лейкемии мышей (MuLV) и содержащей новый вариант гидовой РНК — prime editing guide RNA (pegRNA), которая не только направляет нуклеазу к нужному сайту ДНК, но и служит матрицей, кодирующей изменения (158). Эффективность редактирования генома с помощью этой технологии составила 0,26 % (показатель оценивали посредством восстановленной транзиторной экспрессии люциферазы через 7 сут после обстрела микрочастицами).

Итак, в настоящей обзорной статье рассмотрены различные прямые методы (химически опосредованная трансформация, микроинъекция, электропорация, биобаллистическая трансформация) введения чужеродной ДНК для получения трансгенных растений томата, а также факторы различной природы (физические, генетические и физиологические), влияющие на эффективность этого процесса. Первые три метода характеризуются низкой эффективностью, в связи с чем не нашли широкого применения.



Наиболее распространенным прямым способом генетической трансформации томата служит биобаллистический метод, с помощью которого с разной эффективностью получают растения со стабильно наследуемой инсерцией трансгена как в ядерном, так и пластидном геноме. При этом следует отметить, что непосредственное сопоставление эффективности трансформации (ЭТ) не всегда возможно, поскольку разные авторы используют неодинаковые методики ее определения. Кроме того, в ряде исследовательских работ ЭТ не представлена вовсе, поскольку, по-видимому, полученные трансгенные растения томата были единичными или же задача определения ЭТ не ставилась. Следует отметить, что с широким развитием различных систем геномного редактирования прямые методы генетической трансформации томата используются все чаще, особенно при работе с культурой протопластов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. FAO. *FAOSTAT*, 2021. Режим доступа: <https://www.fao.org/faostat/ru/#data/QCL>. Без даты.
2. Роньжина Е.С., Подлеснова В.С. Комплексная оценка качества томатов, выращиваемых в Калининградской области. *Известия Горского государственного аграрного университета*, 2021, 58-3: 30-35.
3. Авдеев Ю.И. Технология томатов в открытом грунте Астраханской области. *Картофель и овощи*, 2014, 5: 7-9.
4. Sorokin A., Bryzhev A., Stokov A., Mirzabaev A., Johnson T., Kiselev S.V. The economics of land degradation in Russia. In: *Economics of land degradation and improvement – a global assessment for sustainable development* / E. Nkonya, A. Mirzabaev, J. von Braun (eds). Springer, Cham., 2016: 541-576 (doi: 10.1007/978-3-319-19168-3\_18).
5. Салина Ю.Б., Тютюма Н.В., Тютюма А.В. Засоление как критический фактор плодородия земель Астраханской области. *Достижения науки и техники АПК*, 2018, 32(12): 5-8 (doi: 10.24411/0235-2451-2018-11201).
6. Лазарев А.М. *Бактериальные болезни томата и меры борьбы с ними*. СПб, 2015.
7. Blancard D. *Tomato diseases*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 2012.
8. Кигашпаева О.П., Авдеев А.Ю. Брендовые астраханские сорта томата. *Проблемы развития АПК региона*, 2020, 2: 93-97 (doi: 10.15217/issn2079-0996.2020.2.93).
9. Khaliluev M.R., Shpakovskii G.V. Genetic engineering strategies for enhancing tomato resistance to fungal and bacterial pathogens. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2013, 60(6): 721-732 (doi: 10.1134/S1021443713050087).
10. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T., Kononowicz A.K. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2015, 120: 881-902 (doi: 10.1007/s11240-014-0664-4).
11. Anwar R., Fatima T., Mattoo A. Tomatoes: A model crop of Solanaceous plants. In: *Oxford research encyclopedia of environmental science*. Oxford University Press, Oxford, UK, 2019 (doi: 10.1093/acrefore/9780199389414.013.223).
12. Chaban I., Khaliluev M., Baranova E., Kononenko N., Dolgov S., Smirnova E. Abnormal development of floral meristem triggers defective morphogenesis of generative system in transgenic tomatoes. *Protoplasma*, 2018, 255(6): 1597-1611 (doi: 10.1007/s00709-018-1252-y).
13. Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р. Лавина А.М., Баймиев А.Х., Чемечис А.В. Ассоциативный симбиоз трансгенных томатов с ризобиями повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Биотехнология*, 2015, 31(3): 42-53.
14. Arie T., Takahashi H., Kodama M., Teraoka T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 2007, 24(1): 135-147 (doi: 10.5511/plantbiotechnology.24.135).
15. Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Масленникова Д.Р. Оценка глутатионового статуса в корнях трансгенных по генам *psl* и *rapA1* растений томата при действии *Rhizobium leguminosarum*. *Физиология растений*, 2021, 68(5): 524-532 (doi: 10.31857/S0015330321050225).
16. Комахин Р.А., Комахина В.В., Милюкова Н.А., Голденкова-Павлова И.В., Фадиной О.А., Жученко А.А. Трансгенные растения томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*, как модель для изучения мейотической рекомбинации. *Генетика*, 2010, 46(12): 1635-1644.
17. Rothan C., Diouf I., Causse M. Trait discovery and editing in tomato. *The Plant Journal*, 2019, 97(1): 73-90 (doi: 10.1111/tjp.14152).
18. Salim M.M.R., Rashid M.H., Hossain M.M., Zakaria, M. Morphological characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*,

- 2020, 19: 233-240 (doi: 10.1016/j.jssas.2018.11.001).
19. Renna M., D'Imperio M., Gonnella M., Durante M., Parente A., Mita G., Santamaria P., Serio F. Morphological and chemical profile of three tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces of a semi-arid Mediterranean environment. *Plants*, 2019, 8(8): 273 (doi: 10.3390/plants8080273).
  20. Causse M., Giovannoni J., Bouzayen M., Zouine M. *The Tomato Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2016 (doi: 10.1007/978-3-662-53389-5\_3).
  21. The Tomato Genome Consortium. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 2012, 485: 635-641 (doi: 10.1038/nature11119).
  22. Bhatia P., Ashwath N., Senaratna T., Midmore D. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2004, 78: 1-21 (doi: 10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e).
  23. Гавриш С.Ф. Опыт и перспективы селекции томата для защищенного грунта. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 1992, 5: 147-161.
  24. Бухарова А.Р., Бухаров А.Ф. *Отдаленная гибридизация овощных пасленовых культур*. Мичуринск, 2008.
  25. Rommens C.M., Kishore G.M. Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(2): 120-125 (doi: 10.1016/s0958-1669(00)00083-5).
  26. Bock R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology. *Annual Review of Plant Biology*, 2015, 66: 211-241 (doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040212).
  27. Adem M., Beyene D., Feyissa T. Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, 2017, 13(1): 30 (doi: 10.1186/s13007-017-0179-1).
  28. Ruf S., Hermann M., Berger I.J., Carrer H., Bock R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(9): 870-875 (doi: 10.1038/nbt0901-870).
  29. Staub J.M., Maliga P. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *The Plant Cell*, 1992, 4(1): 39-45 (doi: 10.1105/tpc.4.1.39).
  30. Kaplanoglu E., Kolotilin I., Menassa R., Donly C. Plastid transformation of Micro-Tom tomato with a hemipteran double-stranded RNA results in RNA interference in multiple insect species. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3918 (doi: 10.3390/ijms23073918).
  31. Rogalski M., do Nascimento Vieira L., Fraga H.P., Guerra M.P. Plastid genomics in horticultural species: importance and applications for plant population genetics, evolution, and biotechnology. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 586 (doi: 10.3389/fpls.2015.00586).
  32. Saveleva N.V., Burlakovskiy M.S., Yemelyanov V.V., Lutova L.A. Transgenic plants as bioreactors to produce substances for medical and veterinary uses. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 2016, 6(6): 712-724 (doi: 10.1134/S2079059716060071).
  33. Rozov S.M., Sidorchuk Y.V., Deineko E.V. Transplastomic plants: problems of production and their solution. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2022, 69(2): 1-10 (doi: 10.1134/S1021443722020157).
  34. Zagorskaya A.A., Deineko E.V. Plant-expression systems: a new stage in production of biopharmaceutical preparations. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2021, 68(1): 17-30 (doi: 10.1134/S1021443721010210).
  35. Gelvin S.B. Plant DNA repair and *Agrobacterium* T-DNA integration. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8458 (doi: 10.3390/ijms22168458).
  36. Hwang H.H., Yu M., Lai E.M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 2017, 15: e0186 (doi: 10.1199/tab.0186).
  37. Anand A., Jones T.J. 2018 Advancing *Agrobacterium*-based crop transformation and genome modification technology for agricultural biotechnology. In: *Agrobacterium Biology. Current Topics in Microbiology and Immunology. V. 418 /S.B. Gelvin (ed.)*. Springer, Cham., 2018: 489-507 (doi: 10.1007/82\_2018\_97).
  38. Chyi Y.S., Jorgensen R.A., Goldstein D., Tanksley S.D., Loaiza-Figueroa F. Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Molecular and General Genetics*, 1986, 204(1): 64-69 (doi: 10.1007/BF00330188).
  39. Saifi S.K., Passricha N., Tuteja R., Kharb P., Tuteja N. In planta transformation: A smart way of crop improvement. In: *Advancement in crop improvement techniques /N. Tuteja, R. Tuteja, N. Passricha (eds.)*. Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, 2020: 351-362 (doi: 10.1016/B978-0-12-818581-0.00021-8).
  40. Keshavareddy G., Kumar A.R.V., Ramu V.S. Methods of plant transformation-a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018, 7(7): 2656-2668 (doi: 10.20546/ijcmas.2018.707.312).
  41. Marenkova T.V., Loginova D.B., Deineko E.V. Mosaic patterns of transgene expression in plants. *Russian Journal of Genetics*, 2012, 48(3): 249-260 (doi: 10.1134/S1022795412030088).
  42. Xia X., Cheng X., Li R., Yao J., Li Z., Cheng Y. Advances in application of genome editing in

- tomato and recent development of genome editing technology. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(9): 2727-2747 (doi: 10.1007/s00122-021-03874-3).
43. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31: 397-405 (doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004).
  44. Khan Z., Khan S.H., Mubarik, Sadia B., Ahmad A. Use of TALEs and TALEN Technology for Genetic Improvement of Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2017, 35: 1-19 (doi: 10.1007/s11105-016-0997-8).
  45. Petolino J.F. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2015, 51(1): 1-8 (doi: 10.1007/s11627-015-9663-3).
  46. Sardesai N., Subramanyam S. Agrobacterium: a genome-editing tool-delivery system. In: *Agrobacterium biology. Current Topics in microbiology and immunology. V. 418* /S.B. Gelvin (ed.). Springer, Cham., 2018: 463-488 (doi: 10.1007/82\_2018\_101).
  47. Ruf S., Bock R. Plastid Transformation in Tomato. In: *Chloroplast biotechnology. Methods in molecular biology (methods and protocols). V. 1132* /P. Maliga (ed.). Humana Press, Totowa, NJ., 2014: 265-276 (doi: 10.1007/978-1-62703-995-6\_16).
  48. Глеба Ю.Ю., Хасанов М.М., Слюсаренко А.Г., Бутенко Р.Г., Винецкий Ю.П. Проникновение <sup>3</sup>H-ДНК *Bacillus subtilis* в изолированные протопласты клеток табака *Nicotiana tabacum*. Доклады АН СССР, 1974, 219(4-6): 1478-1481.
  49. Ohyama K., Gamborg O.L., Miller R.A. Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts. *Canadian Journal of Botany*, 1972, 50(10): 2071-2080 (doi: 10.1139/b72-267).
  50. Graham F.L., Van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 1973, 52: 456-467 (doi: 10.1016/0042-6822(73)90341-3).
  51. Jongsma M., Koornneef M., Zabel P., Hille J. Tomato protoplast DNA transformation: physical linkage and recombination of exogenous DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, 1987, 8(5): 383-394 (doi: 10.1007/BF00015816).
  52. Negrutiu I., Shillito R., Potrykus I., Biasini G., Sala F. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Molecular Biology*, 1987, 8: 363-373 (doi: 10.1007/BF00015814).
  53. Nugent G.D., ten Have M., van der Gulik A., Dix P.J., Uijtewaal B.A., Mordhorst A.P. Plastid transformants of tomato selected using mutations affecting ribosome structure. *Plant Cell Reports*, 2005, 24: 341-349 (doi:10.1007/s00299-005-0930-3).
  54. Ray S., Lahiri S., Halder M., Mondal M., Choudhuri T.R., Kundu S. An efficient method of isolation and transformation of protoplasts from tomato leaf mesophyll tissue using the binary vector pCambia 1302. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*, 2015, 2: 146-150 (doi: 10.17148/IARJSET.2015.2631).
  55. Diacumakos E.G. Methods of micromanipulation of human somatic cells in culture. In: *Methods in cell biology. V. 7* /D.M. Prescott (ed.). Academic Press, New York, 1974: 287-312 (doi: 10.1016/S0091-679X(08)61783-5).
  56. Capecchi M.R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 1980, 22(2): 479-488 (doi: 10.1016/0092-8674(80)90358-X).
  57. Griesbach R.J. Protoplast microinjection. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983, 1(4): 32-37 (doi: 10.1007/BF02712674).
  58. Steinbiss H.H., Stabel P. Protoplast derived tobacco cells can survive capillary microinjection of the fluorescent dye Lucifer Yellow. *Protoplasma*, 1983, 116(2): 223-227 (doi: 10.1007/BF01279844).
  59. Morikawa H., Yamada Y. Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. *Plant and Cell Physiology*, 1985, 26(2): 229-236 (doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076901).
  60. Griesbach R.J., Sink K.C. Evacuation of mesophyll protoplasts. *Plant Science Letters*, 1983, 30(3): 297-301 (doi: 10.1016/0304-4211(83)90168-2).
  61. Spangenberg G., Koop H.U., Lichter R., Schweiger H.G. Microculture of single protoplasts of *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 1986, 66(1): 1-8 (doi: 10.1111/j.1399-3054.1986.tb01223.x).
  62. Griesbach R.J. Chromosome-mediated transformation via microinjection. *Plant Science*, 1987, 50(1): 69-77 (doi: 10.1016/0168-9452(87)90032-X).
  63. Schnorf M., Neuhaus-Url G., Galli A., Iida S., Potrykus I., Neuhaus G. An improved approach for transformation of plant cells by microinjection: molecular and genetic analysis. *Transgenic Research*, 1991, 1(1): 23-30 (doi: 10.1007/BF02512993).
  64. Holm P.B., Olsen O., Schnorf M., Brinch-Pedersen H., Knudsen S. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Research*, 2000, 9(1): 21-32 (doi: 10.1023/A:1008974729597).
  65. Toyoda H., Matsuda Y., Utsumi R., Ouchi S. Intranuclear microinjection for transformation of tomato callus cells. *Plant Cell Reports*, 1988, 7(5): 293-296 (doi: 10.1007/BF00269921).
  66. Reich T.J., Iyer V.N., Miki B.L. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti plasmids. *Nature Biotechnology*, 1986, 4(11): 1001-1004 (doi:

- 10.1038/nbt1186-1001).
67. Okada K., Nagata T., Takebe I. Introduction of functional RNA into plant protoplasts by electroporation. *Plant and Cell Physiology*, 1986, 27(4): 619-626 (doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077141).
  68. Chen C., Smye S.W., Robinson M.P., Evans J.A. Membrane electroporation theories: a review. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 2006, 44(1-2): 5-14 (doi: 10.1007/s11517-005-0020-2).
  69. Kotnik T., Frey W., Sack M., Haberl Meglič S., Peterka M., Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33: 480-488 (doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.002).
  70. Kotnik T., Rems L., Tarek M., Miklavčič D. Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models. *Annual Review of Biophysics*, 2019, 48: 63-91 (doi: 10.1146/annurev-biophys-052118-115451).
  71. Reberšek M., Faurie C., Kandušar M., Čorović S., Teissié J., Rols M.P., Miklavčič D. Electroporator with automatic change of electric field direction improves gene electrotransfer *in-vitro*. *BioMedical Engineering OnLine*, 2007, 6(1): 1-11 (doi: 10.1186/1475-925X-6-25).
  72. Hanze J., Fischer L., Koenen M., Worgall S., Rascher W. Electroporation of nucleic acids into prokaryotic and eukaryotic cells by square wave pulses. *Biotechnology Techniques*, 1998, 12(2): 159-163 (doi: 10.1023/A:1008800903452).
  73. Kotnik T., Pucihar G., Miklavčič D. Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. *Journal of Membrane Biology*, 2010, 236: 3-13 (doi: 10.1007/s00232-010-9279-9) (doi: 10.1007/s00232-010-9279-9).
  74. Gurel F., Gozukirmizi N. Electroporation transformation of barley. In: *Genetic transformation of plants. Molecular methods of plant analysis. V. 23* /J.F. Jackson, H.F. Linskens (eds.). Springer, Berlin, 2003: 69-89 (doi: 10.1007/978-3-662-07424-4\_5).
  75. Nakata K., Tanaka H., Yano K., Takagi M. An effective transformation system for *Lycopersicon peruvianum* by electroporation. *Japanese Journal of Breeding*, 1992, 42(3): 487-495 (doi: 10.1270/jsbbs1951.42.487).
  76. Sherba J.J., Hogquist S., Lin H., Shan J.W., Shreiber D.I., Zahn J.D. The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 3053 (doi: 10.1038/s41598-020-59790-x).
  77. Azencott H.R., Peter G.F., Prausnitz M.R. Influence of the cell wall on intracellular delivery to algal cells by electroporation and sonication. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2007, 33(11): 1805-1817 (doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.05.008).
  78. Ortiz-Matamoros M.F., Villanueva M.A., Islas-Flores T. Genetic transformation of cell-walled plant and algae cells: delivering DNA through the cell wall. *Briefings in Functional Genomics*, 2018, 17(1): 26-33 (doi: 10.1093/bfpg/elx014).
  79. D'Halluin K., Bonne E., Bossut M., De Beuckeleer M., Leemans J. Transgenic maize plants by tissue electroporation. *The Plant Cell*, 1992, 4(12): 1495-1505 (doi: 10.1105/tpc.4.12.1495).
  80. Bellini C., Chupeau M.C., Guerche P., Vastra G., Chupeau Y. Transformation of *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum* mesophyll protoplasts by electroporation. *Plant Science*, 1989, 65(1): 63-75 (doi: 10.1016/0168-9452(89)90208-2).
  81. Tsukada M., Kusano T., Kitagawa Y. Introduction of foreign genes into tomato protoplasts by electroporation. *Plant and Cell Physiology*, 1989, 30(4): 599-603 (doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077781).
  82. Sanford J.C., Klein T.M., Wolf E.D. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*, 1987, 5: 27-37 (doi: 10.1080/02726358708904533).
  83. Van Eck J.M., Blowers A.D., Earle E.D. Stable transformation of tomato cell cultures after bombardment with plasmid and YAC DNA. *Plant Cell Reports*, 1995, 14(5): 299-304 (doi: 10.1007/BF00232032).
  84. Ruma D., Dhaliwal M.S., Kaur A., Gosal S.S. Transformation of tomato using biolistic gun for transient expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene. *Indian Journal of Biotechnology*, 2009, 8(4): 363-369.
  85. Guillet C., Aboul-Soud M.A., Le Menn A., Viron N., Pribat A., Germain V., Just D., Baldet P., Rousselle P., Lemaire-Chamley M., Rothan C. Regulation of the fruit-specific PEP carboxylase *SIPPC2* promoter at early stages of tomato fruit development. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e36795 (doi: 10.1371/journal.pone.0036795).
  86. Sun L., Liu S., Ren J., Cui M., Wang L., Leng P. Optimization of particle bombardment conditions by  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter system in tomato fruit. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(4): 675-683 (doi: 10.5897/AJB10.578).
  87. Столбиков А.С., Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Третьякова А.В. Генетическая трансформация каллусов томата биобаллистическим методом с использованием гена GUS, кодирующего синтез  $\beta$ -глюкуронидазы. *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология*, 2015, 13: 2-8.



- 10.1038/nbt0588-559).
110. Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M., Sath R.K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 2016, 6(1): 54 (doi: 10.1007/s13205-016-0389-7).
  111. Ranghoo-Sanmukhiya V.M. Somaclonal variation and methods used for its detection. In: *Propagation and genetic manipulation of plants* /I. Siddique (ed.). Springer, Singapore, 2021: 59-68 (doi: 10.1007/978-981-15-7736-9\_1).
  112. Чесноков Ю.В. *Наследственные изменения, вызванные переносом экзогенной ДНК в высшие растения посредством прорастающей пыльцы. Докт. дис.* Минск, 2000.
  113. Чесноков Ю.В. Перенос чужеродных генов в зародышевый мешок высших растений посредством прорастающей пыльцы. *Биополимеры и клетка*, 1992, 8(2): 53-58.
  114. Kaur R.P., Devi S. In planta transformation in plants: a review. *Agricultural Reviews*, 2019, 40(3): 159-174 (doi: 10.18805/ag.R-1597).
  115. Hess D., Lorz H., Weissert E.-W. Die Aufnahme bakterieller DNA in quellende und keimende Pollen von *Petunia hybrid* und *Nicotiana glauca* [Uptake of bacterial DNA into swelling and germinating pollen grains of *Petunia hybrid* and *Nicotiana glauca*]. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1974, 74(1): 52-63 (doi: 10.1016/S0044-328X(74)80204-7).
  116. Hess D., Gresshoff P.M., Fielits U., Gleiss D. Uptake of protein and bacteriophage into swelling and germinating pollen of *Petunia hybrida*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1975, 74(4): 371-376 (doi: 10.1016/S0044-328X(75)80164-4).
  117. Турбин Н.В., Соيفер В.Н., Картель Н.А. и др. Генетические изменения признака ваху у ячменя под влиянием экзогенной ДНК дикого типа. *Сельскохозяйственная биология*, 1974, 9(6): 204-215.
  118. Zhou G.Y., Weng J., Zeng Y., Huang J., Qian S., Liu G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. In: *Methods in enzymology. V. 101*. Academic Press, 1983: 433-481 (doi: 10.1016/0076-6879(83)01032-0).
  119. Каргэль М.А., Забянькова К.І. Генетычныя змены і магчымы механізм іх узнікнення пад дзеяннем ДНК у раслін. *Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*, 1984, 6: 42-46.
  120. De la Pena A., Lorz H., Schell J. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature*, 1987, 325(6101): 274-276 (doi: 10.1038/325274a0).
  121. Чесноков Ю.В., Седов Г.И., Виконская Н.А. Простой метод генетической трансформации двудольных растений. *Известия АН МССР*, 1989, 6: 61-62.
  122. Chen D.P., Yu L.J. Establishment of tomato transformation technique via the pollen tube pathway method. *Northern Horticulture*, 2010, 14: 131-135.
  123. Xiaoxia J., Li W., Yu L. Transgenic technology of pollen-tube pathway in tomato (*Solanum lycopersicum* M.). *Molecular Plant Breeding*, 2013, 11(4): 605-610.
  124. Wang R., Li R., Xu T., Li T. Optimization of the pollen-tube pathway method of plant transformation using the Yellow Cameleon 3.6 calcium sensor in *Solanum lycopersicum*. *Biologia*, 2017, 72(10): 1147-1155 (doi: 10.1515/biolog-2017-0127).
  125. Чесноков Ю.В., Седов Г.И., Виконская Н.А. Эффекты действия экзогенной ДНК у томата. I. Генетическая трансформация. *Генетика*, 1995, 31(5): 648-691.
  126. Wang Y., Shen J. Probing into cytological embryology mechanism of pollen-tube pathway transgenic technology. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2005, 26: 628-634.
  127. Luo Z.-X., Wu R. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Molecular Biology Report*, 1988, 6: 165-174 (doi: 10.1007/BF02669590).
  128. Jian C., Li K., Ou W. Research progress in pollen-tube pathway method in transgenic plants. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33(5): 956-961.
  129. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de L'Académie des Sciences Serie III-Sciences De La Vie-Life Sciences*, 1993, 316: 1194-1199.
  130. Bent A.F., Clough S.J. *Agrobacterium* germ-line transformation: transformation of *Arabidopsis* without tissue culture. In: *Plant molecular biology manual* /S.B. Gelvin, R.A. Schilperoot (eds.). Springer, Dordrecht, 1998: 17-30 (doi: 10.1007/978-94-011-5242-6\_2).
  131. Bent A. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. In: *Agrobacterium protocols. Methods in molecular biology. V. 343* /K. Wang (ed.). Humana Press, 2006: 87-104 (doi: 10.1385/1-59745-130-4:87).
  132. Yasmeen A., Mirza B., Inayatullah S., Safdar N., Jamil M., Ali S., Choudhry M.F. In planta transformation of tomato. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, 27: 20-28 (doi: 10.1007/s11105-008-0044-5).
  133. Hilioti Z., Ganopoulos I., Ajith, S., Bossis I., Tsaftaris A. A novel arrangement of zinc finger nuclease system for *in vivo* targeted genome engineering: the tomato *LEC1-LIKE4* gene case. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(11): 2241-2255 (doi: 10.1007/s00299-016-2031-x).

134. Кузьмина Ю.В. Методы редактирования генома для увеличения лёжкости плодов томата. *Биотехнология и селекция растений*, 2020, 3(1): 31-39 (doi: 10.30901/2658-6266-2020-1-06).
135. Kuluev B.R., Gumerova G.R., Mikhaylova E.V., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Vershinina Z.R., Khyazev A.V., Matniyazov R.T., Baymiev A.K., Chemeris A.V. Delivery of CRISPR/Cas components into higher plant cells for genome editing. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2019, 66(5): 694-706 (doi: 10.1134/S102144371905011X).
136. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. *Acta Naturae*, 2014, 6(3): 19-40.
137. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Kuluev B.R., Kiryanova O.Yu., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Vershinina Z.R., Mikhailova E.V., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Baimiev A.Kh., Gubaidullin I.M., Baimiev A.Kh., Chemeris A.V. Design of guide RNA for CRISPR/Cas plant genome editing. *Molecular Biology*, 2020, 54(1): 24-42 (doi: 10.1134/S0026893320010069).
138. Malzahn A., Lowder L., Qi Y. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell & Bioscience*, 2017, 7(1): 21 (doi: 10.1186/s13578-017-0148-4).
139. Zhan X., Lu Y., Zhu J.K., Botella J.R. Genome editing for plant research and crop improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 3-33 (doi: 10.1111/jipb.13063).
140. Feder A., Jensen S., Wang A.Q., Courtney L., Middleton L., Van Eck J., Liu Y.S., Giovannoni J.J. Tomato fruit as a model for tissue-specific gene silencing in crop plants. *Horticulture Research*, 2020, 7: 142 (doi: 10.1038/s41438-020-00363-4).
141. Liu L., Zhang J., Xu J., Li Y., Guo L., Wang Z., Zhang X., Zhao B., Guo Y.D., Zhang N. CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of *SILBD40*, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato. *Plant Science*, 2020, 301: 110683 (doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110683).
142. Danilo B., Perrot L., Mara K., Botton E., Nogué F., Mazier M. Efficient and transgene-free gene targeting using *Agrobacterium*-mediated delivery of the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Cell Reports*, 2019, 38(4): 459-462 (doi: 10.1007/s00299-019-02373-6).
143. Nekrasov V., Wang C., Win J., Lanz C., Weigel D., Kamoun S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 482 (doi: 10.1038/s41598-017-00578-x).
144. Ortigosa A., Gimenez-Ibanez S., Leonhardt N., Solano R. Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SIJAZ2*. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17: 665-673 (doi: 10.1111/pbi.13006).
145. Martínez M.I.S., Bracuto V., Koseoglou E., Appiano M., Jacobsen E., Visser R.G., Wolters A.A., Bai Y. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene *PMR4* for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 284 (doi: 10.1186/s12870-020-02497-y).
146. Yoon Y.J., Venkatesh J., Lee J.H., Kim J., Lee H.E., Kim D.S., Kang B.C. Genome editing of eIF4E1 in tomato confers resistance to pepper mottle virus. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 1098 (doi: 10.3389/fpls.2020.01098).
147. Ito Y., Sekiyama Y., Nakayama H., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Shima Y., Nakamura N., Kotake-Nara E., Kawasaki S., Hirose S., Toki S. Allelic mutations in the *Ripening-inhibitor* locus generate extensive variation in tomato ripening. *Plant Physiology*, 2020, 183: 80-95 (doi: 10.1104/pp.20.00020).
148. Li S., Xu H.J.L., Ju Z., Cao D.Y., Zhu H.L., Fu D.Q., Grierson D., Qin G.Z., Luo Y.B., Zhu B.Z. The *RIN-MC* fusion of MADS-box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes. *Plant Physiology*, 2018, 176: 891-909 (doi: 10.1104/pp.17.01449).
149. Hunziker J., Nishida K., Kondo A., Kishimoto S., Ariizumi T., Ezura H. Multiple gene substitution by Target-AID base-editing technology in tomato. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 20471 (doi: 10.1038/s41598-020-77379-2).
150. Nonaka S., Arai C., Takayama M., Matsukura C., Ezura H. Efficient increase of gamma-aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Scientific Reports*, 2017, 7: 7057 (doi: 10.1038/s41598-017-06400-y).
151. Deng L., Wang H., Sun C.L., Li Q., Jiang H.L., Du M.M., Li C.B., Li C.Y. Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *Journal of Genetics and Genomics*, 2018, 45: 51-54 (doi: 10.1016/j.jgg.2017.10.002).
152. D'Ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G. CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato. *Transgenic Research*, 2018, 27(4): 367-378 (doi: 10.1007/s11248-018-0079-9).
153. Zsögön A., Čermák T., Naves E.R., Notini M.M., Edel K.H., Weinel S., Freschi L., Voytas D.F., Kudla J., Peres L.E.P. *De novo* domestication of wild tomato using genome editing. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(12): 1211-1216 (doi: 10.1038/nbt.4272).
154. Li T., Yang X., Yu Y., Si X., Zhai X., Zhang H., Dong W., Gao C., Xu C. Domestication of

- wild tomato is accelerated by genome editing. *Nature Biotechnology*, 2018, 36: 1160-1163 (doi: 10.1038/nbt.4273).
155. Čermák T., Baltés N.J., Čegan R., Zhang Y., Voytas D.F. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 232 (doi: 10.1186/s13059-015-0796-9).
156. Nicolia A., Andersson M., Hofvander P., Festa G., Cardì T. Tomato protoplasts as cell target for ribonucleoprotein (RNP)-mediated multiplexed genome editing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2021, 144(2): 463-467 (doi: 10.1007/s11240-020-01954-8).
157. Lin Y.C. DNA-free CRISPR-Cas9 gene editing of wild tetraploid tomato *Solanum peruvianum* using protoplast regeneration. *Plant Physiology*, 2022, 188(4): 1917-1930 (doi: 10.1093/plphys/kiac022).
158. Lu Y., Tian Y., Shen R., Yao Q., Zhong D., Zhang X., Zhu J. K. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(3): 415-417 (doi: 10.1111/pbi.13497).

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии,

127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,  
e-mail: joseph.mikhel@gmail.com, marat131084@rambler.ru ✉;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет—МСХА им. К.А. Тимирязева,  
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

Поступила в редакцию  
18 апреля 2022 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, V. 57, № 3, pp. 518-541

## TRANSGENIC TOMATO PLANTS (*Solanum lycopersicum* L.): DIRECT METHODS OF GENE TRANSFER AND FACTORS AFFECTING TRANSFORMATION EFFICIENCY (review)

I.M. Mikhel<sup>1</sup>, M.R. Khaliluev<sup>1, 2</sup> ✉

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail joseph.mikhel@gmail.com, marat131084@rambler.ru (✉ corresponding author);

<sup>2</sup>Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agrarian Academy, 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia  
ORCID:

Mikhel I.M. orcid.org/0000-0002-7930-8862

Khaliluev M.R. orcid.org/0000-0001-7371-8900

The author declares no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by assignments No. 0431-2022-0003 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

Received April 18, 2022

doi: 10.15389/agrobiology.2022.3.518eng

### Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the most important food crop which is also widely used as a model plant in molecular genetic investigations of vegetative development and reproductive biology, plant resistance to abiotic and biotic stresses, plant-microbe association and symbiosis, etc., that have both basic and applied value. The production of transgenic tomato plants expressing foreign heterologous genes, as well as with induced silencing or knockout of their own genes, is an important part of modern plant physiology. There are two radically different approaches to introducing foreign DNA into the tomato genome. The first method is based on the natural mechanism of infection with plant-associated bacterial pathogen *Agrobacterium* sp. (*A. tumefaciens*. or *A. rhizogenes*), followed by T-DNA transfer and insertion into the plant genome (*Agrobacterium*-mediated transformation). The second approach is based on the direct introducing of foreign DNA into the plant cells through the plasma membrane by chemical (Ca<sup>2+</sup>, polyethylene glycol, PEG) or physical exposure (electrical impulse or excessive pressure) (direct methods of tomato genetic transformation). Transgenic tomato plants can be produced both by the classical tissue culture-based transformation procedure and in planta transformation. This review article discusses classical direct methods for introducing foreign DNA into the tomato genome (chemical-mediated transfection, protoplast electroporation, microinjection, biolistic transformation), and in planta transformation methods (pollen-tube pathway, electroporation of mature seed embryo). The review considers features of producing tomato plants both with transient transgene expression and stably inherited insertion into the nuclear or plastid genomes are considered. In addition, the factors affecting the efficiency of transformation are analyzed in detail. A separate section is devoted to the direct tomato genetic transformation methods for delivering various genome editing tools (ZFNs, TALEN, CRISPR/Cas, base editing, prime editing) that have become widespread in the past five years.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., electroporation, PEG-mediated transformation, microinjection, biolistic transformation, transformation in planta, genome editing.