

СОДЕРЖАНИЕ САХАРОВ В СПЕЛОМ ПЛОДЕ ТОМАТА КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМЫ *RIN2i* ГЕНА *Ripening inhibitor*¹

© 2021 г. М. А. Слугина^{а, *}, Е. А. Джос^{а, b}, А. В. Щенникова^а, Е. З. Кочиева^а

^аИнститут биоинженерии Федерального исследовательского центра

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение

“Федеральный научный центр овощеводства”, п. ВНИИССОК, Московская обл., Россия

*e-mail: mashinmail@mail.ru

Поступила в редакцию 23.12.2020 г.

После доработки 30.12.2020 г.

Принята к публикации 01.01.2021 г.

Транскрипционный фактор RIPENING INHIBITOR (ТФ RIN) — один из ключевых регуляторов каскада реакций созревания плода томата. Контролируя как этилен-зависимый, так и этилен-независимый пути созревания, ТФ RIN запускает работу множества структурных и регуляторных генов, от которых зависят такие аспекты созревания плода томата, как потеря хлорофилла, биосинтез каротиноидов, ароматических компонентов, органических кислот, модификация структуры клеточных стенок и накопление сахаров. В настоящей работе впервые клонированы и секвенированы ортологи гена *RIN* у семи сортов томата овощного (*Solanum lycopersicum* L.), образцов двух дикорастущих видов, используемых в селекционном процессе (*S. pimpinellifolium* L., *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg), и дикорастущего образца *S. lycopersicum* L. Показано, что полиморфизм нуклеотидных и аминокислотных последовательностей RIN у группы исследуемых сортов выше, чем у анализируемых дикорастущих видов. В большинстве случаев переменные сайты в последовательности ТФ RIN оказались радикальными. Определен профиль экспрессии двух изоформ гена *RIN* — *RIN1i* и *RIN2i*, в процессе созревания плодов у пяти сортов *S. lycopersicum* и дикорастущего вида *S. cheesmaniae*. Выявлена положительная корреляция количества транскриптов *RIN2i* с содержанием сахаров в спелом плоде. Показана активация экспрессии обеих изоформ гена *RIN* в ответ на экзогенное воздействие сахарозы. Это предполагает не только влияние ТФ RIN на накопление сахаров в процессе созревания, но и обратное воздействие: повышение концентрации сахаров приводит к увеличению экспрессии гена *RIN*.

Ключевые слова: *Solanum* секция *Lycopersicon*, созревание сочного плода, метаболизм сахаров, сорта томата, RIPENING INHIBITOR, изоформы *RIN1i* и *RIN2i*

DOI: 10.31857/S0015330321050195

ВВЕДЕНИЕ

Основные этапы развития сочного плода последовательно включают закладку плода, интенсивное деление клеток зародыша (до 10 дней после цветения — days after anthesis, DAA), растяжение клеток (10–40 DAA) и финальную стадию — созревание [1]. Созревание сочного плода сопровождается изменением содержания и состава фитогормонов, накоплением сахаров, биосинтезом пигментов и ароматических соединений, а также модификацией структуры клеточных стенок [1]. Комплексные биохимические и физиологические

изменения, обуславливающие процесс созревания, происходят за счет скоординированной пространственно-временной экспрессии множества структурных и регуляторных генов [2]. Ключевые роли в регуляции и контроле данного сигнального каскада выполняют транскрипционные факторы (ТФ), в частности представители семейства MADS-домениных ТФ [3].

На сегодняшний день основным модельным растением для изучения процесса развития и созревания сочного плода является томат овощной (*Solanum lycopersicum* L.). Для данного вида определены три основных ТФ, без которых созревание сочного плода невозможно, — MADS-ТФ RIPENING INHIBITOR (RIN, или SIMADS-RIN), NAC-ТФ NON-RIPENING (NOR) и SPL-ТФ

¹ К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизованных пользователей по doi: 10.31857/S0015330321050195.

COLORLESS NON-RIPENING (CNR) [4–6]. При этом показано, что ТФ RIN активирует экспрессию генов *NOR* и *CNR*, контролируя наиболее ранние этапы созревания плода [7]. Также ТФ RIN запускает гены биосинтеза этилена, тем самым инициируя этилен-зависимый путь созревания плода [8]. Более того, ТФ RIN положительно регулирует транскрипцию генов биосинтеза каротиноидов и ароматических соединений и генов модификации клеточной стенки, тем самым контролируя и этилен-независимый путь созревания плода [9, 10]. Таким образом, можно заключить, что ТФ RIN является глобальным регулятором процесса созревания плода томата [11].

На сегодняшний день структура и функции ТФ RIN достаточно полно охарактеризованы у культивируемого вида томата *S. lycopersicum* [12]. Хорошо известен фенотип томата, мутантного по гену *RIN* – *ripening inhibitor (rin)*. У мутантных растений *rin* плоды не созревают, имеют зеленую окраску и твердую текстуру перикарпа. На физиологическом уровне для таких плодов характерны потеря синтеза этилена и климактерического усиления интенсивности дыхания, резкое снижение накопления пигментов и ароматических соединений [8].

Современные сорта томата овощного обладают большим разнообразием характеристик созревания плода. Существенно варьируют длительность фазы от всходов до созревания (105–120 сут) и период потребления плодов [13]. Сами плоды по размеру и форме делятся на несколько основных типов: черри (cherry), коктейльный (grape), сливовидный (plum), крупноплодный (largefruited) [14]. Текстура перикарпа (от очень мягкой до очень плотной) регулируется большим количеством генов ремоделирования клеточной стенки [2]. Разнообразная окраска спелого плода (кремовая, желтая, оранжевая, розовая, красная, коричневая, малиновая или фиолетовая [13]) определяется количеством и соотношением синтезируемых и накапливаемых в нем пигментов [15]. Плоды каждого сорта томата имеют свой неповторимый вкус и аромат, что, в свою очередь, зависит от содержания в них сахаров, органических кислот и ароматических соединений [16].

При изучении процесса созревания плода заслуживают внимания родственные дикорастущие красноплодные виды томата (*Solanum*, секция *Lycopersicon*). Образующие ими спелые плоды имеют свой уникальный биохимический состав, и образцы данных видов могут использоваться при скрещиваниях с *S. lycopersicum* для получения новых сортов с улучшенными потребительскими характеристиками плода [17].

Учитывая вышесказанное, большой интерес представляет идентификация и сравнительная характеристика ортологов гена основного регу-

лятора созревания ТФ RIN у культивируемых сортов томата и родственных дикорастущих красноплодных видов, различающихся морфофизиологическими и биохимическими характеристиками спелого плода.

В настоящей работе проведена идентификация и структурно-функциональная характеристика ортологов гена *RIN* у семи сортов томата овощного (*Solanum*, секция *Lycopersicon*) и трех родственных дикорастущих красноплодных образцов (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Для проведения исследования выбраны образцы семи сортов томата овощного (*S. lycopersicum*) (табл. 1). Основанием для выбора послужили различия в биохимических (содержание сахаров и пигментов в спелом плоде), морфологических (размер и окраска спелого плода) и физиологических (сроки созревания) показателях (табл.1). Наряду с культурными растениями в исследовании использовались образцы двух дикорастущих родственных видов томата (*S. pimpinellifolium* и *S. cheesmaniae*) и дикорастущий образец *S. lycopersicum*, которые не культивируются, но используются при скрещивании с *S. lycopersicum* для получения новых гибридов. Образцы томата предоставлены ФГБНУ “ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова” (ГРП ВИР, Россия), Федеральным научным центром овощеводства (ФНЦО, Россия) и Tomato Genetics Resource Center (TGRC, США) (табл. 1). Семена проращивались на чашках Петри в стерильных условиях.

Выделение растительной ДНК. Из тканей молодых листьев анализируемых образцов томата выделяли геномную ДНК по протоколу [18] с дополнительной двойной депротенинизацией. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре “Qubit 4” (Thermo Fisher Scientific, США).

Аmplификация, клонирование и секвенирование ортологов гена *RIN*. Для амплификации и секвенирования генов разработали систему ген-специфичных праймеров на основе известной последовательности *RIN* (Gene ID: 543708), доступной в NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Амплифицированные фрагменты очищали с помощью набора реактивов ZymoClean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) и клонировали в плазмиду pGEM-T (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega, США) согласно протоколам производителей. Полноразмерные последовательности клонов секвенировали с использованием сконструированных праймеров к внутренним и внешним участкам на платформе ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) в ЦКП “Биоинженерия”.

Таблица 1. Характеристики анализируемых образцов сортов *S. lycopersicum*, дикорастущего образца *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*.

Образец	Происхождение образца / каталожный номер	Окраска плода	Сроки созревания (дни)		Средние размеры и масса плода			Биохимические характеристики созревших плодов		
			от цветения до полного созревания	от посева до полного созревания	масса, г	длина, см	ширина, см	содержание сахаров (мг/г сырой массы)	содержание каротиноидов (мг/г сырой массы)	содержание хлорофилла (мкг/г сырой массы)
Сорта томата овощного <i>Solanum lycopersicum</i>										
Black Jack	ФНЦО	Коричневый	47	110	20	1.5	2	Глю – 12.40 Фру – 24.63 Сах – 1.89	Ликопин – 0.29 ± 0.06 β-кар – 0.06 ± 0.005 Кар – 0.56 ± 0.17	Хл а – 3.93 Хл б – 3.75
Long John	TGRC/LA0791	Красный	65	131	40	10	3	Глю – 10.67 Фру – 11.56 Сах – 0	Ликопин – 0.18 ± 0 β-кар – 0.04 ± 0 Кар – 0.07 ± 0	Хл а – 1.15 Хл б – 0
Silvestre Recordo	ВИГРР/1580	Красный	60	117	25	2.5	2.5	н / а	н / а	н / а
Viking	ФНЦО	Желтый	49	110	100	4.5	6	Глю – 18.40 Фру – 20.60 Сах – 0	Ликопин – 0.00 β-кар – 0.005 ± 0 Кар – 0.02 ± 0.01	Хл а – 4.6 Хл б – 3.7
Paul Robeson	TGRC/LA4450	Коричневый	64	121	220	6.5	7.5	Глю – 15.83 Фру – 18.00 Сах – 0.62	Ликопин – 0.10 ± 0.03 β-кар – 0.02 ± 0.001 Кар – 0.14 ± 0.07	Хл а – 6.62 Хл б – 0.56
White Beauty	TGRC/LA2464A	Кремовый	69	124	200	5	7	Глю – 10.62 Фру – 12.87 Сах – 0	Ликопин – 0 β-кар – 0.001 ± 0 Кар – 0.004 ± 0.001	Хл а – 1.75 Хл б – 0
Red Cherry	ФНЦО	Красный	56	109	20	2.5	3	н / а	н / а	н / а
Дикорастущие красноплодные виды томата <i>Solanum</i> sect. <i>Lycopersicon</i>										
<i>S. lycopersicum</i>	TGRC/LA1673	Красный	46	120	15	1.5	1.5	н / а	н / а	н / а
<i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>rasemigerum</i>	ВИГРР/1018	Красный	41	111	10	1.5	2	н / а	н / а	н / а
<i>S. cheesmaniae</i>	TGRC/LA0421	Кремовый	64	134	0.5	0.5	0.5	Глю – 1.60 Фру – 1.94 Сах – 0	Ликопин – 0 β-кар – 0.01 ± 0.003 Кар – 0.02 ± 0.004	Хл а – 12.74 Хл б – 0

Примечание: β-кар – β-каротин, Кар – суммарное содержание каротиноидов, н / а – не анализировалось.

Таблица 2. Характеристика анализируемых последовательностей *RIN* томата

Образец	Номер доступа в GenBankNCBI	Ген, п.н.	кДНК, п.н.	Белок, а.о.	pI	Молекулярная масса, кДа
<i>S. lycopersicum</i> сорт Silvestre Recordo	MT228446	5258	660	219	7.72	25.446
<i>S. lycopersicum</i> сорт Long John	MT228454	5259	660	219	7.95	25.525
<i>S. lycopersicum</i> сорт Red Cherry	MT228447	5284	660	219	7.14	25.527
<i>S. lycopersicum</i> сорт Black Jack	MT228449	5261	660	219	7.97	25.553
<i>S. lycopersicum</i> сорт Paul Robeson	MT228451	5258	660	219	8.16	25.453
<i>S. lycopersicum</i> сорт Viking	MT228452	5258	660	219	7.95	25.525
<i>S. lycopersicum</i> сорт White Beauty	MT228453	5258	660	219	7.95	25.507
<i>S. lycopersicum</i> LA1673	MT228439	5279	660	219	7.95	25.525
<i>S. pimpinellifolium</i>	MT228440	5258	660	219	7.95	25.525
<i>S. cheesmaniae</i>	MT228455	5309	660	219	8.57	25.451

Анализ вариабельности новых ортологов гена *RIN* томата. Сборку, выравнивание и анализ нуклеотидной и аминокислотной вариабельности полученных последовательностей проводили в программе MEGA7.0 (<https://www.megasoftware.net>). Изoeлектрическую точку и молекулярную массу белков вычисляли в программе Protein isoelectric point calculator (<http://isoelectric.org>). Доменную структуру белков определяли с помощью NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и UniProt (<https://www.uniprot.org>). Влияние замещений аминокислотных остатков (а.о.) на структуру белка предсказывали с помощью PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

Анализ экспрессии ортологов гена *RIN* томата. Для анализа экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) сконструировали специфичные праймеры на основе идентифицированных последовательностей. Из плодов на двух стадиях созревания выделяли препараты суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, ФРГ) и синтезировали кДНК (GoScript, Promega, США). РВ-ПЦР проводили в двух биологических и трех технических повторах ("Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green I и ROX", Синтол, Россия) в следующих условиях: 95°C – 5 мин.; 40 циклов (95°C – 15 с, 60°C – 40 с). Для нормализации экспрессии генов томата использовали референсные гены *Expressed* (SGN-U346908) и *ACTIN2* (NM_001330119.1) [19].

Биохимический анализ плодов томата. Для биохимического анализа использовали плоды томата финальной стадии созревания (Red Ripe, RR). Измерения проводили в двух биологических и трех технических повторах. Содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы измеряли ферментативным методом (Sucrose/D-Glucose/D-Fructose, R-Biopharm, ФРГ). 1 г растительного материала гомогенизировали в 4 мл воды. Полученную суспензию филь-

тровали через Miracloth (Merck, США), 1 мл фильтрата дополнительно центрифугировали 5 мин при 10000 об./мин. Надосадочную жидкость разбавляли водой в 5 раз и измеряли абсорбцию согласно протоколу производителя. Содержание ликопина и β-каротина, а также суммарное количество каротиноидов (x + c; каротиноиды + ксантофиллы) определяли с использованием модифицированного протокола метода Фолча [19, 20].

Влияние сахарозы на экспрессию гена *RIN* определяли путем замачивания тканей плода томата на стадии смены окраски (Breaker, Br) в 4.38 мМ растворе сахарозы. Для этого в экваториальном регионе плода вырезали сегменты равного размера, содержащие все анатомические структуры (как представлено в http://tea.solgenomics.net/anatomy_viewer/microscopy/slm82_fruit). Для анализа экспрессии гена использовали временные точки 0, 30 и 180 мин.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов (вычисление стандартного отклонения) проводили с помощью программы Graph Pad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для амплификации гена *RIN* томата разработана система специфичных праймеров (Дополнительные материалы, табл. 1). Впервые определены (амплифицированы, клонированы и секвенированы) полноразмерные последовательности 10 новых ортологов гена ТФ *RIN* у образцов семи сортов *S. lycopersicum*, различающихся характеристиками созревания плода, и трех дикорастущих красноплодных образцов (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum*, *S. cheesmaniae*) (табл. 1). Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в NCBI GenBank (табл. 2).

Экзон-интронная структура новых ортологов гена *RIN* томата. Идентифицированные последова-

№ нуклеотида на кДНК	73	75	76	80	81	114	145	167	172	219	226	287	303	349	364	409	472	486	489	505	541	583	Аллельный вариант
Long John	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	A	G	G	A	C	C	A	G	A	T	C	A
<i>S. pimpinellifolium</i>	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	A	G	G	A	C	C	A	G	A	T	C	A
<i>S. lycopersicum</i>	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	A	T	G	A	C	C	A	G	A	T	C	B
Black Jack	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	G	G	G	A	C	C	A	G	A	T	C	C
<i>S. cheesmaniae</i>	A	A	A	G	A	T	T	A	C	T	A	A	G	A	A	A	T	A	A	A	T	T	D
Paul Robson	A	A	A	G	A	T	T	G	T	C	G	A	G	G	A	C	C	G	G	A	T	C	E
White Beauty	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	T	C	F
Red Cherry	A	A	G	G	T	T	T	A	T	C	G	A	G	G	G	C	C	A	G	A	T	C	G
Viking	G	A	A	C	A	T	T	A	T	C	C	A	C	A	C	C	A	C	A	G	T	C	H
Silvestre Recordo	G	A	A	G	A	T	C	A	T	C	G	A	G	G	A	C	C	A	G	A	T	C	I
Замещение аминокислоты в белке	R25G	N26D	G27A			S49P	E56G	C58F		G76S	K96R		G117R	K122E	Q137K			M163I	I169V		S181P		
	MADS-домен										I-область		K-область					C-область					

Рис. 1. Аллельные варианты анализируемых последовательностей гена *RIN* томата: показаны SNPs и соответствующие замещения а.о. (черным выделены радикальные замещения а.о. (R25G, N26D, G27A, S49P, E56G, C58F, G76S, G117R, K122E, Q137K, S181P), серым – нейтральные замещения а.о. (K96R, M163I, I169V), согласно PROVEAN.

тельности ортологов гена *RIN* всех исследуемых видов и сортов томата состояли из восьми экзонов. Протяженность последовательностей у сортов томата овощного варьировала от 5258 п.н. (Silvestre Recordo, Paul Robeson, Viking и White Beauty) до 5284 п.н. (Red Cherry). У дикорастущих видов томата разница в размерах гена была значительнее: от 5258 п.н. (*S. pimpinellifolium*) до 5309 п.н. (*S. cheesmaniae*) (табл. 2). Данное расхождение обусловлено наличием в интронах инсерций и делеций – в большинстве своем, однонуклеотидных инделей и/или поли-Т, поли-А и поли-АТ областей различной длины. Также в интронах обнаружено три протяженных индела, одна из которых (18-нуклеотидная инсерция ААТТГАТГС-ТАСАСТАТГ) присутствовала в гене *RIN* как томата овощного сорта Red Cherry, так и двух дикорастущих образцов *S. lycopersicum* и *S. cheesmaniae*. Другие две индели (36-нуклеотидная инсерция АТАТТААААСГТАТАГТТГТСАГСТГАТАТССААТС и 9-нуклеотидная делеция ТГСАТТААГ) были характерны только для *RIN* вида *S. cheesmaniae*.

Длины всех кодирующих последовательностей одинаковы и составляют 660 п.н. (табл. 2). Наибольший размер имеет экзон I (185 п.н.), который кодирует высоко консервативный домен MADS, а наименьший – экзон VIII (16 п.н.), кодирующий часть наиболее вариабельной С-концевой области белка.

Интроны ортологов *RIN* значительно превышают по общей длине кодирующие последовательности. Наиболее протяженным является интрон I, размер которого варьирует от 2879 п.н. (у *S. lycopersicum* сортов Silvestre Recordo, Paul Robeson, Viking и White Beauty, и у *S. pimpinellifolium*) до 2930 п.н. (у *S. cheesmaniae*).

Нуклеотидный полиморфизм гена *RIN* томата. Всего в идентифицированных последовательностях ортологов *RIN* всех исследуемых образцов томата выявлено 203 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism; однонуклеотидный полиморфизм). Общий уровень вариабельности гена составил 3.78%. Ортологи *RIN* образцов дикорастущих красноплодных видов (дикорастущий образец *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*) содержат 91 SNPs (1.69%), в то время как внутри группы сортов то-

мата овощного *S. lycopersicum* найдено 132 SNPs (2.46%). Таким образом, общая вариабельность ортологов гена *RIN* сортов томата в полтора раза превосходит таковую у дикорастущих родственных красноплодных видов секции *Lycopersicon*.

В кодирующих последовательностях ортологов *RIN* выявлено 22 вариабельных сайта. Наибольшее их количество (14 SNPs) характерно для *RIN* сортов томата; остальные 8 SNPs – у *RIN* дикорастущих красноплодных видов.

Анализ аллельной вариабельности кДНК *RIN* в исследуемой выборке из 10 образцов томата обнаружил 9 аллельных вариантов (рис. 1). Показано, что сорт Long John и вид *S. pimpinellifolium* имеют общий аллельный вариант кДНК *RIN*, в то время как остальные образцы характеризуются индивидуальными аллельными вариантами кДНК *RIN* (рис. 1). Среди анализируемых образцов наибольшее количество уникальных замен (7 SNPs) выявлено в кДНК *RIN* вида *S. cheesmaniae*. По три сортоспецифичных SNPs в кДНК *RIN* найдено у сортов Red Cherry, Viking и Silvestre Recordo, по две – у сортов Paul Robeson и White Beauty, и по одной – у дикорастущего образца *S. lycopersicum* и сорта Black Jack (рис. 1).

Аминокислотная вариабельность выявленных ортологов ТФ *RIN* томата. кДНК идентифицированных ортологов гена *RIN* транслировали *in silico* (в программе MEGA7.0), и определили вариабельность полученных белковых молекул. Показано, что данная последовательность кодирует белок длиной 219 а.о. с молекулярной массой около 25.5 кДа (табл. 2).

Из 22 нуклеотидных замен, найденных в экзонах, 14 приводят к замещениям а.о. Общий уровень аминокислотной вариабельности у всех анализируемых образцов составил 6.39% (1.82% и 4.56% – вариабельность белка в группе дикорастущих видов и сортов соответственно).

В последовательности полученных ортологов ТФ *RIN* определены основные консервативные домены и мотивы. Согласно данным UniProt, позицию с 1 по 61 а.о. занимает высоко консервативный MEF2-like MADS-домен, а с 87 по 177 а.о. – консервативный кератин-подобный (К) домен. В MADS-домене выявлено шесть радикальных за-

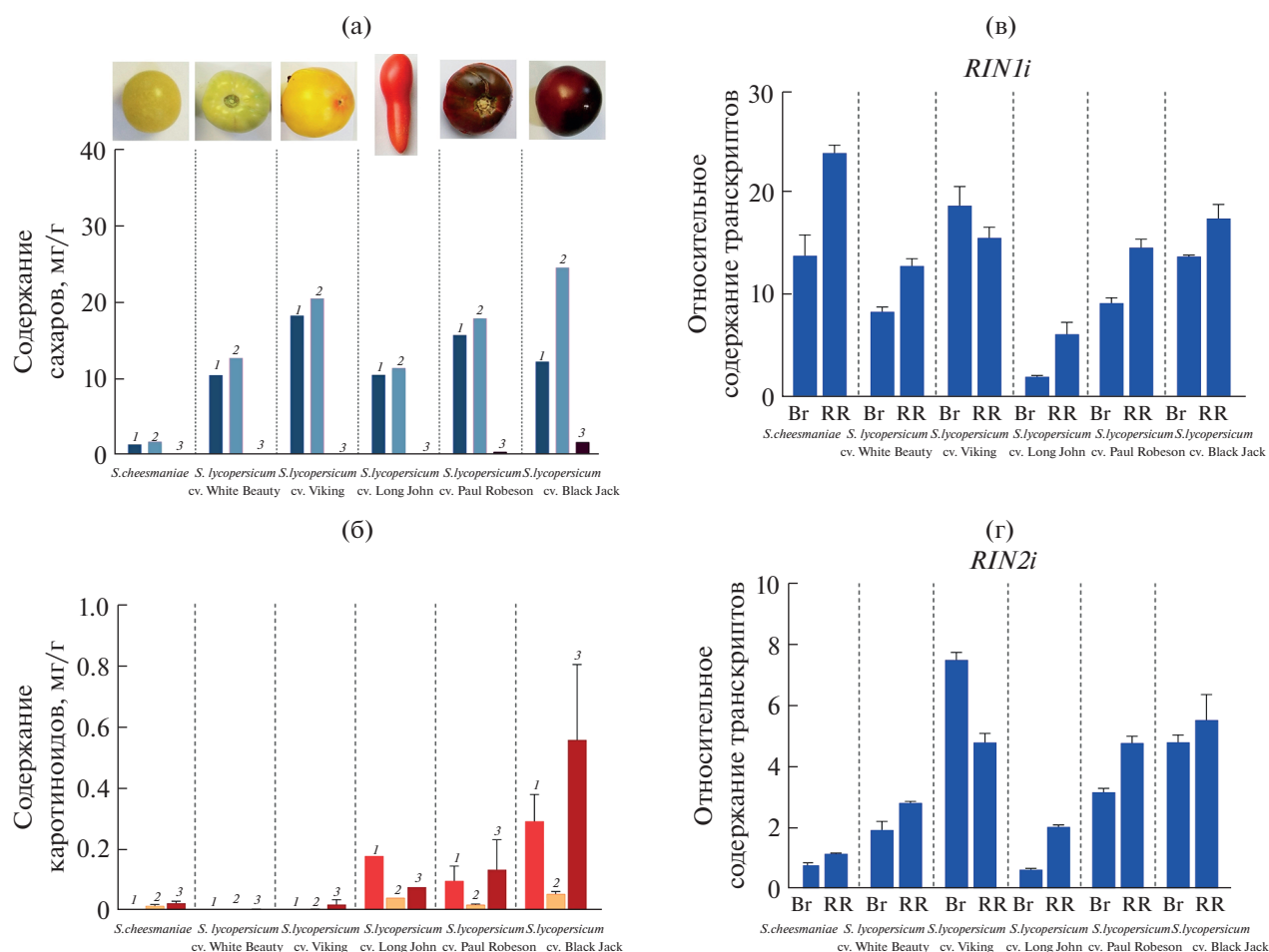


Рис. 2. Содержание сахаров (глюкозы – 1, фруктозы – 2 и сахарозы – 3) (а) и каротиноидов (ликопин – 1, бета-каротин – 2 и сумма каротиноидов – 3) (б) в спелых плодах анализируемых образцов томата. Профили экспрессии *RIN1i* (в) и *RIN2i* (г) в созревающем (стадия Br) и спелом (стадия RR) плодах анализируемых образцов томата.

мещений а.о., в I-области (с 62 по 86 а.о.) – одно радикальное замещение, в K-домене – шесть, три из которых радикальные, в C-области (с 178 по 219 а.о.) – одно радикальное замещение (рис. 1).

Анализ экспрессии ортологов гена *RIN* томата. Для сравнительного анализа экспрессии в исследуемой выборке из 10 образцов томата выбраны пять сортов (White Beauty, Viking, Long John, Paul Robeson и Black Jack) и дикорастущий вид *S. cheesmaniae*, характеристики созревания плода которых наиболее разнообразны. В первую очередь, данные образцы различаются сроками созревания: очень раннеспелые сорта (Viking, Black Jack), позднеспелые (White Beauty, Paul Robeson, *S. cheesmaniae*) и очень позднеспелый сорт (Long John). Размеры плодов варьируют от 0.5 г (*S. cheesmaniae*) до 220 г (сорт Paul Robeson). Окраска плода также различается: кремовая (*S. cheesmaniae*, сорт White Beauty), желтая (сорт Viking), красная (сорт Long John), темно-коричневая (сорты Paul Robeson и Black Jack) (табл. 1, рис. 2).

Чтобы дополнить характеристики созревания и провести дальнейшую оценку возможных корреляций варибельности и экспрессии *RIN* с признаками спелого плода, в спелых плодах исследуемых образцов определено содержание сахаров и каротиноидов. В результате для всех исследуемых образцов показано присутствие глюкозы и фруктозы, при этом общее количество данных гексоз у вида *S. cheesmaniae* значительно ниже, чем у сортов. Интересно отметить, что у сортов с коричневой окраской плода (Paul Robeson и Black Jack) присутствует также небольшое количество сахарозы (рис. 2а).

Анализ содержания каротиноидов показал отсутствие ликопина в плодах кремовой и желтой окраски (*S. cheesmaniae*, сорта White Beauty и Viking). При этом в спелых плодах *S. cheesmaniae* и сорта Viking обнаружены следовые количества β-каротина и общих каротиноидов (x + c). У красноплодного сорта Long John и коричневоплодных сортов Paul Robeson и Black Jack выявлено высо-

кое содержание ликопина и общих каротиноидов, а также незначительное количество β -каротина (рис. 2б).

Поскольку *RIN* является регулятором биосинтеза каротиноидов в плоде томата, в исследуемых образцах был проведен анализ экспрессии гена *RIN*. В базе данных NCBI представлены две формы транскриптов гена *RIN*, которые отличаются 3'-областью (NM_001247741.2 – транскрипт *RIN1i*; NM_001315495.1 – транскрипт *RIN2i*).

Основываясь на существовании двух форм транскриптов гена *RIN*, была разработана система праймеров, позволяющая дифференцировать экспрессию каждой формы отдельно (Дополнительные материалы, табл. 1). Согласно опубликованным данным [8] и данным Tomato Expression Atlas (<http://tea.solgenomics.net/>), максимальных значений экспрессия гена *RIN* достигает в созревающем (стадия Вг, замещение зеленой окраски) и полностью спелом плодах (стадия RR, окраска при спелости), поэтому в данной работе для анализа экспрессии *RIN* были использованы плоды стадий Вг и RR.

Согласно полученным данным РВ-ПЦР, в плодах обеих стадий созревания (Вг и RR) всех шести анализируемых образцов томата присутствуют обе формы транскриптов гена *RIN* (рис. 2в, г). Так как эффективность протекания ПЦР для пар праймеров, специфичных для обеих изоформ, была сопоставима, можно заключить, что относительный уровень накопления транскрипта *RIN1i* в 3 раза больше, чем транскрипта *RIN2i* (рис. 2в, г).

Было показано, что у всех анализируемых образцов уровень экспрессии обоих транскриптов *RIN1i* и *RIN2i* рос от стадии Вг к стадии RR, за исключением сорта Viking, где уровень снижался (рис. 2в, г). При этом в плодах именно сорта Viking зарегистрирован самый высокий уровень экспрессии обеих форм транскриптов *RIN*. Наименьший уровень (среди сортов) – у сорта Long John. У образца дикорастущего вида *S. cheesmaniae*, относительное количество транскриптов *RIN1i* выше, а транскриптов *RIN2i* ниже, чем у всех исследуемых сортов (рис. 2в, г).

Анализ полученных данных в сопоставлении с характеристиками образцов сортов и вида *S. cheesmaniae* показал, что профили экспрессии гена *RIN* не соотносятся ни со сроками созревания, ни с размером плода, ни с содержанием каротиноидов. Тем не менее, прослеживается некоторая корреляция между числом транскриптов *RIN2i* и содержанием фруктозы и глюкозы в спелом плоде (рис. 2, рис. 3). При этом более достоверной является корреляция с содержанием фруктозы ($R^2 = 0.9228$) (рис. 3а), корреляция же с концентрацией глюкозы меньше ($R^2 = 0.6585$) (рис. 3б).

Важно отметить, что найденная корреляция может быть как следствием влияния ТФ *RIN* на

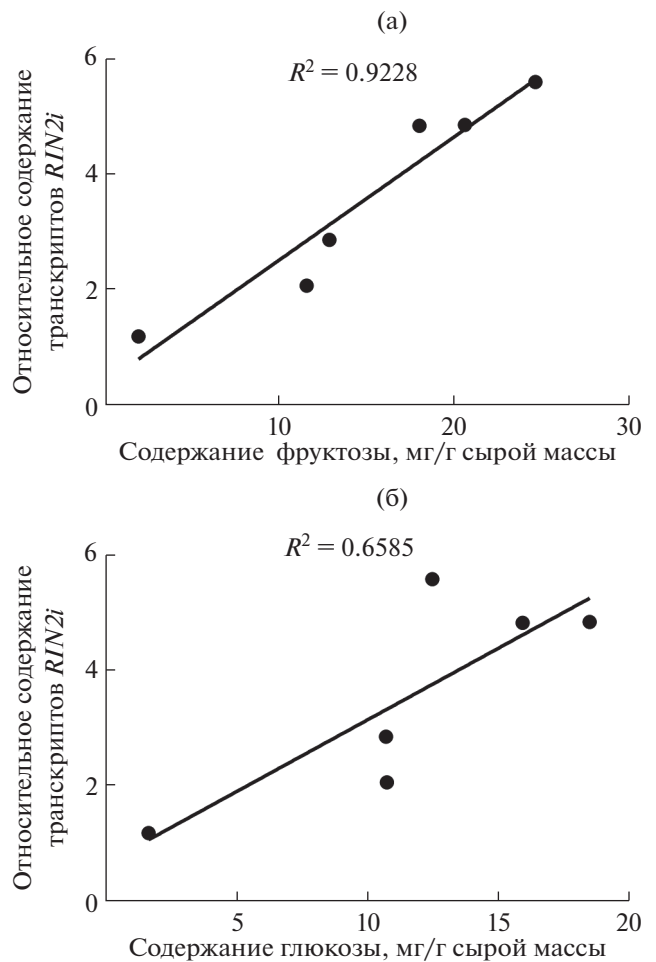


Рис. 3. Положительная корреляция между содержанием фруктозы (а) и глюкозы (б) и количеством транскриптов *RIN2i* в спелых плодах (стадия RR) анализируемых образцов томата.

активность ферментов углеводного метаболизма, так и, наоборот, активность гена *RIN* может увеличиваться в ответ на накопление в клетке сахаров. Чтобы проверить это, был изучен профиль экспрессии гена *RIN* в ответ на экзогенное воздействие сахарозы (предшественника глюкозы и фруктозы) на плоды стадии Вг сорта White Beauty, для которого характерно среднее содержание сахаров. В результате было показано, что через 30 мин инкубации количество обоих транскриптов гена *RIN* вырастает примерно в 3 раза, а через 2 ч – в 20 раз (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Вариабельность гена ТФ *RIN* у сортов *S. lycopersicum* превышает уровень полиморфизма гена у анализируемых дикорастущих образцов. Культивирование томата осуществляется на протяжении более 400 лет, и на сегодняшний день получено уже более

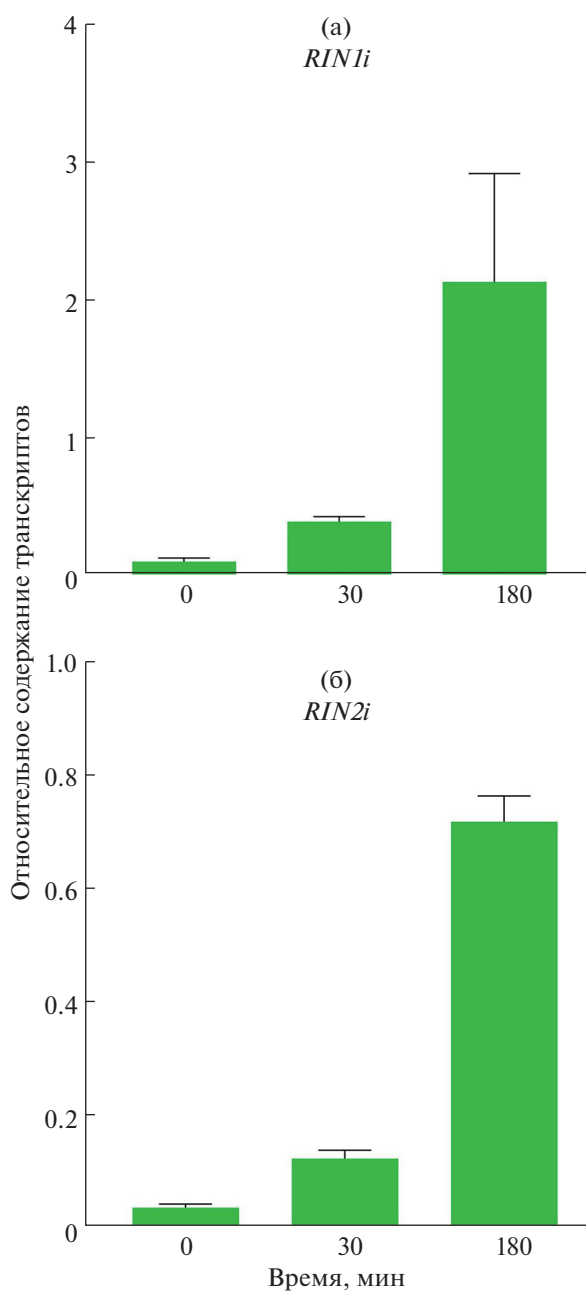


Рис. 4. Изменение экспрессии изоформ *RINi* (а) и *RIN2i* (б) гена *RIN* в ответ на экзогенное воздействие 0.15% раствора сахарозы в ткани созревающего плода (Br).

10000 различных сортов [14]. Такой длительный процесс одомашнивания томата привел к значительным ограничениям его генетического полиморфизма [14]. Современные сорта томата содержат лишь менее 5% от генетической вариабельности их дикорастущих сородичей [21] и, несмотря на огромное морфофизиологическое разнообразие сортов, считается, что дикорастущие образцы *S. lycopersicum* и родственные виды томата (секция *Lycopersicon*) превосходят современные сорта по разнообразию

физиологических и биохимических характеристик [22]. По этой причине селекционеры все чаще обращаются к межвидовым скрещиваниям с целью интрогрессии в сорта хозяйственно ценных признаков дикорастущих видов [14].

В противоположность сказанному, данные, полученные в настоящей работе, показывают, что по гену *RIN* и кодируемой им аминокислотной последовательности ТФ *RIN* внутривидовой полиморфизм между сортами *S. lycopersicum* в 1.5 и 2.5 раза, соответственно, превосходит полиморфизм дикорастущих видов.

Подобное расхождение может, в первую очередь, объясняться тем, что в работе рассматривались только дикорастущие виды, формирующие красный или оранжевый плод. Именно они представляют интерес для изучения гена *RIN* как основного регулятора процесса созревания плода. В то же время наиболее полиморфными являются зеленоплодные, более древние виды томата [23], у которых, однако, отсутствуют признаки созревания плода, свойственные сортам.

Кроме того, напомним, что ген *RIN* определяет именно те морфофизиологические характеристики плода, которые максимально интересны для селекционеров и потребителей. Поэтому отбор сортов на разнообразие данных признаков, очевидно, должен приводить к повышению вариабельности основного их регулятора – гена *RIN*, тогда как геном в целом остается консервативным.

В этом аспекте важно заметить, что в большинстве случаев выявленные замещения аминокислотных остатков в последовательности ТФ *RIN* являются радикальными. В случае сортов, радикальные замещения присутствуют во всех структурных единицах *RIN*, начиная от высококонсервативных MADS- и К-доменов и заканчивая междоменной I-областью и С-концевой последовательностью. Потенциально такие замещения могут приводить к изменению структуры и, как следствие, функции ТФ. К примеру, известно, что MADS-домен отвечает за связывание ТФ с промотором гена-мишени [24], К-домен определяет белок-белковые взаимодействия ТФ и формирование мультимерных комплексов MADS-ТФ, в составе которых они осуществляют свои функции [25], а С-область определяет способность MADS-ТФ активировать транскрипцию гена-мишени [26]. Следовательно, радикальные замещения в данных участках ТФ *RIN* могут изменять связывание ТФ с ДНК-мишенью, его способность объединяться в функциональные комплексы и активировать транскрипцию генов-мишеней.

Уровень экспрессии гена *RIN* не коррелирует с размером плода и с содержанием каротиноидов в спелом плоде. Известно, что плоды меньшего размера быстрее достигают созревания [14]. В настоящей работе использовались образцы томата,

формирующие плоды разного размера и веса (0.5–220.0 г), при этом корреляция данного признака с уровнем экспрессии гена *RIN* отсутствует. Также, согласно полученным результатам, такой зависимости не наблюдалось и для признаков содержания и состава каротиноидов, длительности созревания и степени размягчения и лежкости спелых плодов.

Содержание сахаров в спелом плоде положительно коррелирует с уровнем экспрессии изоформы транскрипта *RIN2i*. На всем протяжении репродуктивного развития томата сахара играют важнейшую роль в определении количества и сроков роста и созревания сочных плодов, поставляя энергию для всех этих процессов; от сахаров во многом зависят характеристики спелого плода (сахаристость, размер и др.) [1, 27]. На поздних этапах развития плод томата становится полностью гетеротрофным органом, зависимым от поступления из фотосинтезирующих тканей сахарозы, гидролиз которой приводит к максимально возможному накоплению глюкозы и фруктозы [1, 27].

В плодах томата гидролиз сахарозы и продукты ее распада находятся под контролем инвертаз и их ингибиторов (VI, VIF, LIN7, LIN8, CIF1, NI2, NI4, др.), сахарозосинтаз (SS3, SS4, др.), сахарозофосфатсинтаз (SPSA1, SPSB, др.), фруктокиназ (FK-Like1, FK-like2, др.) и гексокиназ (HK3, HK4, HK6, др.) [27]. Экспериментально показано, что ТФ RIN напрямую связывается с регуляторными элементами (CARG-box) в промоторах кодирующих данные белки генов, регулируя тем самым их экспрессию и метаболизм сахарозы [27].

В настоящей работе показана зависимость между уровнем экспрессии изоформы транскрипта *RIN2i* и содержанием фруктозы и глюкозы в спелом плоде (рис. 2, 3). Можно предположить, что именно изоформа *RIN2i* осуществляет основную регуляцию метаболизма сахарозы в плоде томата по мере его созревания. В данном аспекте изоформа *RIN1i* может рассматриваться как дополняющий функцию партнер *RIN2i*, что было недавно продемонстрировано [28].

Рост содержания сахаров положительно воздействует на уровень экспрессии изоформы *RIN2i*. Известно, что сахара могут выступать, аналогично гормонам, в качестве первичных мессенджеров, запуская каскады реакций [29]. Также, регуляторная роль сахарозы, предположительно, заключается в регуляции клеточного метаболизма путем изменения экспрессии генов [27]. Продукты распада сахарозы, глюкоза и фруктоза, фосфорилируются, что предполагает их участие в передаче сигнала [27].

Положительная корреляция между уровнем экспрессии *RIN2i* и содержанием гексоз в плоде томата не отвечает на вопрос, что первично: экспрессия ли *RIN2i* приводит к росту концентрации

гексоз, или же, наоборот, большое содержание гексоз активирует транскрипцию *RIN2i*. Действительно, помимо воздействия гена *RIN* на работу ферментов углеводного метаболизма, показана и обратная связь между степенью активности ферментов углеводного метаболизма и уровнем экспрессии *RIN* [27]. Таким образом, сахара могут выступать в качестве сигнальных молекул, активирующих транскрипцию гена *RIN*.

В настоящей работе проведена экспериментальная проверка данного предположения с помощью оценки изменения экспрессии гена *RIN* в ответ на экзогенное воздействие сахарозы. В результате показано, что инкубация созревающих плодов в 0.15% растворе сахарозы активирует экспрессию обеих изоформ гена *RIN* (рис. 4). Таким образом, с одной стороны, ТФ RIN влияет на обмен сахаров в клетках плода томата при созревании за счет активации ферментов метаболизма сахарозы, фруктозы и глюкозы. С другой стороны, концентрация сахаров в клетке оказывает регулирующее воздействие на экспрессию гена *RIN*.

Чем больше белка ТФ RIN накапливается в клетке, тем активнее инвертазы разрушают сахарозу. При этом корреляция между уровнем экспрессии *RIN2i* и содержанием глюкозы не такая строгая, как в отношении фруктозы (рис. 3), хотя при работе инвертаз обе гексозы образуются в равном количестве. Это можно объяснить существованием дополнительного источника глюкозы — крахмала, гены деградации которого не являются мишенями *RIN*. Кроме того, фруктоза слаще других сахаров, и при селекции сортов томата усилия направлены на увеличение в спелых плодах именно ее содержания [1]. При этом желаемый сдвиг равновесия в сторону фруктозы может происходить за счет ферментативной изомеризации глюкозы с образованием молекул фруктозы [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день неоспоримой является важнейшая роль ТФ RIN и его гомологов в процессе созревания сочного плода не только томата, но и растений из других семейств. Четкое понимание особенностей работы ТФ RIN имеет теоретическое значение для прояснения молекулярных механизмов регуляции созревания сочного плода. Более того, практический интерес к описанию гена *RIN* обусловлен возможностью его дальнейшего использования для биотехнологии, так как многие подконтрольные ТФ RIN гены ассоциированы с хозяйственно ценными признаками (цвет плодов, их вкус и аромат, сроки созревания и хранения). Для возможности дальнейшего практического применения гена *RIN* с целью улучшения сортов томата необходима оценка его природной вариабельности и профилей экспрессии у современных сортов с различными морфологическими и био-

химическими характеристиками созревших плодов и поиск возможных корреляций с отдельными признаками.

Результаты оценки аллельной и аминокислотной вариабельности гена *RIN* у семи современных сортов томата овощного, приведенные в данной работе, выявили превосходящий уровень полиморфизма последовательностей *RIN* у группы сортов по сравнению с группой дикорастущих родственных видов томата, используемых в селекционном процессе. Вероятно, это связано с тем, что ген *RIN*, как считается, определяет именно те морфофизиологические характеристики плода, которые максимально интересны для селекционеров и потребителей, и в процессе селекции сортов отбирались максимально разнообразные аллели данного гена. Проведенный функциональный анализ показал, что профиль экспрессии *RIN* коррелирует с содержанием сахаров. Более того, согласно представленным результатам, найденная корреляция может являться не только результатом активации ТФ *RIN* генов-мишеней гидролизующих сахарозу ферментов, но и следствием обратной зависимости: экспрессия гена *RIN* может усиливаться в ответ на увеличение концентрации сахаров, что показано в результате опыта с экзогенной обработкой плодов сахарозой. Несмотря на то, что мишени гена *RIN* достаточно хорошо описаны, в настоящий момент крайне мало сведений о том, какой фактор в свою очередь может запускать экспрессию самого гена *RIN*.

Таким образом, полученные данные вносят вклад в понимание разнообразия структуры и функций ортологов ТФ *RIN* томата.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-76-00006 и, частично, Министерства науки и высшего образования РФ, с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, Федерального исследовательского центра Биотехнологии РАН).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Quinet M., Angosto T., Yuste-Lisbona F.J., Blanchard-Gros R., Bigot S., Martinez J.P., Lutts S.* Tomato Fruit Development and Metabolism // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10:1554. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01554>
2. *Karlova R., Chapman N., David K., Angenent G.C., Seymour G.B., de Maagd R.A.* Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 4527. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru316>
3. *Li S., Chen K., Grierson D.* A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening // *New Phytol.* 2019. V. 221. P. 1724. <https://doi.org/10.1111/nph.15545>
4. *Robinson R., Tomes M.* Ripening inhibitor: a gene with multiple effect on ripening Tomato // *Genet. Coop.* 1968. V. 18. P. 36.
5. *Tigchelaar E., Tomes M., Kerr E., Barman R.* A new fruit ripening mutant, non-ripening (nor) // *Rep. Tomato Genet. Coop.* 1973. V. 23. P. 33.
6. *Thompson A.J., Tor M., Barry C.S., Vrebalov J., Orfila C., Jarvis M.C., Giovannoni J.J., Grierson D., Seymour G.B.* Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant // *Plant Physiol.* 1999. V. 120. P. 383.
7. *Zhong S., Fei Z., Chen Y.R., Zheng Y., Huang M., Vrebalov J., McQuinn R., Gapper N., Liu B., Xiang J., Shao Y., Giovannoni J.J.* Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 154.
8. *Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Schuch W., Giovannoni J.* A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus // *Science.* 2002. V. 296. P. 343.
9. *Fujisawa M., Nakano T., Shima Y., Ito Y.* A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 371.
10. *Qin G., Wang Y., Cao B., Wang W., Tian S.* Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor *RIN* in fruit ripening // *Plant J.* 2012. V. 70. P. 243.
11. *Osorio S., Alba R., Damasceno C.M., Lopez-Casado G., Lohse M., Zanor M.I., Tohge T., Usadel B., Rose J.K., Fei Z., Giovannoni J.J., Fernie A.R.* Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 405.
12. *Ito Y.* Regulation of Tomato Fruit Ripening by MADS-Box Transcription Factors // *Horticulture.* 2016. V. 50 P. 33.
13. *Бондарева Л.Л.* Методические указания по апробации овощных и бахчевых культур. Москва. ФГБНУ ФНЦО, 2018. 224 с.
14. *Bhattarai K., Sharma S., Panthee D.R.* Diversity among Modern Tomato Genotypes at Different Levels in Fresh-Market Breeding // *International Journal of Agronomy.* 2018. V. 2018: 4170432. <https://doi.org/10.1155/2018/4170432>
15. *Kang S.I., Hwang I., Goswami G., Jung H.J., Nath U.K., Yoo H.J., Lee J.M., Nou I.S.* Molecular Insights Reveal *Psy1*, *SGR*, and *SIMYB12* Genes are Associated with Diverse Fruit Color Pigments in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // *Molecules.* 2017. V. 22: 2180. <https://doi.org/10.3390/molecules22122180>

16. *D'Angelo M., Zanor M.I., Sance M., Cortina P.R., Boggio S.B., Asprelli P., Carrari F., Santiago A.N., Asís R., Peralta I.E., Valle E.M.* Contrasting metabolic profiles of tasty Andean varieties of tomato fruit in comparison with commercial ones // *J. Sci. Food Agric.* 2018. V. 98. P. 4128.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8930>
17. *Pratta G.R., Rodriguez G.R., Zorzoli R., Valle E.M., Picardi L.A.* Phenotypic and molecular characterization of selected tomato recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* // *J. Genet.* 2011. V. 90. P. 229.
<https://doi.org/10.1007/s12041-011-0063-0>
18. *Edwards K., Johnstone C., Thompson C.* A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19: 1349.
<https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
19. *Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z.* Differential Regulation of Phytoene Synthase *PSY1* During Fruit Carotenogenesis in Cultivated and Wild Tomato Species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants.* 2020. V. 9: 1169.
<https://doi.org/10.3390/plants9091169>
20. *Filyushin M.A., Dzhos E.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z.* Dependence of Pepper Fruit Colour on Basic Pigments Ratio and Expression Pattern of Carotenoid and Anthocyanin Biosynthesis Genes // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 1054.
<https://doi.org/10.1134/S1021443720050040>
21. *Henareh M., Dursun A., Mandoulakani B.A.* Genetic diversity in tomato landraces collected from Turkey and Iran revealed by morphological characters // *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus.* 2015. V. 14. P. 87.
22. *Cebolla-Cornejo J., Roselló S., Nuez F.* Phenotypic and genetic diversity of Spanish tomato landraces // *Scientia Horticulturae.* 2013. V. 162. P. 150.
23. *Lin T., Zhu G., Zhang J., Xu X., Yu Q., Zheng Z., Zhang Z., Lun Y., Li S., Wang X., Huang Z., Li J., Zhang C., Wang T., Zhang Y., et al.* Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. P. 1220.
<https://doi.org/10.1038/ng.3117>
24. *Aerts N., de Bruijn S., van Mourik H., Angenent G.C., van Dijk A.D.J.* Comparative analysis of binding patterns of MADS-domain proteins in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Plant Biol.* 2018 V. 18:131.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1348-8>
25. *Kaufmann K., Melzer R., Theissen G.* MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants // *Gene.* 2005. V. 347. P. 183.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.014>
26. *Immink R.G., Tonaco I.A., de Folter S., Shchennikova A., van Dijk A.D., Busscher-Lange J., Borst J.W., Angenent G.C.* SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation // *Genome Biol.* 2009. V. 10: R24.
<https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-2-r24>
27. *Qin G., Zhu Z., Wang W., Cai J., Chen Y., Li L., Tian S.* A Tomato Vacuolar Invertase Inhibitor Mediates Sucrose Metabolism and Influences Fruit Ripening // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 1596.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01269>
28. *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 Physiol.* 2020. V. 183. P. 80.
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00020>
29. *Rolland F., Moore B., Sheen J.* Sugar sensing and signaling in plants // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. S185.
<https://doi.org/10.1105/tpc.010455>
30. *Beaujean A., Ducrocq-Assaf C., Sangwan R.S., Lilius G., Bülow L., Sangwan-Norreel B.S.* Engineering direct fructose production in processed potato tubers by expressing a bifunctional alpha-amylase/glucose isomerase gene complex // *Biotechnol. Bioeng.* 2000. V. 70. P. 9.
[https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70:1<9::aid-bit2>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70:1<9::aid-bit2>3.0.co;2-7)