

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ *INNER NO OUTER* У ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ ТОМАТА

© 2019 г. М. А. Филюшин¹, *, М. А. Слугина^{1,2}, Е. З. Кочиева^{1,2}, А. В. Щенникова¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 02.02.2018 г.

После доработки 26.03.2018 г.

Принята к публикации 03.04.2018 г.

Ген *INNER NO OUTER* принадлежит семейству факторов транскрипции *YABBY* и определяет идентичность абаксиального слоя клеток внешнего интегумента семязачатки. В настоящем исследовании идентифицированы и охарактеризованы полногеномные последовательности *INO* у 12 образцов 11 видов томата секции *Lycopersicon*. В белках *INO* всех анализируемых видов томата были идентифицированы консервативные домены цинкового пальца и *YABBY*. В последовательностях генов *INO* видов томата выявлено 243 переменных сайта (12.9% от выровненной длины), из которых 43 локализованы в экзонах, включая SNPs, приводящие к замещениям аминокислотных остатков в домене цинкового пальца (10), *YABBY*-домене (2) и внедоменной области (10). У *INO S. arcanum* была выявлена делеция 10 а.о. в С-концевой внедоменной области.

Ключевые слова: *INNER NO OUTER (INO)*, *Solanum*, *YABBY*, дикорастущие виды томата.

DOI: 10.1134/S0016675819020073

При всем многообразии морфологии цветков покрытосеменных растений имеет консервативную структуру, в том числе строение репродуктивных органов, функция которых – производство семени, несущего зародыш нового растения. Семя развивается из семязачатки, основные части которого – нуцеллус, окруженный одним или двумя интегументами (покровами), и семяножка [1]. Считается, что сходство организации семязачатки является результатом консервативного механизма регуляции пространственно-временной экспрессии гомологичных генов. Так, на развитие нуцеллуса существенное влияние оказывают факторы транскрипции семейств *MADS-box* и *KNOX*, а онтогенез внешнего интегумента невозможен без активности фактора транскрипции *INNER NO OUTER (INO)* семейства *YABBY* [2, 3].

Семейство генов *YABBY*, специфичное для растений, появилось в результате эволюционной дубликации гена-предшественника с последующей диверсификацией гомологичных генов, основная роль которых – контроль полярного развития латеральных органов. Эволюция этих генов считается одной из причин возникновения плоского листа и, позднее, цветковых органов. Наиболее полно гены *YABBY* изучены у модельного растения *Arabidopsis thaliana* [4–6]. В семействе *YABBY*

различают “вегетативные” гены *YABBY1*, *YABBY2*, *YABBY3* и *YABBY5*, определяющие абаксиально-адаксиальную асимметрию всех надземных листовидных органов, и два “генеративных” гена *INO* и *CRABS-CLAW (CRC)*, которые в процессе эволюции приобрели узкую специализацию. Так, *INO* определяет идентичность абаксиального (наружного) слоя клеток внешнего покрова семязачатки [1, 7, 8], а *CRC* участвует в регуляции развития завязи и нектарников [4, 9, 10].

Данные о полиморфизме генов-гомологов *INO* могут быть информативны в свете изучения формирования и развития семян, поскольку внешний интегумент необходим для определения положения микропиле и для последующего образования семенной кожуры, что непосредственно влияет на жизнеспособность семян. Также стоит отметить, что сам интегумент как эволюционное образование появился с возникновением семян и, соответственно, свойствен только семенным растениям. Как правило, растительный геном содержит одну копию гена *INO*, у некоторых видов выявлено несколько изоформ *INO*, что является следствием альтернативного сплайсинга [11, 12]. Как и растительные факторы транскрипции других семейств у двудольных растений, белки *YABBY* обладают высокой структурно-функциональной

гомологией. Белок INO, как и другие члены семейства YABBY, содержит на С-конце сходный с НМГ-боксом YABBY-домен, а на N-конце – домен цинкового пальца Cys2Cys2-типа [4].

Определено, что асимметричный рост интегумента семязачатка *A. thaliana* опосредован взаимодействием INO с SUPERMAN [5, 13], а также с ко-активатором ADA2b/PRZ1 и ко-репрессорами LEUNIG и SEUSS [3]. Мутации в гене или промоторе INO вызывают аномалии развития семязачатка вплоть до его отсутствия [5, 8]. Учитывая степень участия INO в развитии семязачатка, можно предположить связь полиморфизма генов/белков INO с числом интегументов.

Известно, что унитегмальный семязачаток как более недавний эволюционный признак характерен для всех представителей Asterids, к которому принадлежит семейство Solanaceae, включающее важные овощные культуры перец (род *Capsicum*), картофель (секция *Petota* род *Solanum*) и томат (секция *Lycopersicon* род *Solanum*). Секция *Lycopersicon* включает в себя культивируемый вид томат овощной *Solanum lycopersicum* и 12 дикорастущих видов [14, 15]. К настоящему времени ген INO охарактеризован только у *S. lycopersicum* [16, 17] и *S. pimpinellifolium* [18].

В настоящей работе были идентифицированы и охарактеризованы полногеномные последовательности INO 12 образцов 11 видов томата (табл. 1). ДНК выделяли из свежих листьев согласно [19]. На основе последовательности INO *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (GeneID:101244955) были разработаны специфичные праймеры для амплификации полных последовательностей генов-гомологов INO у исследуемых видов томата – INOF (5'-AУТСТАGATYCCCTCTCTCAC-3') и INOR (5'-TTGACAATRGCATCTTYAACAC-3'). Также для секвенирования были разработаны внутренние праймеры, специфичные к последовательностям четвертого (INOex4F; 5'-AGAGAGCTCCWTCCKGCTTA-3') и пятого (INOex5R; 5'-AAGCTTGCTTGAGT-CATG-3') экзонов. ПЦР-фрагменты клонировали в pGEMT-easy (Promega, Madison, США) и секвенировали (по 4 клон) на платформе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (ЦКП “Биоинженерия”). Структурно-филогенетический анализ проводили в программе MEGA 7.0. В качестве референсной использовали последовательность *SIINO S. lycopersicum* cv. Heinz 1706. Консервативные домены определяли с помощью программы NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и литературных данных [16]. Влияние аминокислотных замен на структуру и функции белков предсказывали с помощью программы PROVEAN (<http://provean.jcvi.org>).

Полные последовательности гена INO были амплифицированы, клонированы и секвенированы у всех 12 анализируемых образцов томата. Об-

щая длина гена, включающего семь экзонов, варьировала от 1775 пн у *S. chilense* до 1827 пн у *S. peruvianum* var. *dentatum* (табл. 1), в основном за счет коротких инделей в интронах. Определенные генетические расстояния между исследуемыми видами томата были невелики и составляли от 0.00 (*S. lycopersicum* cv. *Silvestre recordo* – *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium*) до 0.05 (*S. peruvianum* var. *dentatum* – *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. chmielewskii*). Однако они были больше генетических расстояний между последовательностями гена INO (0.00–0.03) у видов рода *Capsicum* [20].

Размер кДНК INO составил 579 пн, за исключением INO *S. arcanum* (549 пн; делеция 30 пн в экзоне VI) и *S. habrochaites* (576 пн; делеция 3 пн в экзоне II) (табл. 1). У *S. pennellii*, который считается наиболее древним видом томата [14], размер кДНК INO составляет 585 пн. У другого представителя рода *Solanum*, картофеля *S. tuberosum*, размер кДНК INO составляет 600 пн благодаря вставке 24 пн и делеции 3 пн в экзоне III (табл. 1).

Белки INO имели размер 192 а.о., за исключением INO *S. arcanum* (182 а.о.) и *S. habrochaites* (191 а.о.). Для сравнения INO видов *Capsicum* состоит из 215 а.о. [20], а INO *A. thaliana* – из 262 а.о., что предполагает существенную разницу длин между доменными участками белка INO. На основании этого можно было бы связать размер между доменными областями INO с числом покровов семязачатка. Однако у видов *Prunus*, как уни-, так и битегмальных, INO имеет размер около 220 а.о. [21]. К тому же было показано отсутствие связи между уни- или битегмальной структурой семязачатка и экспрессией гена INO [1, 21].

В белках INO всех анализируемых видов томата были идентифицированы консервативные домены цинкового пальца (12–52 а.о.) и YABBY (108–163 а.о.) (рис. 1,а).

В сравнении с референсным геном *SIINO* в последовательностях INO исследуемых образцов томата выявлены 243 вариабельных сайта (12.9% от выровненной длины): 200 локализованы в интронах, 43 – в экзонах. Из 43 экзон-специфичных SNPs 22 были несинонимичными и приводили к замещениям аминокислотных остатков: 10 – в домене цинкового пальца (Q12E, Y22F, S34G, C37S, V40I, R44G, C48R, T49N, T50A, L52R), девять – в между доменной области (F67L, D68N, P73S, T81I, N88D, S89A, D92E, N99D, L102V), два – в YABBY-домене (V108D, F125L), и одно – на С-конце (V175G). При этом следует отметить, что четыре радикальных замещения в домене цинкового пальца (S34G, R44G, C48R, T49N) и оба радикальных замещения в YABBY-домене признаны потенциально вредными (статус “deleterious”). Интересно, что в экзоне VI INO *S. arcanum* была выявлена протяженная делеция 30 пн, приводящая к отсутствию 10 а.о. в С-концевой внедо-

Таблица 1. Характеристика экзон-интронной структуры гена *INO* у исследуемых видов *Solanum*

Вид/сорт (кат. № ВИР)	Номер доступа в NCBI	Экзон-интронная структура												Ген, пн	кДНК, пн	Белок, а.о.	
		ЭКЗОН I	ИНТРОН I	ЭКЗОН II	ИНТРОН II	ЭКЗОН III	ИНТРОН III	ЭКЗОН IV	ИНТРОН IV	ЭКЗОН V	ИНТРОН V	ЭКЗОН VI	ИНТРОН VI				
<i>S. arcanum</i> (13958)	MG873878	84	96	132	198	115	209	49	111	76	135	36	481	57	1779	549	182
<i>S. cheesmaniae</i> (3969)	MG873879	84	86	132	204	115	209	49	125	76	134	66	450	57	1787	579	192
<i>S. chilense</i> (4300)	MG873880	84	96	132	197	115	186	49	115	76	133	66	469	57	1775	579	192
<i>S. chmielewskii</i> (13725)	MG873881	84	86	132	204	115	210	49	124	76	134	66	450	57	1787	579	192
<i>S. corneliomulleri</i> (4367)	MG873882	84	97	132	198	115	185	49	113	76	135	66	490	57	1797	579	192
<i>S. galapagense</i> (3970)	MG873883	84	86	132	204	115	209	49	125	76	134	66	450	57	1787	579	192
<i>S. habrochaites</i> (13964)	MG873884	84	96	129	197	115	197	49	110	76	135	66	476	57	1787	576	191
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>Silvestre recordo</i> (1580)	MG873885	84	86	132	204	115	208	49	125	76	134	66	450	57	1786	579	192
<i>S. neorickii</i> (5033)	MG873886	84	96	132	200	115	200	49	128	76	139	66	449	57	1791	579	192
<i>S. peruvianum</i> (4361)	MG873887	84	96	132	197	115	208	49	112	76	135	66	469	57	1796	579	192
<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (3966)	MG873888	84	97	132	197	115	217	49	126	76	135	66	476	57	1827	579	192
<i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>racemigerum</i> (1018)	MG873889	84	86	132	204	115	209	49	125	76	135	66	450	57	1788	579	192
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>Heinz 1706*</i>	101244955	84	86	132	204	115	209	49	125	76	134	66	450	57	1787	579	192
<i>S. pennellii*</i>	107019174	84	97	132	192	121	197	49	124	76	135	66	477	57	1807	585	194
<i>S. tuberosum*</i>	102594693	84	110	132	198	136	282	49	119	76	278	66	652	57	2239	600	199

* Последовательности из базы данных NCBI.

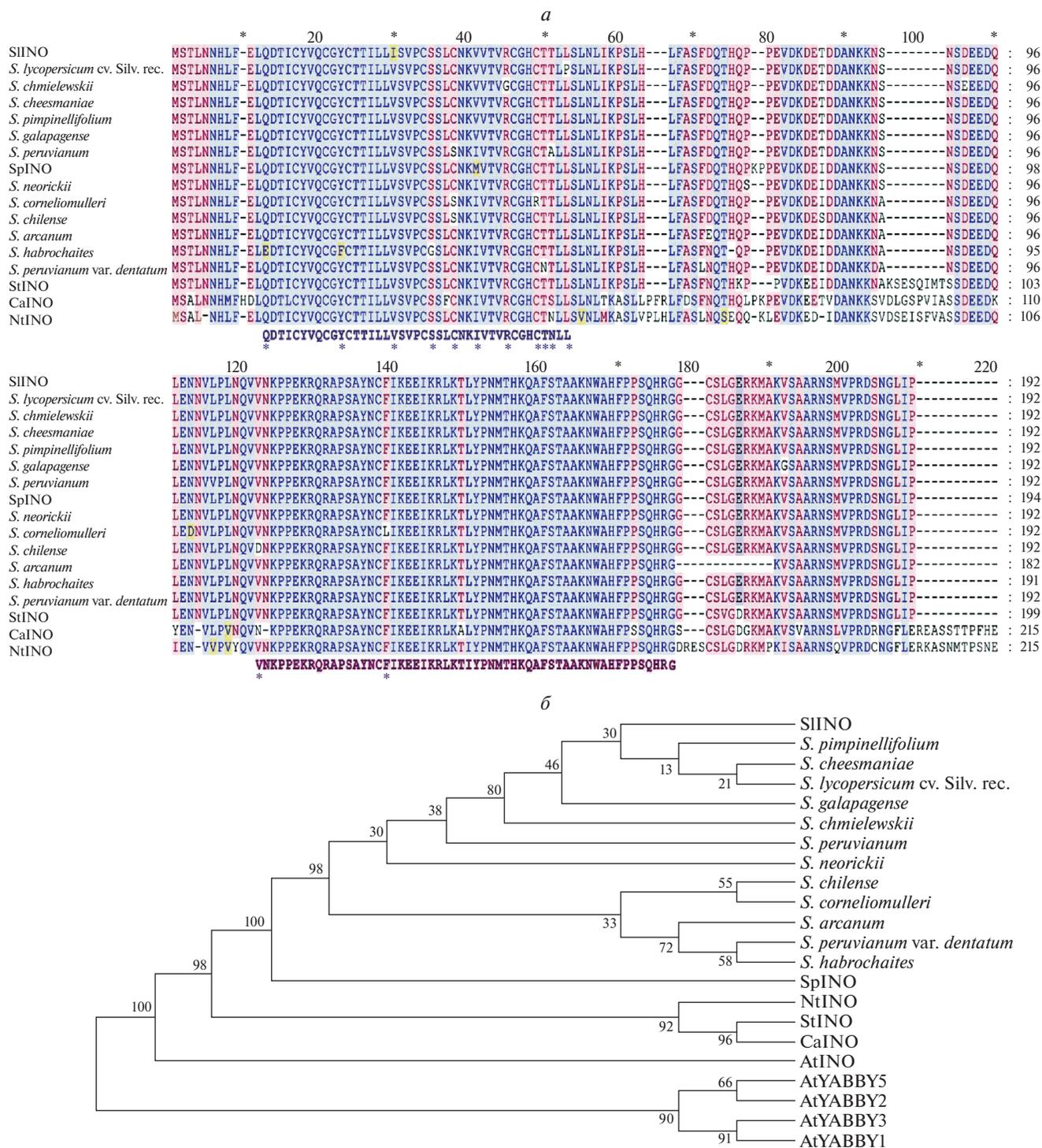


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей ортологов INO у исследуемых образцов томата с известными белками INO томата овощного *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (SIINO; AOS88523), *S. pennellii* (SpINO; XP_015075232), картофеля *S. tuberosum* (StINO; NW_006239143), перца *C. annuum* (CaINO; XP_016546914) и табака *N. tabacum* (NiINO; XP_016511953). Домен цинкового пальца (12–52 а.о.) и домен YABBY (108–163 а.о.) подписаны под выравниванием полужирным шрифтом. Замены в консервативных доменах указаны звездочками (*a*); *b* – дендрограмма, построенная на основе анализа аминокислотных последовательностей INO у исследуемых видов томата (ML, модель Jones–Taylor–Thornton + Gamma distributed with Invariant sites). В узлах указаны значения бутстреп-на 1000 бутстреп-реплик.

менной области, сразу после YABBY-домена (рис. 1,а).

Выявленная вариабельность, в особенности потенциально вредные радикальные замещения, могут оказывать влияние на фолдинг белков INO, изменяя силу и/или специфичность связывания с ДНК-мишенями и/или белковыми партнерами. Можно предположить, что межвидовой полиморфизм INO *Solanum*, не изменяя основной функции белка, может приводить к морфологическому разнообразию архитектуры интегумента и отражаться на эффективности оплодотворения семязачатка и формирования оболочки семени и, как следствие, на жизнеспособности семян.

Ранее было показано, что экспрессия кДНК генов семейства YABBY *A. thaliana*, *CRC* и YABBY3, под контролем промотора гена INO (PRO_{INO}, *A. thaliana*) была способна восстанавливать формирование внешнего интегумента в трансгенных растениях *A. thaliana* с мутацией *ino*. Однако только экспрессия кДНК INO под контролем PRO_{INO} была ограничена базальной областью развивающихся семязачатков за счет негативной регуляции транскрипционным фактором SUPERMAN, что приводило к восстановлению правильной асимметрии внешнего интегумента [5]. Исследование отдельных областей INO *A. thaliana* с использованием химерных белков под контролем промоторов PRO_{INO} и 35S CaMV показало, что важная роль в правильном развитии интегумента принадлежит внедоменным областям [5]. В случае исследуемых видов томата N- и C-концевые области белка INO меньше, чем у INO *A. thaliana* в 4 и 2 раза соответственно. Это согласуется с тем, что сверхэкспрессия гена *SIINO* (*S. lycopersicum*) в растениях *A. thaliana* с мутацией *ino* не восстанавливала исходный фенотип семязачатка [1], что может свидетельствовать о функциональных различиях внедоменных областей ортологов INO у разных видов/семейств растений. В этой связи факт обнаружения 10 а.о. делеции в C-концевой внедоменной области INO *S. arcanum* может представлять интерес для дальнейших исследований.

Для того чтобы оценить, насколько эволюция INO соотносится с предполагаемой эволюцией видов томата в целом [14, 22], была построена дендрограмма по аминокислотным последовательностям INO (рис. 1,б). На дендрограмме виды томата секции *Lycopersicon* образовывали единый кластер (ИБ=100) в кладе INO, базальные ветви к которому формировали белки INO других Solanaceae – перца *S. annuum*, картофеля *S. tuberosum* и табака *N. tabacum* (рис. 1,б). Однако внутри кластера хорошего разделения между видами не наблюдалось. Не было показано даже достоверного разделения видов на более древние зеленоплодные и считающиеся эволюционно более молодыми красноплодные виды, что было выяв-

лено при анализе других представителей семейства YABBY видов томата (YABBY1 и YABBY3) [19, 23]. Данный факт может указывать на более недавнее происхождение гена INO и/или более низкую скорость эволюции гена INO в сравнении с “вегетативными” генами YABBY.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 16-16-10022, с использованием экспериментальной установки искусственного климата ЭУИК и ЦКП “Биоинженерия”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skinner D.J., Brown R.H., Kuzoff R.K., Gasser C.S. Conservation of the role of *INNER NO OUTER* in development of unitegmic ovules of the Solanaceae despite a divergence in protein function // BMC Plant Biology. 2016. V. 16. Article 143. doi 10.1186/s12870-016-0835-z
2. Nakayama H., Yamaguchi T., Tsukaya H. Expression patterns of *AaDL*, a *CRABS CLAW* ortholog in *Asparagus asparagoides* (Asparagaceae), demonstrate a stepwise evolution of CRC/DL subfamily of YABBY genes // Am. J. Bot. 2010. V. 97. № 4. P. 591–600. doi 10.3732/ajb.0900378
3. Simon M.K., Skinner D.J., Gallagher T.L., Gasser C.S. Integument development in *Arabidopsis* depends on interaction of YABBY protein *INNER NO OUTER* with coactivators and corepressors // Genetics. 2017. V. 207. № 4. P. 1489–1500. doi 10.1534/genetics.117.300140
4. Bowman J.L., Smyth D.R. *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains // Development. 1999. V. 126. P. 2387–2396.
5. Meister R.J., Oldenhof H., Bowman J.L., Gasser C.S. Multiple protein regions contribute to differential activities of YABBY proteins in reproductive development // Plant Physiol. 2005. V. 137. № 2. P. 651–662. doi 10.1104/pp.104.055368
6. Finet C., Floyd S.K., Conway S.J. et al. Evolution of the YABBY gene family in seed plants // Evol. Dev. 2016. V. 18. № 2. P. 116–126. doi 10.1111/ede.12173
7. Yamada T., Yokota S., Hirayama Y. et al. Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of YABBY genes in angiosperms // The Plant J. 2011. V. 67. № 1. P. 26–36. doi 10.1111/j.1365-313X.2011.04570.x
8. Simon M.K., Williams L.A., Brady-Passnerini K. et al. Positive- and negative-acting regulatory elements contribute to the tissue-specific expression of *INNER NO OUTER*, a YABBY-type transcription factor gene in *Arabidopsis* // BMC Plant Biol. 2012. V. 12. Article 214. doi 10.1186/1471-2229-12-214
9. Lee J.Y., Baum S.F., Oh S.H. et al. Recruitment of *CRABS CLAW* to promote nectary development within the eudicot clade // Development. 2005. V. 132. P. 5021–5032.
10. Sun W., Huang W., Li Z. et al. Characterization of a *Crabs Claw* gene in basal eudicot species *Epimedium sagittatum* (Berberidaceae) // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. № 1. P. 1119–1131. doi 10.3390/ijms14011119

11. Toriba T., Harada K., Takamura A. et al. Molecular characterization the YABBY gene family in *Oryza sativa* and expression analysis of *OsYABBY1* // Mol. Genet. Genomics. 2007. V. 277. № 5. P. 457–468.
12. Shchennikova A.V., Slugina M.A., Beletsky A.V. et al. The YABBY genes of leaf and leaf-like organ polarity in leafless plant *Monotropa hypopitys* // Intern. J. Genomics. 2018. V. 2018. Article ID 7203469. doi 10.1155/2018/7203469
13. Gallagher T.L., Gasser C.S. Independence and interaction of regions of the INNER NO OUTER protein in growth control during ovule development // Plant Physiol. 2008. V. 147. № 1. P. 306–315. doi 10.1104/pp.107.114603
14. Peralta I.E., Spooner D.M., Knapp S. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicon*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae) // Systematic Botany Monographs American Society of Plant Taxonomists. USA, 2008. V. 84. 186 p.
15. Spooner D.M., Peralta I.E., Knapp S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.] // Taxon. 2005. V. 54. P. 43–61.
16. Han H.Q., Liu Y., Jiang M.M. et al. Identification and expression analysis of YABBY family genes associated with fruit shape in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // Genet. Mol. Res. 2015. V. 14. № 2. P. 7079–7091.
17. Ezura K., Ji-Seong K., Mori K. et al. Genome-wide identification of pistil-specific genes expressed during fruit set initiation in tomato (*Solanum lycopersicum*) // PLoS One. 2017. V. 12. № 7. Article e0180003. doi 10.1371/journal.pone.0180003
18. Huang Z., Van Houten J., Gonzalez G. et al. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *SUN*, *OFF* and *YABBY* gene family in tomato // Mol. Genet. Genomics. 2013. V. 288. № 3–4. P. 111–129. doi 10.1007/s00438-013-0733-0
19. Филюшин М.А., Слугина М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. YABBY3-ортологи дикорастущих видов томата: структура, полиморфизм и экспрессия // Acta Naturae. 2017. Т. 9. № 4 (35). С. 106–115.
20. Филюшин М.А., Слугина М.А., Пышная О.Н. и др. Структурный анализ генов-гомологов INNER NO OUTER (INO) у видов рода *Capsicum* // Генетика. 2018. Т. 54. № 6. С. 735–740.
21. Lora J., Hormaza J.I., Herrero M. Transition from two to one integument in *Prunus* species: expression pattern of INNER NO OUTER (INO), ABERRANT TESTA SHAPE (ATS) and ETTIN (ETT) // New Phytol. 2015. V. 208. № 2. P. 584–595. doi 10.1111/nph.13460
22. Aflitos S., Schijlen E., de Jong H. et al. Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing // Plant J. 2014. V. 80. № 1. P. 136–148.
23. Филюшин М.А., Слугина М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Идентификация и анализ экспрессии гена YABBY1 у дикорастущих видов томатов // Генетика. 2018. Т. 54. № 5. С. 535–546.

Characteristics of INNER NO OUTER Homologous Genes in Wild Tomato Species

M. A. Filyushin^{a, *}, M. A. Slugina^{a, b}, E. Z. Kochieva^{a, b}, and A. V. Shchennikova^a

^aFederal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bDepartment of Biotechnology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: michel7753@mail.ru

INNER NO OUTER belongs to the YABBY transcription factor family and determines the abaxial identity of the outer ovule integument. In this study, complete genomic INO sequences were identified and characterized in 12 accessions of 11 tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). It was shown that the identified INO genes encode proteins with the conserved zinc finger and YABBY domains. The INO sequences of all analyzed tomato species contain 243 (12.9% of the aligned length) variable sites, 43 of which are exon-specific and include 22 non-synonymous SNPs, leading to amino acid residue substitution in zinc finger domain (10), YABBY-domain (2), and inter-domain regions (10). A deletion of 10 aa at the C-terminal inter-domain sequence is characteristic for the *S. arcanum* INO.

Keywords: INNER NO OUTER (INO), *Solanum*, YABBY, wild tomato species.