

УДК 577.214.625:615.371:602.6:581:004.65

ПРОМОТОРЫ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В ЗАЩИТЕ ОТ ПАТОГЕНОВ

© 2014 г. О.Г. Смирнова, А.В. Кочетов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: planta@bionet.nsc.ru;

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 1 сентября 2014 г. Принята к публикации 17 октября г.

Генные сети, контролирующие устойчивость растений к различным фитопатогенам, весьма сложны, в них могут принимать участие сотни генов. Инфекция вызывает существенные изменения на молекулярно-генетическом, биохимическом, физиологическом и морфологическом уровнях как локально, в месте инвазии, так и системно. Реконструкция генных сетей, отвечающих за защиту растений от патогенных бактерий, грибов и вирусов, необходима для выявления задействованных молекулярных механизмов, а также для разработки новых способов повышения устойчивости хозяйственно ценных растений. Транскрипционная активность генов, участвующих в защите от фитопатогенов, обычно возрастает в ответ на инфекцию, поэтому характеристика их промоторов является важным источником информации для выявления транскрипционных факторов, контролирующих их работу, и для поиска новых генов, участвующих в ответе на инфекцию. Данные о промоторах необходимы для создания устойчивых к фитопатогенам растений методами генной инженерии. В статье представлены данные о промоторах патоген-чувствительных генов с экспериментально проверенным паттерном экспрессии, аннотированных в базе TGP (TransGene Promoters). База TGP может быть использована в качестве источника информации для интерпретации транскриптомных данных и при планировании генно-инженерных экспериментов, направленных на повышение устойчивости растений к патогенам различного происхождения.

Ключевые слова: промотор, патоген, трансгенные растения, базы данных.

ВВЕДЕНИЕ

Инвазия патогена вызывает сложный многоуровневый комплекс защитных реакций, направленных на индукцию синтеза защитных белков, изоляцию патогена в месте проникновения с помощью программируемой клеточной смерти пораженных клеток, синтез вторичных метаболитов с защитными свойствами, индукцию РНК-интерференции (в случае вирусной инфекции) и т. д. В контроле защитных реакций важное значение имеет регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции, что привлекает большое внимание к исследованию особенностей организации их промоторов, поскольку

структура промотора определяет, в каких клетках, на какой стадии развития и при каких воздействиях будет синтезироваться соответствующая мРНК.

Многие растения наряду с реакцией на химические вещества, продуцируемые патогенами, отвечают и на сопутствующее повреждение тканей, связанное с проникновением патогенов через раневые поверхности. В ответ на инфекцию изменяются уровни некоторых гормонов, регулирующих синтез защитных белков, поэтому направленное изменение в содержании таких гормонов рассматривается как один из вариантов стратегии повышения устойчивости. Например, салициловая кислота играет важ-

ную роль в ингибировании распространения PVY (Potato virus Y) в тканях паренхимы у картофеля. Отсутствие этого гормона ведет к задержке активации генов, участвующих в защитном ответе (Baebler *et al.*, 2014). Действие салициловой кислоты приводит к повышению активности семейств PR (pathogenesis-related) генов, за исключением PR10 у лекарственного растения *Withania somnifera* L., и повышенному накоплению у него вторичных метаболитов витанолидов, обладающих противоопухолевым и бактериостатическим действием (Ghosh Dasgupta *et al.*, 2014). Фитопатогены вызывают нарушение уровня гормонального баланса у растений, перестраивая работу транскриптома хозяина в выгодном для себя направлении. Поскольку в настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании сигнальных путей гормональной регуляции у растений, появилась возможность использовать патоген-чувствительные промоторы для индукции гормон-зависимого иммунного ответа. Использование в генетической инженерии таких промоторов может быть одним из способов для снижения вирулентности некоторых фитопатогенов (Grant *et al.*, 2013).

Был проведен систематический поиск промоторов *Arabidopsis thaliana* L., транскрипционная активность которых изменялась при инвазии патогена, поскольку соответствующие гены и кодируемые ими белки могут быть задействованы в механизмах устойчивости. Для идентификации патоген-зависимых промоторов и изучения сайтов связывания соответствующих транскрипционных факторов была использована культура протопластов петрушки (Koschmann *et al.*, 2012). Функциональность многих идентифицированных *cis*-элементов, чувствительных к элиситору, была в дальнейшем подтверждена в экспериментах с растениями другого вида – *Nicotiana benthamiana*. На примере этой работы можно видеть успешность интеграции биоинформационных ресурсов для предсказания сайтов связывания регуляторных факторов и экспериментального анализа активности промоторов для изучения взаимодействия растений и патогенов. Серия промоторов, чувствительных к различным элиситорам в протопластах петрушки, представлена в базе TGP (Smirnova *et al.*, 2012). Создан новый веб-инструмент PathoPlant

для оценки иерархии чувствительности генов *A. thaliana* к биотическим и абиотическим стрессам на основе присутствия специфических *cis*-регуляторных последовательностей в промоторах их генов (Bolívar *et al.*, 2014).

β -1,3-глюконазы входят в семейство белков PR2 и играют важную роль в защите растений от патогенов. Промоторы генов этих белков часто проявляют чувствительность к патогенам. Использование глюконаз в качестве трансгенов как самостоятельно, так и в комбинации с хитиназами, пероксидазами, рибонуклеазами и другими защитными белками является перспективной стратегией для создания устойчивых растений с помощью методов генной инженерии и молекулярной генетики (Trifonova *et al.*, 2007; Balasubramanian *et al.*, 2012; Filipenko *et al.*, 2013). В целом инженерия защиты растений требует применения промоторов с хорошо охарактеризованным паттерном транскрипционной активности, индуцируемых при инвазии патогена и/или поранении тканей, для целевой экспрессии генов, белковые продукты которых усиливают защитные механизмы. В данной статье представлен обзор промоторов растений, аннотированных в базе TGP, которые могут быть использованы в генетической инженерии для получения устойчивых форм и сортов хозяйственно ценных видов растений. Приведены примеры целевого использования промоторов для повышения сопротивляемости таких трансгенных растений к патогенам.

ИНФОРМАЦИЯ О ПРОМОТОРАХ, ПРЕДСТАВЛЕННАЯ В БАЗЕ TGP

База TGP накапливает информацию о конститутивных, тканеспецифичных и индуцибельных промоторах, активность которых была охарактеризована в трансгенных растениях (Smirnova *et al.*, 2012). В базе содержится информация о размере промотора, его нуклеотидной последовательности, паттерне транскрипции и регуляторах, влияющих на активность промотора. В базе TGP представлены промоторы и делеционные варианты промоторов более чем 30 генов растений, чувствительных к действию патогенов. Интерфейс базы TGP позволяет находить промоторы с определенными характеристиками. Представление чувствительных к патогенам

промоторов в базе TGP дает возможность выбрать стадие-, ткане-, видоспецифичный, чувствительный к определенным регуляторам промотор, активность которого была изучена в определенном трансгенном организме. Исследователь может быстро получить нуклеотидную последовательность выбранного промотора, а также характеристику экспрессии исходного гена, которому принадлежит выбранный промотор. Эти данные могут быть использованы при проведении фундаментальных и биотехнологических исследований.

ПРОМОТОРЫ РАСТЕНИЙ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К ИНВАЗИИ ПАТОГЕНА

Triticeae. Белки, переносящие липиды между мембранами, участвуют в защите от бактериальных и грибных инфекций. В качестве примера промотора, активность которого индуцируется при инвазии бактериального патогена *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, может служить промотор *HvLTP4.3* (*Hordeum vulgare* lipid transfer protein 4.3), высокоактивный в листьях и колеоптиле ячменя. Вместе с тем заражение листьев ячменя патогенной бактерией *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* вызывает понижение активности промотора (Molina *et al.*, 1996).

Белки пуриноидины определяют текстуру зерна пшеницы. У трансгенных пшениц *T. aestivum* и *T. durum* промотор *TaPinA* (*T. aestivum* puroidoline-a) активен только в эндосперме (Wiley *et al.*, 2007). В трансгенном рисе *TaPinA* промотор проявляет более широкий спектр активности и индуцируется после поранения и заражения листьев риса грибом *Magnaporthe grisea* (Evrard *et al.*, 2007) (табл.).

Solanaceae. У здоровых растений картофеля активность промотора *StGstI* (*Solanum tuberosum* Glutathione-S-transferase) наблюдалась только в корнях и стареющих листьях. Промотор *StGstI* локально активировался после инокуляции листьев картофеля патогеном *Phytophthora infestans* (Hahn, Strittmatter, 1994), вирусами PVY и PLRV (potato leaf roll virus), после заражения корней белой картофельной нематодой *Globodera pallida* (Strittmatter *et al.*, 1996). Активность промотора *StGstI* практически не менялась после заражения корней картофеля южной галловой нематодой

Meloidogyne incognita, что могло быть связано с отсутствием защитных реакций у растения-хозяина в связи с недеструктивной миграцией паразита. В отличие от патогенных организмов при микоризации корней симбиотическим грибом *Glomus mosseae* активность промотора *StGstI* наблюдалась только в колонизированных клетках (Strittmatter *et al.*, 1996). У яблони промотор *StGstI* активируется патогенной бактерией *Erwinia amylovora* и грибом *Venturia inaequalis* (Malnoy *et al.*, 2006). У апельсина после инокуляции патогеном *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* экспрессия гена *hrpN* из *Erwinia amylovora* под контролем *StGstI* промотора снижала вызванный патогеном некроз листьев (Barbosa-Mendes *et al.*, 2009).

В проростках картофеля и листьях табака активность промотора *StGluB* (*S. tuberosum* acidic β -glucanase) возрастала локально вокруг некротических пятен через 5–7 дней после инокуляции вирусом табачной мозаики (ВТМ) или *P. infestans* (Mac *et al.*, 2004). Уровень активности промотора *NpGNI* (*Nicotiana plumbaginifolia* β -glucanase) существенно возрастал после инокуляции листьев табака бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*. В здоровых растениях максимальная активность промотора наблюдается в корнях и старых листьях (Castresana *et al.*, 1990).

Промоторы *ScOSML13*, *ScOSML81* (*Solanum commersonii* osmotin-like proteins) способны повышать активность локально в месте инокуляции грибом *P. infestans* листьев трансгенного дикого картофеля *S. commersonii* (Zhu *et al.*, 1995).

Промоторы перца *CabPR1* (*Capsicum annuum* basic PR-1 protein), *CaChi2* (*C. annuum* class II basic chitinase), *CaLTPIII* (*C. annuum* lipid transfer protein III), *CaPIP2* (*C. annuum* pathogen-induced protein 2) положительно реагировали на инокуляцию листьев табака бактерией *P. syringae* pv. *tabaci* (Hong *et al.*, 2005, 2006; Jung *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Индукция промотора *CaSAR8.2A* (*C. annuum* SAR8.2A protein) в инокулированных патогеном листьях была в два раза выше, чем в неинокулированных системных листьях (Lee, Hwang, 2006).

При инокуляции табака конидиями гриба *Fusarium solani* f. sp. *pisi* происходит локальная индукция активности промоторов *LeTap1*

Таблица

Промоторы, индуцируемые патогенами в трансгенных растениях

Промотор и его источник	Трансгенное растение	Патоген, токсин	Дополнительный регулятор ^б	Литература
<i>AtPAL1</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i> phenylalanine ammonia-lyase 1)	табак, арабидопсис	<i>Peronospora parasitica</i> , <i>Pseudomonas solanacearum</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>Phaseoli</i>	поранение, H ₂ O ₂ , митомицин С	Mauch-Mani, Slusarenko, 1996; Huang, McBeath, 1994; Choi <i>et al.</i> , 2001; Rookes, Cahill, 2003
<i>AtPDF1.2</i> (<i>A. thaliana</i> putative defensin)	табак, арабидопсис	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , ВТМ, <i>Phytophthora parasitica</i> , <i>Cercospora nicotianae</i>	поранение, ЖК, этилен, окислительный стресс	Manners <i>et al.</i> , 1998; Mitter <i>et al.</i> , 1998
<i>AtP85</i> (<i>A. thaliana</i> senescence-associated protein)	табак, арабидопсис	<i>Peronospora tabacina</i>	NaCl, холод	Banerjee <i>et al.</i> , 2013
<i>AtSAG12</i> (<i>A. thaliana</i> senescence-associated gene 12)	томат	<i>B. cinerea</i>	старение	Swartzberg <i>et al.</i> , 2008
<i>HvLTP4.3</i> (<i>Hordeum vulgare</i> lipid transfer protein 4.3)	ячмень	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>translucens</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Japonica</i>	АБК, холод	Molina <i>et al.</i> , 1996
<i>CabPR1</i> (<i>Capsicum annuum</i> basic PR-1 protein)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	NaCl, холод, СК, ЖК, этилен, NO, маннитол	Hong <i>et al.</i> , 2005
<i>CaChi2</i> (<i>C. annuum</i> class II basic chitinase)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> ,	СК, NaCl, маннитол	Hong <i>et al.</i> , 2006
<i>CaLTPIII</i> (<i>C. annuum</i> lipid transfer protein III)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	СК, ЖК, АБК, этилен, H ₂ O ₂ , засуха, NaCl	Jung <i>et al.</i> , 2006
<i>CaPIP2</i> (<i>C. annuum</i> pathogen-induced protein 2)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	NaCl, холод, СК, АБК, ЖК	Lee <i>et al.</i> , 2007
<i>CaSAR8.2A</i> (<i>C. annuum</i> SAR8.2A protein)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	NaCl, холод, СК, АБК, ЖК, этилен	Lee, Hwang, 2006
<i>GmCAM4</i> (<i>Glycine max</i> calmodulin isoform-4)	табак, арабидопсис	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	NaCl	Park <i>et al.</i> , 2004, 2009
<i>LeTap1</i> , <i>LeTap2</i> (<i>Lycopersicon esculentum</i> anionic peroxidase)	табак	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>pisi</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i>	поранение	Mohan <i>et al.</i> , 1993a, b
<i>NpGNI</i> (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> β-glucanase)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	СК	Castresana <i>et al.</i> , 1990
<i>NtPRIA</i> (<i>Nicotiana tabacum</i> pathogenesis-related protein 1a)	табак, томат	BTM	СК	Uknes <i>et al.</i> , 1993; Ma <i>et al.</i> , 2009
<i>NtPR2D</i> , <i>NtPR2B</i> (<i>N. tabacum</i> acidic β-glucanase)	табак	BTM	СК	Hennig <i>et al.</i> , 1993; van de Rhee <i>et al.</i> , 1993

Окончание таблицы

Промотор и его источник	Трансгенное растение	Патоген, токсин	Дополнительный регулятор ^б	Литература
<i>PcCMPG1b</i> (<i>Petroselinum crispum</i> immediate-early fungal elicitor protein)	арабидопсис, петрушка	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , флагеллин, <i>Peronospora parasitica</i> pv. <i>Cala2</i> , Pep25 элиситор из <i>Phytophthora sojae</i>		Kirsch <i>et al.</i> , 2001
<i>PsDRR206</i> (<i>Pisum sativum</i> disease resistance response protein 206)	табак, картофель, горох	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	поранение, H ₂ O ₂ , митомицин С, актиномицин, этопозид	Choi <i>et al.</i> , 2001, 2004
<i>ScOSML13</i> , <i>ScOSML81</i> (<i>Solanum commersonii</i> osmotin-like proteins)	дикий картофель	<i>Phytophthora infestans</i>	поранение, АБК, СА, NaCl	Zhu <i>et al.</i> , 1995
<i>StGluB</i> (<i>S. tuberosum</i> acidic β-glucanase)	картофель, табак	<i>P. infestans</i> , ВТМ ^а		Mac <i>et al.</i> , 2004
<i>StGst1</i> (<i>S. tuberosum</i> Glutathione S transferase)	картофель, яблоня, апельсин	<i>P. infestans</i> , <i>Globodera pallida</i> , <i>Venturia inaequalis</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	поранение, СК	Hahn, Strittmatter, 1994; Strittmatter <i>et al.</i> , 1996; Malnoy <i>et al.</i> , 2006; Barbosa-Mendes <i>et al.</i> , 2009
<i>TaPinA</i> (<i>Triticum aestivum</i> puroindoline-a)	рис	<i>Magnaporthe grisea</i>	поранение	Evrard <i>et al.</i> , 2007

^а ВТМ – вирус табачной мозаики; ^б АБК – абсцизовая, ЖК – жасмоновая, СА – салициловая кислоты.

и *LeTap2* (*Lycopersicon esculentum* anionic peroxidase) (Mohan *et al.*, 1993a). Активность промотора *LeTap1* повышается в два раза после обработки протопластов табака элиситором из *Verticillium albo-atrum* (Mohan *et al.*, 1993b).

Активность промоторов табака *NtPR2D* и *NtPR2B* (*Nicotiana tabacum* acidic β-1,3-glucanase) существенно возрастает после инокуляции листьев табака ВТМ как локально, вокруг некротических пятен, так и системно, в неинкулированных листьях. Следует отметить, что у здоровых растений табака активность промотора *NtPR2B* отсутствует, а активность промотора *NtPR2D* наблюдается только на стадии проростков и в развивающихся органах цветка, но не в корнях, стеблях и листьях взрослых растений (Hennig *et al.*, 1993; Rhee *et al.*, 1993). Ген *NtPR-1a* (*N. tabacum* pathogenesis-related 1a) экспрессируется преимущественно в мезофилле и эпидермисе листовых пластин и в чашелистиках цветка. ВТМ активизирует *NtPR1a* промотор в табаке (Uknes *et al.*, 1993).

Fabaceae. Промотор *PsDRR206* (*Pisum sativum* disease resistance response protein 206) в трансгенном табаке активировался *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (FspH), хитозаном и FspH DNase (DNase elicitor from *F. solani*) (Choi *et al.*, 2001). Ген *FspH DNase*, сшитый с промотором *PsDRR206*, обеспечивал устойчивость против *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* и *Alternaria alternata* у трансгенного табака. В трансгенном картофеле, несущем ту же генетическую конструкцию, наблюдалась меньшая степень защиты от *P. infestans*. Активность промотора была существенно выше в трансгенном табаке, чем в картофеле или горохе (Choi *et al.*, 2001, 2004).

Промотор *GmCAM4* (*Glycine max* calmodulin isoform-4) экспрессируется в первую очередь в апикальной меристеме и гипокотиле проростков арабидопсиса. Активность промотора в листьях взрослых растений арабидопсиса и табака существенно возрастает после действия бактерий *P. syringae* pv. *tomato* и *P. syringae* pv. *tabaci* (Park

et al., 2004, 2009). Транскрипционный фактор GmZF-HD1 участвует в индукции *GmCaM4* промотора патогенами (Park *et al.*, 2007).

***Petroselinum crispum*.** Информация о промоторах петрушки, индуцируемых элиситорами в протопластах, представлена в базе TGP (Smirnova *et al.*, 2012). Промотор *PcCMPG1b* (*Petroselinum crispum* immediate-early fungal elicitor protein) индуцируется в протопластах петрушки элиситором Pep25 из поверхностного гликопротеина фитопатогенного гриба *Phytophthora sojae*, бактериальным белком флагеллином и *P. syringae* pv. *tomato* в листьях арабидопсиса, грибом *Rhizoctonia solani* штамма AG2 в корнях арабидопсиса. В листьях арабидопсиса инокуляция оомицетом *Peronospora parasitica* pv. *Cala2* приводит к более высокой активности промотора вокруг сайтов инфицирования по сравнению с семядолями (Kirsch *et al.*, 2001).

***Arabidopsis thaliana*.** Промотор *AtPAL1* (*A. thaliana* phenylalanine ammonia-lyase 1) активен на стадии проростков, в сосудистых тканях корней и листьев, в чашелистиках, пыльниках и пестике, но не в лепестках. Промотор активируется в процессе несовместимого взаимодействия арабидопсиса с *Peronospora parasitica* и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Mauch-Mani, Slusarenko, 1996; Rookes, Cahill, 2003). *P. syringae* pv. *tabaci*, *F. solani* f. sp. *Phaseoli*, FspHD-Nase, *Pseudomonas solanacearum* штамм K60 (совместимый) и B1 (несовместимый штамм) активируют промотор *AtPAL1* в табаке (Huang, McBeath, 1994; Choi *et al.*, 2001).

Инокуляция табака BTM, *P. parasitica*, *Cercospora nicotianae* и арабидопсиса патогенами *Alternaria brassicicola* или *Botrytis cinerea* существенно повышает активность промотора *AtPDF1.2* (*A. thaliana* defensin) (Manners *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1998).

Гены арабидопсиса *At4g35985* (senescence associated gene) и *At4g35987* (methyl transferase) расположены рядом в разных цепях геномной ДНК и управляются двунаправленным промотором *AtP85-P87*. Биотический стресс, вызванный *Peronospora tabacina*, сопровождается повышением активности *AtP85* промотора в листьях табака *Nicotiana benthamiana* в 3 раза. Активность *AtP87* промотора в данном эксперименте не изучалась (Banerjee *et al.*, 2013).

Большая часть представленных выше промоторов выделена из генов, активность которых непосредственно связана с ответом на патогены. В некоторых случаях связь между действием патогена и индукцией промотора обусловлена более тонкими механизмами. Промоторы генов *AtSAG12* и *AtSAG13* (*A. thaliana* senescence-associated gene) индуцируются в процессе старения листьев трансгенных растений. Экспрессия гена *IPT* (*Agrobacterium tumefaciens* isopentenyltransferase) под контролем этих промоторов приводит к более позднему старению за счет авторегуляции продукции цитокинина. Инфекция *B. cinerea* индуцирует экспрессию *AtSAG12-GUS* и *AtSAG13-GUS* в листьях томата, подтверждая, что старение листа является частью действия этого патогена. Экспрессия гена *IPT* под контролем промоторов *AtSAG12* или *AtSAG13* в ответ на инокуляцию *B. cinerea* приводит к супрессии симптомов заболевания, индуцированных патогеном. Таким образом, отсрочка старения листьев, вызванная действием гена *IPT*, может снижать чувствительность к *B. cinerea* (Swartzberg *et al.*, 2008).

ВЛИЯНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОМОТОРЫ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К ПАТОГЕНАМ

Большая часть чувствительных к инфекции промоторов реагирует на другие факторы: поранение, холод, засуху, гормональные сигналы, окислительный и осмотический стресс. Поранение происходит на одном из начальных этапов взаимодействия патогена и организма-хозяина, поэтому неудивительно, что большая часть представленных промоторов чувствительна к механическим повреждениям (см. табл.). Некоторые промоторы, такие как *NpGNI*, *PcCMPG1b*, *CabPR1*, *CaSAR8.2A*, не реагируют на поранение (Castresana *et al.*, 1990; Kirsch *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2005; Lee, Hwang, 2006). Реакция промотора *AtPDF1.2* на поранение, а также на этилен зависела от вида растения, в котором экспрессировался ген-репортер: в клетках табака активность промотора повышалась, а у арабидопсиса оставалась без изменений (Manners *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1998). Активность промотора *StGst1* в клетках картофеля не зависит от абиотических фак-

торов, таких как поранение, действие повышенной температуры и освещение. В геноме яблони промотор *StGst1* также не чувствителен к поранению, но активируется салициловой кислотой, а в геноме апельсина индуцируется после поранения. Данные примеры показывают зависимость индукции промотора от вида организма-хозяина (Strittmatter *et al.*, 1996; Malnoy *et al.*, 2006; Barbosa-Mendes *et al.*, 2009).

Чувствительные к патогенам промоторы активно реагируют на факторы внешней среды. Повышение концентрации соли приводит к повышению активности промоторов *ScOSML13*, *ScOSML81* в диком картофеле *S. commersonii*; *CaChi2*, *CaSAR8.2A*, *CabPR1* и *CaPIP2* в листьях табака; *GmCAM4* в листьях арабидопсиса и табака (Zhu *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005, 2006; Lee, Hwang, 2006; Lee *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009). Активность промотора *CaLTPIII* репрессировалась после действия соли и засухи (Jung *et al.*, 2006).

После холодового воздействия повышалась активность промоторов *HvLTP4.3*, *CabPR1*, *CaSAR8.2A*, *CaPIP2* (Molina *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2005; Lee, Hwang, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Промотор *AtPAL1* активируется после обработки арабидопсиса хлоридом ртути и обработки табака перекисью водорода (Mauch-Mani, Slusarenko, 1996; Rookes, Cahill, 2003; Choi *et al.*, 2001). Промоторы *PsDRR206* и *CaLTPIII* также активируются перекисью водорода (Choi *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2006).

В зависимости от направления промотор *AtP85-P87* показывает различия в индуцированной экспрессии в трансгенных растениях арабидопсиса и табака (*Nicotiana benthamiana*). Промотор *AtP85* имеет более быструю реакцию на солевой стресс по сравнению с промотором *AtP87*. Промотор *AtP85* чувствителен к холоду, а промотор *AtP87* – к манниту, вызывающему осмотический стресс (Banerjee *et al.*, 2013).

Чувствительные к патогенам промоторы по-разному реагируют на растительные гормоны. Жасмоновая кислота, играющая важную роль в защитном ответе, положительно влияет на активность промоторов *AtPDF1.2*, *CaSAR8.2A*, *CabPR1*, *CaPIP2*, *CaLTPIII* (Manners *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006; Lee, Hwang, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Абсцизовая кислота регулирует ответ растений на абиотический стресс. Под действием абсцизовой кислоты активность промоторов *ScOSML13*, *ScOSML81* в листьях *S. commersonii*, промотора *HvLTP4.3* в ячмене, промоторов *CaPIP2*, *CaLTPIII* и *CaSAR8.2A* в листьях табака повышается (Zhu *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2006; Lee, Hwang, 2006).

Этилен повышает активность промоторов *CabPR1*, *CaLTPIII* и *CaSAR8.2A* (Hong *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006; Lee, Hwang, 2006). Промотор *NpGNI* не реагирует на этилен (Castresana *et al.*, 1990).

Активность промоторов *NpGNI*, *NtPR2D*, *NtPR1a*, *NtPR2B*, *ScOSML13*, *ScOSML81*, *CaChi2*, *CaSAR8.2A*, *CabPR1*, *CaLTPIII*, *CaPIP2* возрастает после действия салициловой кислоты (Castresana *et al.*, 1990; Hennig *et al.*, 1993; Uknes *et al.*, 1993; Rhee *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2005, 2006; Jung *et al.*, 2006; Lee, Hwang, 2006; Lee *et al.*, 2007). В то же время промотор *AtPDF1.2* не реагирует на этот гормон в арабидопсисе и табаке (Manners *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1998). Чувствительность промотора *NtPR1a* к салициловой кислоте была использована для продукции фитоалексина ресвератрола в трансгенных растениях томатов (Ma *et al.*, 2009).

Разная чувствительность промоторов к растительным гормонам может быть объяснена участием генов, соответствующих этим промоторам, в разных путях защитного ответа со своей спецификой гормональной регуляции.

Таким образом, в экспериментах с трансгенными растениями необходимо учитывать разную реакцию чувствительных к патогенам промоторов на факторы внешней среды и гормональные сигналы, а также возможность разнонаправленной реакции одного и того же промотора в разных видах растений.

ПРОМОТОРЫ ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИТОПАТОГЕНАМ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

В базе TGP представлены тканеспецифические промоторы, которые могут быть использованы для целевой экспрессии генов

устойчивости (Smirnova *et al.*, 2012; Smirnova, Kochetov, 2012). Тканеспецифический промотор *HvLem2* (*Hordeum vulgare* lectin-like protein) может быть использован для экспрессии противогрибковых генов в цветковых чешуях и эпикарпе, через которые происходит наиболее вероятное заражение ячменя грибом *Fusarium graminearum* (Abebe *et al.*, 2006). Промоторы генов *TdPRPI* (*Triticum durum* defensin) могут быть использованы для специфической экспрессии и накопления белков, придающих устойчивость к патогенам, в уязвимых тканях развивающихся и прорастающих зерновок (Kovalchuk *et al.*, 2010). Тканеспецифический промотор гена *TdGL9H1* (*Triticum durum* HD-Zip IV transcription factor GL9H1) может быть использован для защиты эмбриональной оси от патогенов во время запасания и высыхания зерновки (Kovalchuk *et al.*, 2012). Уровень транскрипции гена пшеницы *TaGstA1* (*Triticum aestivum* glutathione S-transferase 1) повышается в 20 раз после инфицирования листьев *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. Промотор *TaGstA1* не проявлял активности в листьях трансгенной пшеницы (Altpeter *et al.*, 2005), но обеспечивал высокую активность в эпидермисе листьев ячменя (Himmelbach *et al.*, 2007). В целях повышения устойчивости пшеницы к мучнистой росе, вызываемой грибом *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, был создан специфичный для эпидермиса промотор, состоящий из промотора *TaGstA1* и интрона гена *WIR1a* пшеницы (*TaGstA1i*). Инокуляция листьев пшеницы, бомбардированных *TaGstA1i-GUS*, не приводила к повышению GUS активности, несмотря на то что был использован промотор гена, индуцируемого патогеном (Altpeter *et al.*, 2005). Промотор *TaGstA1i* был использован для экспрессии генов защитного ответа *TaPrx103* (wheat peroxidase TaPERO) и *TaOXOX* (wheat oxalate oxidase). Экспрессия гена пероксидазы под контролем *TaGstA1i* промотора в эпидермисе пшеницы повышала устойчивость к *B. graminis* f. sp. *tritici*, в то время как экспрессия оксалат оксидазы не оказывала влияния на устойчивость (Altpeter *et al.*, 2005; Schweizer, 2008). Тканеспецифическая экспрессия во фруктах гена *LeTap1* под контролем промотора *LeE8* приводит к повышению общей пероксидазной активности, высокому накоплению

фенольных соединений в плодах трансгенных томатов, снижению реакции плодов на повреждение и грибную инфекцию (Kesanakurti *et al.*, 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение структурно-функциональной организации промоторов генов, экспрессия которых изменяется в присутствии фитопатогенов, важно для решения нескольких задач генетики и биотехнологии растений. Во-первых, такие гены могут быть участниками генных сетей, контролирующей защитные механизмы, предотвращающие развитие патогенов или снижающие негативные последствия от инфекции. Во-вторых, современные методы генной инженерии растений являются одним из наиболее перспективных способов получения устойчивых к фитопатогенам форм хозяйственно ценных видов растений. Промоторы являются важным элементом структуры генетических конструкций, поэтому их изучение необходимо для эффективного планирования генно-инженерных экспериментов. Кроме этого, систематический анализ молекулярных механизмов транскрипционного контроля экспрессии генов необходим для понимания способов управления координированной экспрессией генов растений в составе ансамблей или больших генных сетей.

Работа поддержана грантами Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.604.21.0107 от 07.07.2014) и РФФИ № 14-04-01036.

ЛИТЕРАТУРА

- Abebe T., Skadsen R., Patel M., Kaeppler H. The *Lem2* gene promoter of barley directs cell- and development-specific expression of *gfp* in transgenic plants // Plant Biotechnol. J. 2006. V. 4. P. 35–44.
- Altpeter F., Varshney A., Abderhalden O. *et al.* Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance // Plant Mol. Biol. 2005. V. 57. P. 271–283.
- Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N. Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. P. 1983–1990.
- Barbosa-Mendes J.M., de Assis Alves Mourão Filho F.,

- Filho A.B. *et al.* Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker // *Sci. Hortic.* 2009. V. 122. P. 109–115.
- Baebler Š., Witek K., Petek M. *et al.* Salicylic acid is an indispensable component of the *Ny-1* resistance-gene-mediated response against *Potato virus Y* infection in potato // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 1095–1109.
- Banerjee J., Sahoo D.K., Dey N. *et al.* An intergenic region shared by *At4g35985* and *At4g35987* in *Arabidopsis thaliana* is a tissue specific and stress inducible bidirectional promoter analyzed in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants // *PLoS One*. 2013. V. 8. e79622.
- Bolívar J.C., Machens F., Brill Y. *et al.* 'In silico expression analysis', a novel PathoPlant web tool to identify abiotic and biotic stress conditions associated with specific *cis*-regulatory sequences // *Database (Oxford)*. 2014. 2014(0): bau030.
- Castresana C., de Carvalho F., Gheysen G. *et al.* Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* beta-1,3-glucanase gene // *Plant Cell*. 1990. V. 2. P. 1131–1143.
- Choi J.J., Klosterman S.J., Hadwiger L.A. A comparison of the effects of DNA-damaging agents and biotic elicitors on the induction of plant defense genes, nuclear distortion, and cell death // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 752–762.
- Choi J.J., Klosterman S.J., Hadwiger L.A. A promoter from pea gene *DRR206* is suitable to regulate an elicitor-coding gene and develop disease resistance // *Phytopathology*. 2004. V. 94. P. 651–660.
- Evrard A., Meynard D., Guiderdoni E. *et al.* The promoter of the wheat puroindoline-a gene (*PinA*) exhibits a more complex pattern of activity than that of the *PinB* gene and is induced by wounding and pathogen attack in rice // *Planta*. 2007. V. 225. P. 287–300.
- Filipenko E.A., Kochetov A.V., Kanayama Y. *et al.* PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2013. V. 3. P. 474–480.
- Ghosh Dasgupta M., George B.S., Bhatia A., Sidhu O.P. Characterization of *Withania somnifera* leaf transcriptome and expression analysis of pathogenesis-related genes during salicylic acid signaling // *PLoS One*. 2014. V. 9. e94803.
- Grant M.R., Kazan K., Manners J.M. Exploiting pathogens' tricks of the trade for engineering of plant disease resistance: challenges and opportunities // *Microb. Biotechnol.* 2013. V. 6. P. 212–222.
- Hahn K., Strittmatter G. Pathogen-defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 226. P. 619–626.
- Hennig J., Dewey R.E., Cutt J.R., Klessig D.F. Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of a beta-1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants // *Plant J.* 1993. V. 4. P. 481–493.
- Himmelbach A., Zierold U., Hensel G. *et al.* A set of modular binary vectors for transformation of cereals // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. P. 1192–1200.
- Hong J.K., Hwang B.K. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, *CAChi2*, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the *CAChi2*-overexpressing *Arabidopsis* // *Planta*. 2006. V. 223. P. 433–448.
- Hong J.K., Lee S.C., Hwang B.K. Activation of pepper basic *PR-1* gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses // *Gene*. 2005. V. 356. P. 169–180.
- Huang Y., McBeath J.H. Bacterial induced activation of an *Arabidopsis* phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic tobacco plants // *Plant Sci.* 1994. V. 98. P. 25–35.
- Jung H.W., Lim C.W., Hwang B.K. Isolation and functional analysis of a pepper lipid transfer protein III (*CALTPIII*) gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses // *Plant Sci.* 2006. V. 170. P. 258–266.
- Kesanakurti D., Kolattukudy P.E., Kirti P.B. Fruit-specific overexpression of wound-induced *tap1* under E8 promoter in tomato confers resistance to fungal pathogens at ripening stage // *Physiol. Plant*. 2012. V. 146. P. 136–148.
- Kirsch C., Logemann E., Lippok B., Schmelzer E., Hahlbrock K. A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated *CMPG1* gene in *Petroselinum crispum* // *Plant J.* 2001. V. 26. P. 217–227.
- Koschmann J., Machens F., Becker M. *et al.* Integration of bioinformatics and synthetic promoters leads to the discovery of novel elicitor-responsive *cis*-regulatory sequences in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2012. V. 160. P. 178–191.
- Kovalchuk N., Li M., Wittek F. *et al.* Defensin promoters as potential tools for engineering disease resistance in cereal grains // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 47–64.
- Kovalchuk N., Wu W., Eini O. *et al.* The scutellar vascular bundle-specific promoter of the wheat HD-Zip IV transcription factor shows similar spatial and temporal activity in transgenic wheat, barley and rice // *Plant Biotechnol. J.* 2012. V. 10. P. 43–53.
- Lee S.C., Hwang B.K. Identification and deletion analysis of the promoter of the pepper *SAR8.2* gene activated by bacterial infection and abiotic stresses // *Planta*. 2006. V. 224. P. 255–267.
- Lee S.C., Kim D.S., Kim N.H., Byung Kook Hwang B.K. Functional analysis of the promoter of the pepper pathogen-induced gene, *CAPIP2*, during bacterial infection and abiotic stresses // *Plant Sci.* 2007. V. 172. P. 236–245.
- Ma B.G., Duan X.Y., Niu J.X. *et al.* Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible *Cre/loxP* recombination system with self-excision of selectable marker // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 163–169.
- Mac A., Krzymowska M., Barabasz A., Hennig J. Transcriptional regulation of the *gluB* promoter during plant response to infection // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2004. V. 9. P. 843–853.
- Malnoy M., Reynoird J.P., Borejsza-Wysocka E.E., Aldwinckle H.S. Activation of the pathogen-inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus × domestica*) // *Transgenic Res.* 2006. V. 15. P. 83–93.
- Manners J.M., Penninckx A.M.A.I., Vermaere K. *et al.* The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and

- responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 38. P. 1071–1080.
- Mauch-Mani B., Slusarenko A.J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica* // *Plant Cell.* 1996. V. 8. P. 203–212.
- Mitter N., Kazan K., Way M.H., Broekaert F.W., Manners J.M. Systemic induction of an *Arabidopsis* plant defensin gene promoter by tobacco mosaic virus and jasmonic acid in transgenic tobacco // *Plant Sci.* 1998. V. 136. P. 169–180.
- Mohan R., Bajar A.M., Kolattukudy P.E. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (*tap1*) by wounding in transgenic tobacco and activation of *tap1/GUS* and *tap2/GUS* chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack // *Plant Mol. Biol.* 1993a. V. 21. P. 341–354.
- Mohan R., Vijayan P., Kolattukudy P.E. Developmental and tissue-specific expression of a tomato anionic peroxidase (*tap1*) gene by a minimal promoter, with wound and pathogen induction by an additional 5'-flanking region // *Plant Mol. Biol.* 1993b. V. 22. P. 475–490.
- Molina A., Diaz I., Vasil I.K., Carbonero P., Garcia-Olmedo F. Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 from barley show differential responses to bacterial pathogens // *Mol. Gen. Genet.* 1996. V. 252. P. 162–168.
- Park H.C., Kim M.L., Kang Y.H. *et al.* Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 Box that interacts with a GT-1-like transcription factor // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 2150–2161.
- Park H.C., Kim M.L., Kang Y.H. *et al.* Functional analysis of the stress-inducible soybean calmodulin isoform-4 (*GmCaM-4*) promoter in transgenic tobacco plants // *Mol. Cells.* 2009. V. 27. P. 475–480.
- Park H.C., Kim M.L., Lee S.M. *et al.* Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the calmodulin isoform 4 (*GmCaM4*) promoter // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 3612–3623.
- Rhee van de M.D., Lemmers R., Bol J.F. Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic beta-1,3-glucanase genes // *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 21. P. 451–461.
- Rookes J.E., Cahill D.M. A *PAL1* gene promoter-green fluorescent protein reporter system to analyse defence responses in live cells of *Arabidopsis thaliana* // *Eur. J. Plant Pathol.* 2003. V. 109. P. 83–94.
- Schweizer P. Tissue-specific expression of a defence-related peroxidase in transgenic wheat potentiates cell death in pathogen-attacked leaf epidermis // *Mol. Plant Pathol.* 2008. V. 9. P. 45–57.
- Smirnova O.G., Ibragimova S.S., Kochetov A.V. Simple database to select promoters for plant transgenesis // *Transgenic Res.* 2012. V. 21. P. 429–437.
- Smirnova O.G., Kochetov A.V. Wheat promoter sequences for transgene expression // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012. V. 2. P. 434–439.
- Strittmatter G., Gheysen G., Gianinazzi-Pearson V. *et al.* Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gst1* gene // *Mol. Plant. Microbe Interact.* 1996. V. 9. P. 68–73.
- Swartzberg D., Kirshner B., Rav-David D., Elad Y., Granot D. *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the *IPT* gene // *Eur. J. Plant Pathol.* 2008. V. 120. P. 289–297.
- Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L. *et al.* Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 1121–1126.
- Uknes S., Dincher S., Friedrich L. *et al.* Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco // *Plant Cell.* 1993. V. 5. P. 159–169.
- Wiley P.R., Tosi P., Evrard A., Lovegrove A., Jones H.D., Shewry P.R. Promoter analysis and immunolocalisation show that puroindoline genes are exclusively expressed in starchy endosperm cells of wheat grain // *Plant Mol. Biol.* 2007. V. 64. P. 125–136.
- Zhu B., Chen T.H.H., Li P.H. Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants // *Plant Physiol.* 1995. V. 108. P. 929–937.

PLANT GENE PROMOTERS RESPONSIVE TO PATHOGEN INVASION**O.G. Smirnova, A.V. Kochetov**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: planta@bionet.nsc.ru;
Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Gene networks controlling plant defense against pathogens are rather complex. They may involve hundreds of genes. Infection induces considerable changes at different levels: molecular-genetic, biochemical, physiological, and morphological. These changes manifest themselves locally (near the invasion site) or systemically. The reconstruction of particular gene networks responsible for defense against pathogenic bacteria, fungi, and viruses is an important step in the elucidation of the underlying molecular mechanisms as well as for the development of new approaches to crop improvement. The transcription levels of genes involved in the defense mechanisms commonly increase in response to pathogen invasion. Thus, investigation of their promoters is important for detection of new transcriptional factors controlling their activity and for search for new genes involved in pathogen response. It seems desirable to employ pathogen-responsive promoters to make plant cultivars resistant to various pathogens by gene engineering techniques. In this paper, we present data on promoters of pathogen-responsive genes with experimentally verified transcription patterns annotated in the TGP (TransGene Promoters) database. TGP may be used as a source of information for both interpretation of transcriptomic data and design of gene engineering constructs to obtain agricultural plants with improved resistance against various pathogens.

Key words: promoter, pathogen, transgenic plants, databases.