

УДК 581.1

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ КОНСТИТУТИВНОЙ, ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕНЕСЕННЫХ ГЕНОВ У ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ

© 2019 г. О. Г. Смирнова^а, *, В. К. Шумный^а, А. В. Кочетов^а

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: planta@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 19.04.2018 г.

После доработки 01.02.2019 г.

Принята к публикации 06.02.2019 г.

Генетическая инженерия позволяет выходить за пределы природной изменчивости видов и создает возможности получать декоративные растения с новыми окрасками и формами цветка, повышенной устойчивостью и целым рядом характеристик, дающих эстетическое и экономическое преимущество. Как правило, для достижения нужных эффектов требуется изменение паттернов экспрессии определенных генов. Промотор является ключевым регуляторным элементом, определяющим уровень, тканевую и временную специфичность экспрессии гена, поэтому при планировании структуры генетических конструкций для экспрессии трансгенов в растениях в первую очередь подбирается подходящий промотор. В последние годы изучено много новых конститутивных, тканеспецифичных и индуцируемых промоторов растительного происхождения, которые могут расширить перспективы создания новых форм и сортов за счет точно направленной экспрессии перенесенных генов. В обзоре анализируются имеющиеся в литературе сведения об использовании промоторов на примере биотехнологии декоративных растений.

Ключевые слова: декоративные растения — трансгенные растения — конститутивные промоторы — тканеспецифичные промоторы — стресс-индуцируемые промоторы — устойчивость к заболеваниям — старение — окраска цветка

DOI: 10.1134/S001533031905018X

ВВЕДЕНИЕ

Цветы радуют нас своей красотой в садах и парках. Основными направлениями селекции декоративных культур являются устойчивость к вредителям, стрессам, пестицидам, сохранение срезаемых побегов, усиление аромата, изменение времени цветения, получение компактных форм, модификация окраски и строения цветка. В мо-

лекулярно-генетическом отношении цветочные культуры изучены в меньшей степени, чем такие модельные объекты, как арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*), рис (*Oryza sativa*) или табак (*Nicotiana tabacum*). Некоторые декоративные культуры являются полиплоидами. В зоне рискованного земледелия хорошо заметна разница между тетраплоидными, триплоидными и диплоидными формами гладиолусов (*Gladiolus grandiflorus*), лилий (*Lilium*), нарциссов (*Narcissus pseudonarcissus*), тюльпанов (*Tulipa gesneriana*), хризантем (*Chrysanthemum morifolium*) и пионов (*Paeonia lactiflora*). Полиплоиды обладают лучшими ростовыми качествами и обеспечивают рентабельность цветочного производства. Многие сорта роз (*Rosa hybrida*) и петуний (*Petunia hybrida*) имеют гибридное происхождение. Это осложняет получение новых форм традиционными методами гибридизации и селекции.

Генная инженерия позволяет получать желаемые признаки у сорта без многолетних гибридизаций и возвратных скрещиваний, что существенно сокращает время, необходимое для его

Сокращения: BOM — вирус огуречной мозаики; 5'-НТО — 5'-нетранслируемая область; ANS — антоцианидин-синтаза (от *anthocyanidin synthase*); CaMV35S — промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (от *Cauliflower mosaic virus 35S*); CHS — халкон-синтаза (от *chalcone synthase*); DFR — дигидрофлавонол-4-редуктаза (от *dihydroflavonol 4-reductase*); IPT — изопентил-трансфераза (от *isopentenyl transferase*); GUS — β-глюкуронидаза (от *glucuronidase*); F3H — флавонон-3-гидроксилаза (от *flavonone 3-hydroxylase*); F3'5'H — флавоноид-3',5'-гидроксилаза (от *flavonoid 3',5'-hydroxylase*); *SAG12* — связанный со старением ген (от *senescence-associated gene*); *SH1* — короткие междоузлия (от *short internodes*); DREB — белок, связывающийся с чувствительным к дегидратации элементом (от *dehydration responsive element binding protein*); *uidA* — ген β-глюкуронидазы.

создания. Обширные данные литературы о генетических модификациях розы, лилии, герберы (*Gerbera jamesonii*), хризантемы, гвоздики (*Dianthus*), гладиолуса, антуриума (*Anthurium andraeanum*) представлены в ряде обзоров [1, 2], где основное внимание сконцентрировано на огромном разнообразии целевых генов, которые были использованы или могут быть использованы при создании новых сортов.

Промотор в значительной степени определяет тканеспецифичный характер и уровень экспрессии целевого гена. Промотор – это участок ДНК, который управляет транскрипцией гена. Промотор белок-кодирующего гена состоит из корового элемента, расположенного в непосредственной близости от точки начала транскрипции гена, проксимального и дистального элементов, содержащих сайты связывания специфических транскрипционных факторов, выполняющих роль активаторов или репрессоров транскрипции [3, 4]. Размеры промотора могут достигать нескольких сотен пар оснований. Промоторы, используемые в геномной инженерии растений, различаются по происхождению (растительные, вирусные, бактериальные, синтетические и т.д.), характеру активности (сильные, слабые, конститутивные, тканеспецифичные), с изменением активности в процессе онтогенеза и при действии различных факторов (индуцированная экспрессия генов). Конститутивные и тканеспецифичные промоторы определяют экспрессию гена во многих или в отдельных тканях организма, соответственно.

Известно много примеров положительного влияния первого интрона, расположенного в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) гена, на экспрессию трансгенов [5–7]. По этой причине 5'-НТО часто включают в состав генетической конструкции [8–10].

Транзиентная (временная) экспрессия используется для оценки силы промотора и его совместимости с факторами транскрипции в хозяйских клетках. Транзиентная экспрессия в отдельных органах и тканях позволяет охарактеризовать промотор без получения полноценных трансгенных растений, что значительно ускоряет проведение сравнительной оценки сразу нескольких промоторов. Окончательная характеристика промотора проводится в разных органах и на разных стадиях развития трансгенного растения. Источником информации о промоторах является изучение функций отдельных генов и регуляции метаболических процессов. Информация о промоторах, использованных в экспериментах с трансгенными растениями, представлена в ряде обзоров [11–15]. Накопление информации о промоторах в структурированном виде в базе данных TransGene Promoters (TGP; <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/dbases/tgp/home.html>) позволяет быстро находить промоторы рас-

тений с определенными характеристиками [16]. Создание новых форм цветочных культур методами генетической инженерии идет с высокой интенсивностью. В связи с этим возникает потребность анализа промоторов, которые были использованы в данных исследованиях, для понимания возможностей их применения при решении новых задач. Чтобы ускорить создание растений с заданными характеристиками, важно иметь большое разнообразие промоторов для одновременного переноса нескольких генов в геном растения [11]. Многократное использование одного промотора может приводить к подавлению экспрессии генов из-за сайленсинга, вызываемого наличием одинаковых повторяющихся последовательностей [11]. Взаимодействие, возникающее между промоторами, может быть серьезной проблемой при инженерии нескольких тканеспецифичных признаков с использованием одного вектора [17]. Разработан вектор для одновременного изучения активности пяти промоторов растений [18]. Синтетические промоторы, сочетающие элементы промоторов разного происхождения, позволяют достигать высокого уровня индуцированной экспрессии генов [19, 20]. Уровень экспрессии трансгена в определенных тканях также важен для получения желаемого фенотипа. Одни и те же промоторы могут обеспечивать разный уровень экспрессии трансгена в разных видах растений, что говорит о необходимости накопления первичных данных для анализа и составления рекомендаций по использованию промоторов разного типа. В данном обзоре описываются промоторы, которые могут быть с успехом применены в генетической инженерии цветочных культур.

КОНСТИТУТИВНЫЕ ПРОМОТОРЫ

При создании генетических конструкций часто используется промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV35S), поскольку он способен обеспечивать экспрессию рекомбинантного гена у разных видов растений. Конститутивный промотор CaMV35S был использован для управления экспрессией целевых генов, повышающих устойчивость к вирусу огуречной мозаики (*Cucumber mosaic virus*) у гладиолуса, лилии, петунии [21–23], к вирусу погрелковости табака (*Tobacco rattle virus*) у петунии [23], к серой гнили (*Botrytis cinerea*) у петунии и лилии [23, 24], к нематоду (*Pratylenchus penetrans*) у лилии [25]. В течение многих лет исследователи изучают конститутивные промоторы растительного происхождения, которые могут обеспечивать более высокий уровень экспрессии по сравнению с промотором CaMV35S (табл. 1). Разнообразие конститутивных промоторов необходимо для одновременной экспрессии нескольких целевых генов, в том чис-

Таблица 1. Конститутивные промоторы для экспрессии целевых генов в цветочных культурах

Промотор	Происхождение	Целевой вид	Экспрессируемый ген	Уровень экспрессии	Направление использования промотора	Литература
CaMV35S	Вирус мозаики цветной капусты	Гладиолус	<i>uidA</i>	Высокий	Сравнительный контроль	10
			Ген репликазы	Умеренный	Устойчивость к ВОМ	21
			Ген scFv	Высокий	Устойчивость к ВОМ	27
		Лилия	Ген репликазы	Высокий	Устойчивость к ВОМ	22
			<i>RCH10</i>	Высокий	Устойчивость к серой гнили	24
			<i>cystatin</i>	Высокий	Устойчивость к нематоде	25
		Петуния	<i>LrABCF1</i>	Высокий	Устойчивость к серой гнили, погрелковости табака, ВОМ	23
			<i>uidA</i>	Высокий	Сравнительный контроль	66
		Фрезия, каланхоэ, хризантема	<i>uidA</i>	Умеренный	Сравнительный контроль	28
			<i>SHI</i>	Высокий	Компактность	31
		Роза	<i>uidA, AtDREB1A</i>	Низкий	Устойчивость к засухе	33–36, 37
			<i>uidA</i>	Умеренный	Сравнительный контроль	28
<i>F3'5'H, DFR</i>	Умеренный		Голубые цветки	61		
Антуриум	<i>uidA</i>	Умеренный	Экспрессия целевых генов	8		
AtUBQ3	Арабидопсис	Гладиолус	Ген белка оболочки ВОМ	Высокий	Устойчивость к ВОМ	21
SoUbi9	Сахарный тростник	Гладиолус	Ген scFv	Высокий	Устойчивость к ВОМ	27
OsUbi2	Рис	Антуриум	<i>uidA</i>	Высокий	Экспрессия целевых генов	8
ZmUbi1	Кукуруза	Антуриум, лилия, тюльпан	<i>uidA</i>	Высокий	Экспрессия целевых генов	8
		Гладиолус	Выше CaMV35S	9		
			Ниже CaMV35S	10		
OsAct1	Рис	Антуриум	<i>uidA</i>	Умеренный	Экспрессия целевых генов	8
OsAct1	Рис	Тюльпан, лилия	<i>uidA</i>	= CaMV35S	Экспрессия целевых генов	9
GgUBQ1	Гладиолус	Гладиолус	<i>uidA</i>	= CaMV35S	Экспрессия целевых генов	10, 28
		Роза, калла, фрезия, лилия		= CaMV35S = CaMV35S = CaMV35S		28
GgUBQ2, GgUBQ4	Гладиолус	Гладиолус	<i>uidA</i>	Ниже CaMV35S	Нормальный рост трансгенных растений	29
AtGAI	Арабидопсис	Хризантема	<i>gai</i>	Умеренный	Компактность	30
AtSH1	Арабидопсис	Каланхоэ	<i>SHI</i>	Умеренный	Компактность, длительность цветения	31
CmActin	Хризантема	Хризантема	<i>uidA, BrSRS</i>	Выше CaMV35S	Компактность	32
StLhca3.1	Картофель	Хризантема	<i>uidA</i>	Выше CaMV35S	Экспрессия целевых генов	33
DjCab	Хризантема	Хризантема	<i>uidA</i>	Выше CaMV35S	Экспрессия целевых генов	34
CmRbcS1	Хризантема	Хризантема	<i>uidA</i>	Выше CaMV35S	Экспрессия целевых генов	35
NtEF1 α	Табак	Хризантема	<i>uidA</i>	Выше CaMV35S	Экспрессия целевых генов	36

ле и для успешного применения у растений системы CRISPR/Cas9, используемой для редактирования природных генов [26].

Для получения гладиолусов с повышенной устойчивостью к вирусу огуречной мозаики (ВОМ) были созданы конструкции, в которых дефектный ген репликазы был помещен под управление дуплицированного промотора CaMV35S и ген белка оболочки ВОМ – под управление промотора гена полиубиквитина *AtUBQ3* из арабидопсиса [21]. Около 15% полученных трансгенных растений демонстрировали устойчивость к вирусу. Устойчивые растения с промотором *AtUBQ3* демонстрировали более высокий уровень экспрессии целевого гена, чем растения с усиленным промотором CaMV35S. В дальнейшем промотор гена полиубиквитина *SoUbi9* из сахарного тростника (*Saccharum officinarum*) и дуплицированный промотор CaMV35S были использованы для экспрессии в гладиолусе гена одноцепочечных переменных фрагментов антител scFv (single-chain variable fragment) против ВОМ [27]. Около 7% полученных трансгенных растений были устойчивы к вирусу. Оба промотора обеспечивали высокий уровень экспрессии трансгена, причем у наиболее устойчивой линии трансген находился под контролем промотора *SoUbi9*.

Промоторы генов полиубиквитина *OsUbi2* из риса (*Oryza sativa*) и *ZmUbi1* из кукурузы (*Zea mays*) в сочетании с 5'-НТО обеспечивают высокий уровень экспрессии репортерного гена *uidA*, кодирующего β-глюкуронидазу (GUS) *Escherichia coli*, в листовых пластинках, соматических эмбрионах и корнях антуриума [8]. Эти промоторы могут быть использованы для экспрессии антибактериальных и других генов у антуриума. Умеренная активность промотора CaMV35S и регуляторного района, состоящего из промотора и 5'-НТО гена актина *OsAct1* из риса, может быть использована для экспрессии селективных генов. Высокая экспрессия селективного гена может приводить к попаданию селективного белка в соседние нетрансформированные клетки и к инактивации в них селективного агента, что приведет к выживанию химерного или нетрансформированного материала [8]. Неспособность промотора гена цитохрома *OsCc1* из риса обеспечивать достаточный уровень экспрессии *uidA* в антуриуме может быть связана с отсутствием в промоторе *OsCc1* подходящих *cis*-элементов или отсутствием в составе генетической конструкции первого интрона, расположенного в 5'-НТО гена *OsCc1* [8].

Промотор *OsAct1* имеет такую же активность, как и промотор CaMV35S в листовых пластинках тюльпана и лилии [9]. Активность промотора *ZmUbi1* в листовых пластинках тюльпана была ниже, а в листовых пластинках лилии выше, чем активность CaMV35S [9]. Активность промотора

ZmUbi1 в гладиолусе была в 30 раз ниже, чем активность CaMV35S, хотя гладиолус, как и кукуруза, является однодольным растением [10].

В гладиолусе промотор гена полиубиквитина *GgUBQ1* в сочетании с интроном в 5'-НТО обеспечивает высокий уровень экспрессии гена *uidA*, сравнимый с экспрессией под контролем промотора CaMV35S [10, 28]. В клетках фрезии, каллы (*Zantedeschia elliottiana*), лилии и розы относительная активность GUS при использовании промоторов *GgUBQ1* и CaMV35S составила 5–15% от активности в гладиолусе [28]. Удаление 5'-НТО не влияло на экспрессию *uidA* у фрезии, каллы и лилии и достоверно снижало экспрессию у гладиолуса и розы [28]. Промотор *GgUBQ4* обеспечивал более высокий уровень экспрессии *uidA* в каллусе, молодых побегах и корнях гладиолуса по сравнению с промотором *GgUBQ2* [29]. Растения с промоторами *GgUBQ2* и *GgUBQ4* имели нормальный фенотип и умеренный уровень экспрессии *uidA*, в то время как растения с промотором CaMV35S отставали в росте и имели повышенный уровень экспрессии *uidA*. Промоторы *GgUBQ2* и *GgUBQ4* могут быть использованы для обеспечения нормального роста трансгенных растений гладиолуса [29].

Укорочение междоузлий является важным направлением селекции для получения компактных форм цветочных культур. Метод генетической инженерии является альтернативой использованию синтетических регуляторов роста у растений. Было получено несколько линий трансгенных хризантем (*C. morifolium*), которые экспрессировали ген *gai* (*gibberellic acid insensitive*) арабидопсиса под управлением собственного промотора [30]. Трансформанты *AtGAI:gai* имели карликовый фенотип, что было вызвано снижением чувствительности к гиббереллинам [30].

Удобная для выращивания карликовая форма каланхоэ (*Kalanchoe blossfeldiana*) была получена путем экспрессии гена транскрипционного фактора SHI (SHORT INTERNODES) арабидопсиса под управлением промоторов CaMV35S и *AtSHI* [31]. Полученные трансгенные растения каланхоэ помимо карликового роста имели компактные соцветия, а растения с промотором *AtSHI* – и удлиненный период цветения.

Промотор гена актина *CmActin* из хризантемы (*C. morifolium*) обеспечивает на порядок более высокий уровень активности GUS во всех органах хризантем, чем промотор CaMV35S, в то время как в арабидопсисе оба промотора обеспечивают сопоставимый уровень активности GUS [32]. В хризантемах экспрессия гена *BrSRS* (*Brassica rapa SHI-related sequence*) из китайской капусты под управлением промотора *CmActin* приводит к развитию компактных карликовых растений с узкими скрученными вверх листьями и короткими че-

Таблица 2. Индуцируемые промоторы для экспрессии целевых генов в цветочных культурах

Промотор	Происхождение	Целевой вид	Экспрессируемый ген	Характер экспрессии	Направление использования промотора	Литература
AtRD29A	Арабидопсис	Хризантема	<i>AtDREB1A</i>	Индукция при засухе и солевом стрессе	Устойчивость к засухе и солевому стрессу	37
RhEXPA4	Роза	Арабидопсис	<i>uidA</i>	Индукция при засухе и солевом стрессе	Экспрессия целевых генов	92
AmCMO	Амарант	Амарант, арабидопсис	<i>uidA</i>	Повышение в 4 раза при солевом стрессе	Экспрессия целевых генов	42
AtSAG12	Арабидопсис	Петуния, пеларгония, гербера, роза	<i>ipt</i>	Активен на поздних стадиях развития	Замедление старения (в т. ч. при засухе, в темноте)	40, 49 44 45 46
AtCOR15	Арабидопсис	Хризантема	<i>ipt</i>	Индукция при низкой температуре	Замедление старения в темноте после индукции холодом	41

решками [32]. Промоторы генов *Lhca3.1* из картофеля (*Solanum tuberosum*), *Cab* из дикой хризантемы (*Dendranthema japonicum*), *RbcS1* из хризантемы (*C. morifolium*), фактора элонгации трансляции 1 α табака *NtEF1 α* [33–36] также более эффективны для экспрессии целевых генов в листьях хризантем, чем CaMV35S.

Высокая активность конститутивных промоторов OsUbi2 и ZmUbi1 в антуриуме, OsAct1 в тюльпане и лилии, ZmUbi1 в лилии, GgUBQ1, GgUBQ4 в гладиолусе, GgUBQ1 в розе и фрезии, CmActin, StLhca3.1, DjCab, CmRbcS1, NtEF1 α в хризантеме может быть использована в генетической инженерии для повышения устойчивости к заболеваниям у перечисленных видов (табл. 1).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ И ЗАМЕДЛЕНИЯ СТАРЕНИЯ

Устойчивость к стрессам

Растения подвергаются разнообразным стрессовым воздействиям, таким как засуха, засоление, высокие или низкие температуры. Механизмы адаптации растений в первую очередь связаны с регуляцией транскрипционной активности генов в ответ на действие абиотических факторов. В ряде случаев конститутивная экспрессия под контролем промотора CaMV35S целевых генов, повышающих устойчивость к неблагоприятным факторам, может приводить к подавлению роста растений [37–39]. Использование стресс-индуцируемых промоторов AtRD29A, AtSAG12, AtCOR15

позволяет достигнуть желаемого результата и избежать негативного воздействия экспрессии целевого гена на рост и развитие трансгенного растения [37, 40, 41].

Повышенная экспрессия гена транскрипционного фактора DREB1A (dehydration responsive element binding protein) из арабидопсиса под контролем промотора CaMV35S повышала устойчивость к засухе и засолению, но вызывала серьезную задержку роста хризантем сорта Fall Color [37]. Промотор гена *AtRD29A* (*desiccation-responsive*) широко используется для стресс-индуцированной экспрессии трансгенов у двудольных растений. Хризантемы, экспрессирующие *AtDREB1A* под контролем промотора AtRD29A, имели более высокую устойчивость к засухе и солевому стрессу и нормальные ростовые показатели по сравнению с хризантемами, несущими конструкцию CaMV35S:*AtDREB1A* (табл. 2). Повышенная устойчивость трансгенных хризантем сопровождалась увеличением уровня пролина и активности супероксиддисмутазы [37].

Амарант (*Amaranthus tricolor*) в период водного или солевого стресса накапливает бетаин, который защищает клетки, поддерживая осмотический баланс и структуру белков [42]. Активность промотора гена *AmCMO*, кодирующего холинмонооксигеназу, которая участвует в синтезе бетаина, возрастает в 4 раза во время солевого стресса [42]. Поскольку немногие растения способны накапливать бетаин, предлагается методами генетической инженерии использовать путь биосинтеза бетаина для повышения стрессоустойчивости растений [42].

Старение

Замедление старения цветов и листьев очень важно для сохранения привлекательного вида цветочных культур. В процессе старения в растениях снижается концентрация эндогенных цитокининов [43]. Опрыскивание экзогенными цитокининами предотвращает пожелтение листьев. Изопентил-трансфераза (IPT) является ключевым ферментом биосинтеза цитокининов, ген которой *ipt* из *Agrobacterium tumefaciens* широко используется для экспрессии в трансгенных растениях [40, 41, 43–46]. Конститутивная экспрессия *ipt* под контролем промотора CaMV35S приводила к повышению уровня цитокининов и замедлению старения листьев, но сопровождалась замедлением роста и развитием аномальных признаков у табака и японского перца (*Zanthoxylum piperitum*) [47, 48]. Чтобы избежать негативных последствий, было предложено экспрессировать ген *ipt* под контролем промотора гена *SAG12* (*senescence-associated gene*), активного только на поздних стадиях развития арабидопсиса [32]. Активность промотора AtSAG12 возрастает в различных органах в процессе старения трансгенных петуний и пеларгоний (*Pelargonium zonale*) [40, 44, 49]. Старение цветков и листьев у трансгенных петуний задерживалось на 6–10 дней, а способность к вегетативному размножению, габитус ветвления и время цветения не отличались от нормальных растений, что свидетельствует о возможности задерживать старение без нанесения ущерба другим признакам [40]. Причины замедления старения были связаны с повышенным уровнем цитокининов, задержкой индукции синтеза этилена, снижением чувствительности к экзогенному этилену, накоплением в венчиках абсцизовой кислоты [43]. У трансгенных петуний наблюдалось замедление старения в условиях засухи, что было связано с индукцией активности промотора AtSAG12 в этих условиях и возрастанием экспрессии *ipt* [40].

Дефицит влаги часто вызывает ускоренное старение листьев герберы. Задержка старения листьев при осмотическом стрессе, обусловленная повышением активности антиоксидантных ферментов, наблюдалась у трансгенной герберы, экспрессирующей *ipt* под контролем промотора AtSAG12 [45]. Для пеларгоний, экспрессирующих *ipt* под контролем промотора AtSAG12, характерна более компактная форма за счет уменьшения длины междоузлий и усиленного ветвления, более интенсивная окраска цветов и листьев, уменьшение их размера и замедление старения листьев [44]. В миниатюрных горшечных розах сорта Линда совместное действие экзогенного этилена и темноты в шесть раз повышало уровень экспрессии *ipt*, находящегося под контролем промотора AtSAG12 [46]. Такое воздействие благоприятно сказывалось на трансгенных розах, по-

скольку приводило к существенному повышению содержания хлорофилла [46].

Снижение чувствительности к этилену способствует сохранению привлекательности цветов, поскольку этилен участвует в процессах старения. Экспрессия мутантного гена рецептора этилена *etr1-1* арабидопсиса под контролем промотора CaMV35S замедляла старение цветков петуний, но негативно сказывалась на черенковании, которое используется для размножения ценных гибридных сортов [50]. Специфичный для цветков петунии промотор PhFBP1 (*floral homeotic protein*) был использован для экспрессии гена *Atetr1-1* в цветках гвоздики и каланхоэ, что позволило избежать в вегетативных частях растений негативного эффекта нечувствительности к этилену в этилен-зависимых процессах. Полученные растения характеризовались снижением чувствительности к этилену в цветках, но не в других органах [51, 52].

При длительном хранении вегетативных черенков и целых растений необходимо поддерживать низкую температуру, что позволяет снизить дыхание и предотвратить этиоляцию листьев, которая происходит в процессе хранения при нормальной температуре и низком освещении. Чтобы решить эту задачу, была создана генетическая конструкция, в которой ген *ipt* был помещен под контроль промотора COR15 из арабидопсиса, активность которого повышается при действии засухи, холода и АБК [41, 53]. Конструкция AtCOR15:*ipt* была введена в петунию и хризантему (*D. grandiflorum*). При температуре 25°C трансгенные растения имели нормальный фенотип. После воздействия пониженной температуры в 4°C в течение 3 суток и последующего хранения в темноте при 25°C в течение четырех недель взрослые трансгенные растения и срезанные с них листья оставались зелеными, в то время как контрольные трансгенные растения, которые не подвергались воздействию холода, проявляли признаки старения. Холод индуцировал активность промотора AtCOR15, что приводило к повышению экспрессии *ipt*, концентрации цитокининов и уровня хлорофилла в листьях трансгенных растений [41].

В лепестках венчика ночной красавицы (*Mirabilis jalapa*) в процессе старения более чем в 40 тысяч раз повышается экспрессия гена убиквитинлигазы *MjXB3* [49]. Промотор MjXB3 обеспечивает высокую экспрессию репортерного гена *uidA* в стареющих цветках петунии и гвоздики, но не активен в цветках однодольных растений: лилейнике (*Hemerocallis Stella d'Oro*), нарциссе и орхидее (*Dendrobium Emma White*). В отличие от промотора MjXB3, промоторы AtSAG12 и CaMV35S обеспечивают экспрессию *uidA* в венчиках лилейника и нарцисса и, в значительно меньшей степени, в венчике орхидеи. Активность промотора MjXB3

наблюдается исключительно в лепестках стареющих цветков и отсутствует в других тканях. Промотор MjXB3 обладает гораздо большей специфичностью в стареющих лепестках по сравнению с промотором AtSAG12, поскольку незначительная активность AtSAG12 все же присутствует в молодых цветках петунии [49].

Промоторы MjXB3 и AtSAG12 являются эффективным инструментом для изучения и управления механизмами старения у декоративных растений.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ПРОМОТОРЫ

Цветки

Среди тканеспецифичных промоторов, способных управлять экспрессией целевых генов у декоративных растений, конечно же, наибольший интерес представляют промоторы, проявляющие специфическую активность в цветках. Основные направления модификации цветков заключаются в изменении их окраски, формы и количества лепестков. Генно-инженерный подход для модификации окраски цветков заключается в выборе необходимого целевого гена и промотора со специфической экспрессией в цветках. Промоторы многих генов, продукты которых участвуют в синтезе или распаде пигментов, обладают такой специфической экспрессией. К ним относятся промоторы генов каротиноид-расщепляющей диоксигеназы 4a-5 (CCD4a-5) из хризантемы (*C. morifolium*) [54], халкон-синтазы (CHS) из лилии (*L. oriental*) [55], антоцианидин-синтазы (ANS) из табака [56], контролирующих синтез антоцианов транскрипционных факторов MYB1 из ипомеи (*Ipomoea nil*) [57] и MYB10 из яблони (*Malus domestica*) [58, 59] (табл. 3).

Изменить окраску цветков можно как за счет повышения экспрессии генов транскрипционных факторов, регулирующих пути биосинтеза пигментов, так и за счет повышения экспрессии отдельных ключевых генов биосинтеза пигментов. Чтобы получить кардинально новую окраску цветков, необходимо внедрить чужеродные гены биосинтеза пигментов, отсутствующих у целевого вида. Для повышения уровня транскрипционного фактора, регулирующего синтез антоцианов, используют как изменение структуры промотора соответствующего гена, так и повышенную экспрессию гена транскрипционного фактора под контролем чужеродного промотора.

У яблони транскрипционный фактор MYB10 не только регулирует активность генов, участвующих в синтезе антоцианов, но и непосредственно активирует собственный промотор MdMYB10, связываясь с мотивом R1. Природная мутация R6 приводит к увеличению числа мотивов R1 в промоторе MdMYB10, более сильной активации Md-

MYB10 и повышению уровня антоциана. Мотив R6 функционален и у других видов. Трансформация белоцветковых петуний сорта Mitchell конструкцией MdMYB10-R6: *MdMYB10* активирует синтез антоциана в цветках, но не в листьях [58]. Инсерция мотива R6 в промоторы PcMYB10 груши (*Pyrus communis*), AtMY75 арабидопсиса, AcF3'5'H киви (*Actinidia chinensis*) приводит к повышению синтеза антоциана в табаке и киви. Инсерция мотива R6 в промотор гена *GGP* (GDP-L-galactose phosphorylase) киви (*A. eriantha*) приводит к активации транскрипции гена *AeGGP* транскрипционным фактором MdMYB110 и повышению синтеза аскорбиновой кислоты в табаке [59]. Мотив R6 является инструментом для реорганизации разнообразных промоторов растений, обеспечивая их чувствительность к MYB-транскрипционным факторам, и может быть использован для регуляции синтеза антоцианов у декоративных растений.

Ко-экспрессия гена *mPAP1* транскрипционного фактора R2R3 MYB арабидопсиса и гена *B-peru* транскрипционного фактора bHLH (basic helix loop helix) кукурузы под контролем промотора CaMV35S в составе двух векторов приводит к повышенному накоплению антоциана во всех органах табака, но негативно отражается на росте растений [60]. Совместная экспрессия тех же генов под контролем тканеспецифичного промотора гена *ANS* табака в составе одного вектора приводит к значительному усилению окраски исключительно цветков табака без угнетения роста растений [56]. Можно ожидать, что использование регуляторных генов будет иметь все большее значение для получения новых окрасок цветков.

Большинство цветков, окрашенных в голубой цвет, содержат антоциан дельфинидин. В природе не встречаются розы, хризантемы, гвоздики с пурпурной, фиолетовой и синей окраской цветков, поскольку у них отсутствует флавоноид-3',5'-гидроксилаза (F3'5'H) — ключевой фермент биосинтеза пигмента дельфинидина. Чтобы получить устойчивый уровень синтеза дельфинидина и желаемую окраску цветка, были использованы разные подходы. Голубые розы были получены путем экспрессии под контролем усиленного промотора CaMV35S гена *F3'5'H* из анютиных глазок (*Viola wittrockiana*), гена дигидрофлавонол-4-редуктазы (*DFR*) из ириса (*Iris hollandica*) и подавления экспрессии природного гена *DFR* розы методом РНК-интерференции [61]. *DFR* из розы и ириса имеют разную субстратную специфичность. Замена *DFR* приводит к снижению синтеза пеларгонидина и цианидина и преимущественному накоплению дельфинидина в голубых розах.

В хризантемах промотор CaMV35S не дает необходимый уровень экспрессии трансгена [62]. В хризантемах очень высокий уровень накопления

Таблица 3. Тканеспецифичные промоторы для экспрессии целевых генов в цветочных культурах

Промотор	Происхождение	Целевой вид	Экспрессируемый ген	Уровень экспрессии	Орган	Литература
PhFBP1	Петуния	Гвоздика, каланхоэ	<i>Atetr1-1</i>	Умеренный	Цветки (лепестки, тычинки)	51, 52
CmCCD4a-5	Хризантема	Арабидопсис	<i>uidA</i>	Умеренный	Лепестки	54
LoCHS	Лилия	Петуния	<i>uidA</i>	В 3 раза ниже, чем CaMV35S	Цветки	55
NtANS	Табак	Табак	<i>mPAP1, B-peru</i>	Умеренный	Цветки	56
InMYB1	Ипомея	Хризантема, гвоздика	<i>uidA</i>	Высокий	Лепестки	57
MdMYB10	Яблоня	Петуния	<i>MdMYB10</i>	Умеренный	Цветки	58
RhCHS	Роза	Хризантема	<i>F3'5'H</i>	Умеренный	Пурпурно-фиолетовые цветки	64
CmF3H	Хризантема	Хризантема	<i>CamF3'5'H, CtA3'5'GT</i>	Высокий	Голубые цветки	65
LICCS	Тигровая лилия	Ирис	<i>crtB</i>	Высокий	Пыльники, завязь, цветоножка	76
OgCHRC	Орхидея	Орхидея, лилия	<i>uidA</i>	В 2-3 раза ниже, чем CaMV35S	Цветки	77
PsEND1	Горох	Каланхоэ, пеларгония	<i>barnase</i>	Высокий	Пыльца	44
LIGC1	Лилия	Лилия	<i>uidA</i>	Умеренный	Пыльца	81
AmDEFH125	Львиный зев	Львиный зев, арабидопсис	<i>uidA</i>	Умеренный	Пыльца	82
LIPR10g	Лилия	Арабидопсис	<i>barnase, uidA</i>	Высокий	Микроспоры	83
LlgH2A	Лилия	Табак	<i>uidA</i>	Умеренный	Пыльца	85
PhCHSA	Петуния	Петуния	<i>uidA</i>	Низкий	Цветки, трихомы	66
TcCHS	Пиретрум	Хризантема, табак	<i>gfp, uidA</i>	Умеренный	Железистые трихомы	90

дельфинидина (до 95% от общего уровня антоцианов) был достигнут путем сверх экспрессии гена *F3'5'H* колокольчика (*Campanula medium*) под контролем промотора гена *CmF3H* флавонон-3-гидроксилазы в сочетании с 5'-НТО гена алкогольдегидрогеназы табака или арабидопсиса в качестве трансляционного энхансера [63]. Промотор *CmF3H* хризантемы показал наилучший результат по сравнению с промоторами CaMV35S, халкон-синтазы (CHS) розы (*R. hybrida*), *F3'5'H* BP40 анютиных глазок, *F3H* и *DFR* розы морщинистой (*R. rugosa*), антоцианина 3АТ периллы (*Perilla frutescens*) и CHS герберы (*Gerbera hybrida*). Окраска цветков трансгенных хризантем варьировала от красно-пурпурных до пурпурно-фиолетовых и синих оттенков в зависимости от уровня накопления дельфинидина и соотношения разных пигментов [63]. В другом исследовании для получе-

ния пурпурно-фиолетовых хризантем была использована экспрессия гена *F3'5'H* анютиных глазок под контролем промотора розы RhCHS [64]. Полученные трансгенные растения содержали до 40% дельфинидина относительно общего количества антоцианидинов. Необходимый для достижения голубоватых оттенков окраски уровень дельфинидина (80%) был достигнут за счет подавления экспрессии гена *F3H* путем РНК-интерференции. В представленных исследованиях полученная окраска цветков все же не была строго голубой, а имела пурпурный и фиолетовый оттенки.

Достигнуть истинно голубого цвета хризантем удалось путем гидроксирования и гликозилирования В-кольца цианидин-гликозида с получением гликозилированных антоцианов на основе дельфинидина [65]. Для этого ген колокольчика

CamF3'5'H и ген *CtA3'5'GT* клитории тройчатой (*Clitoria ternatea*), оба под контролем промотора *SmF3H* хризантемы, были коэкспрессированы в растениях хризантемы [65]. Необходимые для проявления голубой окраски внутримолекулярные связи в синтезируемом дельфинидин-3/3',5'-*O*-гликозиде формировались благодаря присутствию в клетке ко-пигментов лютеолин-7-*O*-гликозида и трицетин-7-*O*-гликозида [65]. Достижение подобных результатов демонстрирует перспективы использования молекулярных методов для селекции цветов с новыми окрасками.

Использование промоторов, активных в генеративных органах растений, способно обеспечить изменение формы и окраски цветков у трансгенных растений, не провоцируя изменений в вегетативных органах. Фрагменты промотора гена *PhCHSA* халкон-синтазы петунии размером 220 п.н. и *CHS* из лилии (*L. orientalis*) размером 307 п.н. содержат все необходимые *cis*-элементы, обеспечивающие специфическую экспрессию в цветках трансгенных петуний [66, 55]. Для достижения более высокого уровня экспрессии были сконструированы химерные промоторы, содержащие энхансеры из промоторов *CaMV35S* или *OCS* (*ocotopine synthase*) из *Agrobacterium tumefaciens*, слитые с фрагментами промоторов *PhCHSA* или *LoCHS*. Химерный промотор *OCS-PhCHSA* показал наиболее высокую активность исключительно в окрашенных венчиках торении (*Torenia fournieri*), использованной для определения тканеспецифичной экспрессии сконструированных промоторов [67]. В связи с легкостью трансформации, торения все чаще используется как модельный объект для изучения генетических конструкций в цветоводстве [68]. Высокая активность и узкая тканевая специфичность химерного промотора *OCS-PhCHSA* позволяют использовать его для изменения признаков цветка, например, для получения новых сортов лилий с голубой окраской венчика [67].

Промотор гена *UEP1* (*ubiquitin extension protein*) хризантемы (*D. grandiflora*) обеспечивает очень высокий уровень экспрессии трансгена в лепестках трубчатых цветков и в три раза более низкий уровень экспрессии в язычковых цветках. В листьях трансгенных хризантем активность промотора *DgUEP1* была существенно ниже, чем в лепестках цветков. Промотор *DgUEP1* оказался гораздо более эффективным по сравнению с промоторами генов халкон-синтазы и транскрипционного фактора *EPF2-5* из петунии, *multicystatin* из картофеля и *eceriferum* из арабидопсиса для экспрессии целевых генов в цветках хризантемы [69].

Разработан новый метод для эффективной модификации признаков цветка, который заключается в использовании химерных репрессоров. Хи-

мерные репрессоры создаются искусственно путем присоединения короткого домена, репрессирующего транскрипцию, к транскрипционному фактору [70]. Эффективный способ получения новых признаков цветка был достигнут благодаря созданию конструкции, в которой последовательность репрессора *SRDX* была слита с последовательностью транскрипционного фактора *MYB24*. Получившаяся химерная последовательность была помещена под контроль флорального тканеспецифического промотора гена *AP1* (*apetala1*) из арабидопсиса [70]. Торении со встроенной конструкцией *AtAP1:MYB24-SRDX* имели цветки с волнистыми лепестками характерной формы. В связи с низкой активностью промотора *AtAP1* в листьях (активность репортерного белка *GUS* при его использовании составила 4 нМ *MU*/мин/мг), всего 18.8% растений имели волнистые края на молодых листьях. Данный пример демонстрирует удачное использование промотора с органоспецифичной активностью для появления новых признаков только в цветках и отсутствию побочных изменений в листьях.

Цикламен (*Cyclamen persicum*) – это комнатный луковичный цветок, цветущий в зимний период. Цикламен имеет пять лепестков. Одновременная экспрессия двух химерных репрессоров *CrAG1-SRDX* и *CrAG2-SRDX*, созданных на основе генов *agamous* цикламена, под контролем промотора *CaMV35S* приводит к формированию похожих на розы, многолепестковых цветков у цикламена за счет преобразования тычинок и плодolistиков в лепестки. Это исследование продемонстрировало различную роль транскрипционных факторов *CrAG1* и *CrAG2* в развитии цветка [71]. Однако, избыточная экспрессия химерных репрессоров под контролем промотора *CaMV35S* иногда вызывает морфологические изменения в других органах. Так, сверх экспрессия химерного репрессора арабидопсиса *TCP3-SRDX* помимо изменений признаков цветка сопровождалась подавлением развития органов цветка у хризантемы и деформацией листьев у торении [72]. Чтобы избежать подобных потерь качества растений, была поставлена задача найти новые промоторы со специфической экспрессией в цветах. Гены класса *B* *DEF* (*deficiens*), *GLO* (*globosa*), синтеза антоциана *DFR* и *F3H* специфически экспрессируются в цветках торении [73]. Анализ активности *GUS* показал, что промоторы *TfDEF*, *TfGLO*, *TfDFR* и *TfF3H* функционируют исключительно в лепестках торении, в то время как промоторы *CaMV35S* и *AtAP1* работают и в листьях. Активность промоторов *TfF3H*, *TfDFR* и *TfDEF* в лепестках была более чем на порядок выше, чем активность промоторов *TfGLO*, *AtAP1* и *CaMV35S* [73]. Активность промотора *AtAP1* в листьях была в 2 раза ниже, чем в лепестках, а активность *CaMV35S*, наоборот, – в 7 раза выше [73]. В

связи с тем, что активность промотора AtAP1 в листьях была в 7 раз ниже, чем активность CaMV35S, использование AtAP1 приводило к меньшей деформации листьев, чем использование CaMV35S. Комбинация промоторов TfDEF, TfGLO, TfDFR и TfF3H с химерным репрессором *AtTCP3-SRDX* вызывала изменение окраски, распределения окраски, формы лепестков торении, не влияя на другие признаки. Причем каждый промотор давал свои характерные и различные признаки цветка. Использование нескольких специфичных для цветков промоторов, обладающих характерными паттернами, позволило создать разные формы и окраски цветка торении без фенотипических изменений других органов [73].

Из цикламена впервые были выделены восемь промоторов, активных в лепестках. Это промоторы MADS-бокс гомеотических генов *API*, *AP3A*, *AP3B*, *PI (pistillata)*, *SEP2 (sepallata)*, а также *CHS*, *DFR* и *O*-метилтрансферазы (*OMT*), участвующих в синтезе антоцианов [74]. Каждый из этих промоторов был использован для контроля экспрессии химерных репрессоров *AtTCP3-RD*, *CpTCP1B-RD*, *AtSEP3-RD*, *CpSEP3-RD* у торении. Наиболее интересные изменения были связаны с тремя конструкциями. Экспрессия *CpCHS:AtSEP3-RD* придавала лепесткам голубоватый цвет. Изогнутые вниз лепестки торений, экспрессирующих *CpDFR:CpTCP1B-RD*, были следствием более быстрой пролиферации клеток на верхней стороне лепестка по сравнению с нижней. У торений с конструкцией *CpAP3B:CpTCP1B-RD* формировались зазубренные лепестки. У торений, экспрессирующих репрессор *CpTCP1B-RD* под контролем конститутивного промотора CaMV35S, зазубренность наблюдалась не только на лепестках, но и на листьях и сопровождалась чрезмерным ветвлением сосудов [74]. Предложенные генетические конструкции и полученные фенотипические изменения будут полезны для селекции декоративных цветов.

Промотор гена *CHS* горечавки трехцветковой (*Gentiana triflora*) активен по краям цветков петунии в местах наибольшего накопления антоциана. В последовательности промотора *GtCHS1* присутствуют сайты связывания транскрипционного фактора MYB, регулирующего гены биосинтеза антоциана [75].

Ирисы (*Iris germanica*) с темно-розовой и красной окраской цветка не встречаются в природе. Чтобы получить подобную окраску, розовые ирисы сорта Fire Bride были трансформированы бактериальным геном фитоен-синтазы (*crtB*) под контролем промотора капсантин-капсорубин синтазы (CCS) тигровой лилии (*L. lancifolium*) с целью повышения уровня каротиноида ликопена [76]. У лилий ген *CCS* обеспечивает оранжевую окраску цветков. У ирисов экспрессия LICCS:*crtB* наблю-

дается в околоцветнике, тычинках, завязи, цветоножке. Однако, видимые изменения окраски затронули лишь пыльники, завязь и цветоножку, но не околоцветник. Промотор LICCS может быть с успехом использован для изменения окраски определенных частей цветка ириса.

Ген *OgCHRC* из гибридной орхидеи (*Oncidium Gower Ramsey*) экспрессируется преимущественно в цветках, где специфический для хромостов белок CHRC обеспечивает накопление каротиноидов в мембранах пластид [77]. Активность промотора *OgCHRC* возрастает по мере развития бутонов орхидеи [77]. Нижний лепесток цветка орхидеи называется губа (лабеллум). Он служит для привлечения насекомых-опылителей и выполняет роль "посадочной площадки". Конические клетки, которые расположены на верхней стороне губы, помогают насекомым удерживаться на поверхности. Гистохимический анализ активности GUS при использовании промотора *OgCHRC* показал, что окрашивание локализуется именно в конических клетках верхнего эпидермиса. Методом транзientной экспрессии показано, что промотор имеет низкую активность (при его использовании уровень активности репортерного белка GUS не превышал 0.5 нМ МУ/мин/мг) в лепестках двудольных растений: роз, гвоздик и хризантем. В лепестках лилии и орхидеи активность GUS при использовании промотора *OgCHRC* составила 2 нМ МУ/мин/мг, что было в 2–3 раза ниже, чем при использовании промотора CaMV35S [77]. Изучение формирования желтой окраски губы орхидеи сорта Gower Ramsey показало, что несмотря на присутствие в ее геноме генов транскрипционного фактора *OgMYB1* и четырех участвующих в биосинтезе антоциана ферментов: *OgCHS*, халкон-изомеразы (*OgCHI*), *OgDFR* и *OgANS*, сам пигмент не накапливается. Эти гены активны во время развития цветка, но экспрессия трех из них: *OgMYB1*, *OgCHI* и *OgDFR*, специфически подавлена в тканях желтой губы. Транзientная экспрессия генов *OgMYB1*, *OgCHI* и *OgDFR* под контролем промотора *OgCHRC* приводит к восстановлению синтеза антоциана в желтой губе орхидеи [78].

Промоторы *MdMYB10-R6*, *CmCCD4a-5*, *LoCHS*, *OCS-PhCHSA*, *NtANS*, *CmF3H*, *DgUEP1*, *TfDEF*, *TfDFR*, *TfF3H*, *GtCHS*, *CpCHS*, *CpDFR*, *CpAP3B*, *AtAP1*, *LICCS*, *OgCHRC* могут быть использованы для улучшения формы и окраски цветков.

Пыльца

Ген *END1 (endothecium1)* из гороха (*Pisum sativum*) экспрессируется в клетках-предшественниках пыльцевых зерен [79]. Ген цитотоксической рибонуклеазы (*barnase*) из *Bacillus amyloliquifaciens* был помещен под контроль промотора

PsEND1. Конструкция PsEND1:*barnase* была использована для получения растений пеларгонии и каланхоэ с мужской стерильностью, которая возникала за счет разрушения клеток пыльца на самых ранних стадиях их развития [44, 80].

Промоторы LIGC1 из лилии (*L. longiflorum*) и AmDEFH125 из львиного зева (*Antirrhinum majus*) обеспечивают экспрессию репортерного гена *uidA* в пыльце при гомологичной экспрессии, а промотор AmDEFH125 – и в пыльце арабидопсиса [81, 82].

Ген *PR10g* лилии (*L. longiflorum*) экспрессируется в тапетуме пыльников и в микроспорах. Специфическая активность промотора LIPR10g в пыльниках арабидопсиса обеспечивается фрагментом от –1183 до –880 п.н. относительно старта транскрипции [83]. Трансгенные растения, несущие конструкцию LIPR10g:*barnase*, были полностью стерильны из-за нарушений в тапетуме и деформации микроспор. Промотор LIPR10g имеет большую перспективу использования в биотехнологии и сельском хозяйстве.

Ген *LIA1271*, экспрессирующийся в пыльниках лилии, был помещен под контроль тапетум-специфичного промотора риса OsRTS [84]. Использование этой генетической конструкции позволило установить, что белок *LIA1271* влияет на структуру наружной оболочки пыльцевых зерен лилии. Промотор гена *LlgH2A* гистона из лилии при экспрессии в табаке (*N. tabacum*) активен исключительно в генеративных клетках пыльца [85]. Активность промотора LlgH2A не обнаруживается в вегетативных клетках пыльца или в других органах. Характер тканевой специфичности промотора в табаке полностью совпадает с паттерном экспрессии мРНК гена *gH2A* в лилии. Аналогичные механизмы активации промотора гена *gH2A* у лилии и табака позволяют говорить о существовании схожих механизмов регуляции гаметофит-специфической активности генов у однопольных и двупольных растений.

Промоторы PsEND1, LIGC1, AmDEFH125, LIPR10g и LlgH2A могут быть использованы для получения растений с мужской стерильностью.

Трихомы

Трихомы играют важную роль в адаптации растений к условиям окружающей среды [86]. Железистые трихомы способны синтезировать и секретировать разнообразные вторичные метаболиты. Нежелезистые трихомы ограничивают доступ насекомых к поверхности растения, защищают от ультрафиолета и потери влаги.

У лаванды (*Lavandula angustifolia*) эфирное масло синтезируется преимущественно в железистых трихомах соцветий [87]. Был клонирован промотор гена линалоол-синтазы (LIS) из лаван-

ды (*Lavandula angustifolia*), который может быть использован для функционального анализа генов синтеза терпеноида линалоола, являющегося компонентом эфирного масла [88]. Промотор LIS из кларкии (*Clarkia breweri*) был использован для подавления экспрессии гена изоэвгенол-синтазы методом РНК-интерференции с целью изучения механизмов формирования запахов у разных видов петуний [89]. Хризантемол-синтаза является ключевым ферментом биосинтеза натурального пестицида пиретрина, который накапливается в цветках пиретрума (*Tanacetum cinerariifolium*). Промотор TcCHS хризантемол-синтазы пиретрума экспрессируется в железистых трихомах в хризантеме (*C. morifolium*) и табаке (*N. tabacum*) [90]. Участок промотора халкон-синтазы петунии PhCHSA от –899 до –530 п.н. определяет специфическую экспрессию *uidA* в трихомах чашелистиков и в проростках петунии [66]. Трихом-специфичные промоторы необходимы в генетической инженерии вторичных метаболитов для исключения возможности их неблагоприятного воздействия на рост и развитие растений.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ РАЗВИТИЯ

Лилии *L. formosanum* и *L. oriental* имеют контрастную форму листьев на стадии розетки. Было показано, что гетерофилия (разнолистность) у лилий связана с различным уровнем экспрессии генов *LoNCED3* и *LfNCED3*, который обеспечивается различной активностью их промоторов и коррелирует с разным уровнем АБК [39]. Промотор *LoNCED3* более активен, чем промотор *LfNCED3*, и это обусловлено присутствием в промоторе *LfNCED3 E2F*-подобного негативного регуляторного элемента. Разный уровень активности промоторов *LoNCED3* и *LfNCED3* может иметь адаптивное значение для обитания лилий в их естественной среде. Различия в активности промоторов *LoNCED3* и *LfNCED3* сохраняются при гетерологичной экспрессии в эпидермальных клетках лука (*Allium cepa*) и в арабидопсисе [39]. Исследование промоторов генов *NCED3* позволило расширить представления о молекулярных механизмах формообразования у растений.

Белки экспансины участвуют в реорганизации клеточной стенки, влияя на размер клеток и рост растений [91, 92]. Устойчивость к засухе и засолению трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих ген *RhEXPA4* экспансина розы под контролем CaMV35S, сопровождалась изменением роста листьев, корней и снижением семенной продуктивности [92]. В зонах активного роста трансгенных растений арабидопсиса, несущих конструкцию *RhEXPA4:uidA*, активность промотора *RhEXPA4* возрастала после действия соли, засухи и абсцизовой кислоты [92]. Для понимания регуляции гена *PhEXPA1* экспансина А1

петунии активность его промотора была исследована в трансгенных петуниях [93]. Активность GUS присутствует в лепестках, чашелистиках, семяпочках, столбике и рыльце пестика, но не в пыльниках, что совпадает с районами растяжения клеток в процессе развития органов. Обнаружение окрашивания GUS в пазушных меристемах свидетельствует о том, что PhEXPA1 участвует в инициации элонгации стебля и роста пазушных почек. Изучение активности промотора предполагает участие PhEXPA1 в балансировании поддержания меристемы и инициации органов.

Растяжение тканей, во многом определяющее размер цветка гладиолуса, регулируется чувствительным к гиббереллину A3 промотором гена *GgEXPA1* экспансины гладиолуса [94]. Промотор *GgEXPA1* имеет высокую активность в молодых околоцветниках гладиолуса, а также в этиолированных гипокотилых и расширяющихся на свету семядолях арабидопсиса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование генно-инженерных технологий для модификаций декоративных растений позволяет продемонстрировать широкий спектр существующих технологических возможностей. В данном обзоре мы постарались суммировать информацию о промоторах, их специфической активности и примерах использования. Уже получены первые результаты использования системы CRISPR/Cas9 для редактирования генов у дендробиума (*Dendrobium officinale*), лотоса (*Lotus japonicus*), хризантемы, ипомеи, петунии [26, 95–99]. Показано, что минимальные изменения в последовательности нативного промотора могут приводить к повышению экспрессии гена [100], изменению расположения пигментных пятен на лепестках [101]. Таким образом, в будущем геномное редактирование промоторных районов растений может приводить к успешным и предсказуемым изменениям в экспрессии природных генов [4]. Разнообразие промоторов, способных регулировать работу целевых генов определенным образом, позволяет понять механизмы многих протекающих в клетке процессов, а также является важнейшим инструментом для решения разнообразных задач биотехнологии декоративных растений.

Авторы выражают благодарность рецензентам за внимательное прочтение рукописи и критические замечания.

Работа поддержана бюджетным проектом № 0324-2019-0039.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Azadi P., Bagheri H., Naloussi A.M., Nazari F., Chandler S.F. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants // *Bio-technol. Adv.* 2016. V. 34. P. 1073–1090.
2. Noman A., Aqeel M., Deng J., Khalid N., Sanaullah T., Shuilin H. Biotechnological advancements for improving floral attributes in ornamental plants // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 530. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00530>
3. Hernandez-Garcia C., Finer J.J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements // *Plant Sci.* 2014. V. 217–218. P. 109–119.
4. Pandiarajan R., Grover A. *In vivo* promoter engineering in plants: Are we ready? // *Plant Sci.* 2018. V. 277. P. 132–138.
5. Rose A.B., Emami S., Bradnam K., Korff I. Evidence for a DNA-based mechanism of intron-mediated enhancement // *Front. Plant Sci.* 2011. V. 2. P. 98. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00098>
6. Gallegos J.E., Rose A.B. The enduring mystery of intron-mediated enhancement // *Plant Sci.* 2015. V. 237. P. 8–15.
7. Grant T.N., De La Torre C.M., Zhang N., Finer J.J. Synthetic introns help identify sequences in the 5' UTR intron of the *Glycine max* polyubiquitin (Gmubi) promoter that give increased promoter activity // *Planta.* 2017. V. 245. P. 849–860.
8. Matsumoto T.K., Keith L.M., Cabos R.Y., Suzuki J.Y., Gonsalves D., Thilmony R. Screening promoters for *Anthurium* transformation using transient expression // *Plant Cell Rep.* 2013. V. 32. P. 443–451.
9. Wilmink A., van de Ven B.C.E., Dons J.J.M. Activity of constitutive promoters in various species from the *Liliaceae* // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 28. P. 949–955.
10. Kamo K., Kim A.Y., Park S.H., Joung Y.H. The 5'UTR-intron of the *Gladiolus* polyubiquitin promoter *GUBQ1* enhances translation efficiency in *Gladiolus* and *Arabidopsis* // *BMC Plant Biol.* 2012. V. 12. P. 79. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-79>
11. Peremarti A., Twyman R.M., Gómez-Galera S. Promoter diversity in multigene transformation // *Plant Mol. Biol.* 2010. V. 73. P. 363–378.
12. Смирнова О.Г., Кочетов А.В. Промоторы пшеницы для экспрессии трансгенов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16. С. 224–231.
13. Dutt M., Dhekney S.A., Soriano L., Kandel R., Grosser J.W. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops // *Hortic. Res.* 2014. V. 1. P. 14047. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.47>
14. Смирнова О.Г., Кочетов А.В. Промоторы генов растений, участвующих в защите от патогенов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. С. 765–775.
15. Nuccio M.L. A brief history of promoter development for use in transgenic maize applications // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1676. P. 61–93.
16. 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.

17. Wen Z., Yang Y., Zhang J., Wang X., Singer S., Liu Z., Yang Y., Yan G., Liu Z. Highly interactive nature of flower-specific enhancers and promoters, and its potential impact on tissue-specific expression and engineering of multiple genes or agronomic traits // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 951–962.
18. Dalal J. Simultaneous analysis of multiple promoters: an application of the PC-GW binary vector series // *Plant synthetic promoters. Methods in Molecular Biology* / Hehl R. (Ed.). Humana Press, NY. 2016. V. 1482. P. 189–218.
19. Ganguly M., Roychoudhury A., Sarkar S.N., Sengupta D.N., Datta S.K., Datta K. Inducibility of three salinity/abscisic acid-regulated promoters in transgenic rice with *gusA* reporter gene // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 1617–1625.
20. Ge H., Li X., Chen S., Zhang M., Liu Z., Wang J., Li X., Yang Y. The Expression of *CARK1* or *RCAR11* driven by synthetic promoters increases drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19: e1945.
<https://doi.org/10.3390/ijms19071945>
21. Kamo K., Jordan R., Guaragna M.A., Hsu H.T., Ueng P. Resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Gladiolus* plants transformed with either a defective replicase or coat protein subgroup II gene from *Cucumber mosaic virus* // *Plant Cell Rep.* 2010. V. 29. P. 695–704.
22. Azadi P., Otang N.V., Supaporn H., Khan R.S., Chin D.P., Nakamura I., Mii M. Increased resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in *Lilium* transformed with a defective CMV replicase gene // *Biotechnol. Lett.* 2011. V. 33. P. 1249–1255.
23. Sun D., Zhang X., Li S., Jiang C.Z., Zhang Y., Niu L. LrABC1F1, a GCN-type ATP-binding cassette transporter from *Lilium regale*, is involved in defense responses against viral and fungal pathogens // *Planta.* 2016. V. 244. P. 1185–1199.
24. Núñez de Cáceres González F.F., Davey M.R., Cancho Sanchez E., Wilson Z.A. Conferred resistance to *Botrytis cinerea* in *Lilium* by overexpression of the *RCH10* chitinase gene // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. P. 1201–1209.
25. Vieira P., Wantoch S., Lilley C.J., Chitwood D.J., Atkinson H.J., Kamo K. Expression of a cystatin transgene can confer resistance to root lesion nematodes in *Lilium longiflorum* cv. 'Nellie White' // *Transgenic Res.* 2015. V. 24. P. 421–432.
26. Kui L., Chen H., Zhang W., He S., Xiong Z., Zhang Y., Yan L., Zhong C., He F., Chen J., Zeng P., Zhang G., Yang S., Dong Y., Wang W., Cai J. Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the Orchid, *Dendrobium officinale* // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 7. P. 2036.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02036>
27. Kamo K., Aebig J., Guaragna M.A., James C., Hsu H.T., Jordan R. *Gladiolus* plants transformed with single-chain variable fragment antibodies to cucumber mosaic virus // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2012. V. 110. P. 13–21.
28. Joung Y.H., Kamo K. Expression of a polyubiquitin promoter isolated from *Gladiolus* // *Plant Cell Rep.* 2006. V. 25. P. 1081–1088.
29. Kamo K., Joung Y.H., Green K. GUS expression in *Gladiolus* plants controlled by two *Gladiolus* ubiquitin promoters // *Floriculture Ornamental Biotechnol.* 2009. V. 3. P. 10–14.
30. Petty L.M., Pharberd N., Carré I.A., Thomas B., Jackson S.D. Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response // *Plant Science.* 2003. V. 164. P. 175–182.
31. Lütken H., Jensen L.S., Topp S.H., Mibus H., Müller R., Rasmussen S.K. Production of compact plants by overexpression of *AtSH1* in the ornamental *Kalanchoë* // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 211–222.
32. Hong J.K., Suh E.J., Kwon S.-J., Lee S.B., Kim J.A., Lee S.I., Lee Y.-H. Promoter of chrysanthemum actin confers high-level constitutive gene expression in *Arabidopsis* and chrysanthemum // *Sci. Hortic.* 2016. V. 211. P. 8–18.
33. Annadana S., Mlynárová L., Udayakumar M., de Jong J. The potato *Lhca3.St.1* promoter confers high and stable transgene expression in chrysanthemum, in contrast to CaMV-based promoters // *Mol. Breed.* 2001. V. 8. P. 335–344.
34. Aida R., Ohira K., Tanaka Y., Kishimoto S., Shibata M., Ohmiya A. Efficient transgene expression in chrysanthemum, *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura, by using the promoter of a gene for chrysanthemum chlorophyll-a/b-binding protein // *Breed. Sci.* 2004. V. 54. P. 51–58.
35. Outchkourov N.S., Peters J., de Jong J., Rademakers W., Jongsma M.A. The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants // *Planta* 2003. V. 216. P. 1003–1012.
36. Aida R., Nagaya S., Yoshida K., Kishimoto S., Shibata M., Ohmiya A. Efficient transgene expression in chrysanthemum, *Chrysanthemum morifolium* Ramat., with the promoter of a gene for tobacco elongation factor 1 α protein // *JARQ.* 2005. V. 39. P. 269–274.
37. Hong B., Tong Z., Ma C., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki K., Gao J. Heterologous expression of the *AtDREB1A* gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance // *Sci. China C. Life Sci.* 2006. V. 49. P. 436–445.
38. Sakamoto H., Maruyama K., Sakuma Y., Meshi T., Iwabuchi M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 2734–2746.
39. Chen H.C., Hwang S.G., Chen S.M., Shii C.T., Cheng W.H. ABA-mediated heterophylly is regulated by differential expression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 in lilies // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. P. 1806–1821.
40. Clark D.G., Dervinis C., Barrett J.E., Klee H., Jones M. Drought-induced leaf senescence and horticultural performance of transgenic *PSAG12-IPT* petunias // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2004. V. 129. P. 93–99.
41. Khodakovskaya M., Li Y., Li J., Vankova R., Malbeck J., McAvoy R. Effects of *cor15a-IPT* gene expression on leaf senescence in transgenic *Petunia x hybrida* and *Dendranthema x grandiflorum* // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 1165–1175.

42. *Bhuiyan N.H., Hamada A., Yamada N., Rai V., Hibino T., Takabe T.* Regulation of betaine synthesis by precursor supply and choline monooxygenase expression in *Amaranthus tricolor* // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 4203–4212.
43. *Chang H., Jones M.L., Banowitz G.M., Clark D.G.* Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with *P(SAG12)-IPT* delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 2174–2183.
44. *García-Sogo B., Pineda B., Roque E., Antón T., Atarés A., Borja M., Beltrán J.P., Moreno V., Cañas L.A.* Production of engineered long-life and male sterile *Pelargonium* plants // *BMC Plant Biol.* 2012. V. 12. P. 156. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-156>
45. *Lai Q.X., Bao Z.Y., Zhu Z.J., Qian Q.Q., Mao B.Z.* Effects of osmotic stress on antioxidant enzymes activities in leaf discs of *PSAG12-IPT* modified gerbera // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2007. V. 8. P. 458–464.
46. *Zakizadeh H., Lütken H., Sriskandarajah S., Serek M., Müller R.* Transformation of miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. 'Linda') with *P(SAG12)-ipt* gene delays leaf senescence and enhances resistance to exogenous ethylene // *Plant Cell Rep.* 2013. V. 32. P. 195–205.
47. *Faiss M., Zalubilová J., Strnad M., Schmülling T.* Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants // *Plant J.* 1997. V. 12. P. 401–415.
48. *Zeng X.F., Zhao D.G.* Expression of *IPT* in *Asakurasanshoo* (*Zanthoxylum piperitum* (L.) DC. f. *inermis* Makino) alters tree architecture, delays leaf senescence, and changes leaf essential oil composition // *Plant Mol. Biol. Report.* 2016. V. 34. P. 649–658.
49. *Xu X., Jiang C.Z., Donnelly L., Reid M.S.* Functional analysis of a RING domain ankyrin repeat protein that is highly expressed during flower senescence // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 3623–3630.
50. *Gubrium E.K., Clevenger D.J., Clark D.G., Barrett J.E., Nell T.A.* Reproduction and horticultural performance of transgenic ethylene insensitive petunias // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2000. V. 125. P. 277–281.
51. *Bovy A.G., Angenent G.C., Dons H.J.M., van Altvorst A.C.* Heterologous expression of the *Arabidopsis etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers // *Mol. Breed.* 1999. V. 5. P. 301–308.
52. *Sanikhani M., Mibus H., Stummann B.M., Serek M.* *Kalanchoe blossfeldiana* plants expressing the *Arabidopsis etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity // *Plant Cell Rep.* 2008. V. 27. P. 729–737.
53. *Baker S.S., Wilhelm K.S., Thomashow M.F.* The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 24. P. 701–713.
54. *Imai A., Takahashi S., Nakayama K., Satoh H.* The promoter of the carotenoid cleavage dioxygenase 4a-5 gene of *Chrysanthemum morifolium* (*CmCCD4a-5*) drives petal-specific transcription of a conjugated gene in the developing flower // *J. Plant Physiol.* 2013. V. 170. P. 1295–1299.
55. *Liu Y., Lou Q., Xu W., Xin Y., Bassett C., Wang Y.* Characterization of a chalcone synthase (*CHS*) flower-specific promoter from *Lilium orientalis* 'Sorbonne' // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 2187–2194.
56. *Kim D.H., Park S., Lee J.Y., Ha S.H., Lim S.H.* Enhancing flower color through simultaneous expression of the B-peru and mPAP1 transcription factors under control of a flower-specific promoter // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. e309. <https://doi.org/10.3390/ijms19010309>
57. *Azuma M., Morimoto R., Hirose M., Morita Y., Hoshino A., Iida S., Oshima Y., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Shiratake K.* A petal-specific *InMYB1* promoter from Japanese morning glory: A useful tool for molecular breeding of floricultural crops // *Plant Biotechnol. J.* 2016. V. 14. P. 354–363.
58. *Boase M., Brendolise C., Wang L., Ngo H., Espley R., Hellens R., Schwinn K.E., Davies K.M., Albert N.W.* Failure to launch: the self-regulating *Md-MYB10 R6* gene from apple is active in flowers but not leaves of *Petunia* // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. P. 1817–1823.
59. *Brendolise C., Espley R.V., Lin-Wang K., Laing W., Peng Y., McGhie T., Dejnopratt S., Tomes S., Hellens R.P., Allan A.C.* Multiple copies of a simple MYB-binding site confers trans-regulation by specific flavonoid-related R2R3 MYBs in diverse species // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1864. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01864>
60. *Lim S.H., Sohn S.H., Kim D.H., Kim J.K., Lee J.Y., Kim Y.M., Ha S.H.* Use of an anthocyanin production phenotype as a visible selection marker system in transgenic tobacco plant // *Plant Biotechnol. Rep.* 2012. V. 6. P. 203–211.
61. *Katsumoto Y., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Brugliera F., Holton T.A., Karan M., Nakamura N., Yonekura-Sakakibara K., Togami J., Pigeaire A., Tao G.Q., Nehra N.S., Lu C.Y., Dyson B.K., Tsuda S., et al.* Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 1589–1600.
62. *Takatsu Y., Hayashi M., Sakuma F.* Transgene inactivation in *Agrobacterium*-mediated chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) transformants // *Plant Biotechnol.* 2000. V. 17. P. 241–245.
63. *Noda N., Aida R., Kishimoto S., Ishiguro K., Fukuchi-Mizutani M., Tanaka Y., Ohmiya A.* Genetic engineering of novel blue-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins // *Plant Cell Physiol.* 2013. V. 54. P. 1684–1695.
64. *Brugliera F., Tao G.Q., Tems U., Kalc G., Mouradova E., Price K., Stevenson K., Nakamura N., Stacey I., Katsumoto Y., Tanaka Y., Mason J.G.* Violet/blue chrysanthemums-metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors // *Plant Cell Physiol.* 2013. V. 54. P. 1696–1710.
65. *Noda N., Yoshioka S., Kishimoto S., Nakayama M., Douzono M., Tanaka Y., Aida R.* Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism // *Sci. Adv.* 2017. V. 3: e1602785. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602785>
66. *van der Meer I.M., Brouwer M., Spelt C.E., Mol J.N., Stuitje A.R.* The TACPAT repeats in the chalcone synthase promoter of *Petunia hybrida* act as a dominant negative *cis*-acting module in the control of organ-specific expression // *Plant J.* 1992. V. 2. P. 525–535.

67. Du L., Lou Q., Zhang X., Jiao S., Liu Y., Wang Y. Construction of flower-specific chimeric promoters and analysis of their activities in transgenic *Torenia* // Plant Mol. Biol. Rep. 2014. V. 32. P. 234–245.
68. Nishihara M., Shimoda T., Nakatsuka T., Arimura G. Frontiers of torenia research: innovative ornamental traits and study of ecological interaction networks through genetic engineering // Plant Methods. 2013. V. 9. P. 23.
<https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-23>
69. Annadana S., Beekwilder M.J., Kuipers G., Visser P.B., Outchkourov N., Pereira A., Udayakumar M., De Jong J., Jongsma M.A. Cloning of the chrysanthemum *UEP1* promoter and comparative expression in florets and leaves of *Dendranthema grandiflora* // Transgenic Res. 2002. V. 11. P. 437–445.
70. Sasaki K., Yamaguchi H., Narumi T., Shikat M., Oshima Y., Nakata M., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Ohtsubo N. Utilization of a floral organ-expressing *API* promoter for generation of new floral traits in *Torenia fournieri* Lind // Plant Biotechnol. 2011. V. 28. P. 181–188.
71. Tanaka Y., Oshima Y., Yamamura T., Sugiyama M., Mitsuda N., Ohtsubo N., Ohme-Takagi M., Terakawa T. Multi-petal cyclamen flowers produced by AGAMOUS chimeric repressor expression // Sci. Rep. 2013. V. 3. P. 2641.
<https://doi.org/10.1038/srep02641>
72. Narumi T., Aida R., Koyama T., Yamaguchi H., Sasaki K., Shikata M., Nakayama M., Ohme-Takagi M., Ohtsubo N. *Arabidopsis* chimeric TCP3 repressor produces novel floral traits in *Torenia fournieri* and *Chrysanthemum morifolium* // Plant Biotechnol. 2011. V. 28. P. 131–140.
73. Sasaki K., Yamaguchi H., Kasajima I., Narumi T., Ohtsubo N. Generation of novel floral traits using a combination of floral organ-specific promoters and a chimeric repressor in *Torenia fournieri* Lind // Plant Cell Physiol. 2016. V. 57. P. 1319–1331.
74. Kasajima I., Ohtsubo N., Sasaki K. Combination of *Cyclamen persicum* Mill. floral gene promoters and chimeric repressors for the modification of ornamental traits in *Torenia fournieri* Lind // Hort. Res. 2017. V. 4. P. 17008.
<https://doi.org/10.1038/hortres.2017.8>
75. Kobayashi H., Oikawa Y., Koiwa H., Yamamura S. Flower-specific gene expression directed by the promoter of a chalcone synthase gene from *Gentiana triflora* in *Petunia hybrida* // Plant Sci. 1998. V. 131. P. 173–180.
76. Jeknić Z., Jeknić S., Jevremović S., Subotić A., Chen T.H. Alteration of flower color in *Iris germanica* L. 'Fire Bride' through ectopic expression of phytoene synthase gene (*crtB*) from *Pantoea agglomerans* // Plant Cell Rep. 2014. V. 33. P. 1307–1321.
77. Chiou C.Y., Wu K., Yeh K.W. Characterization and promoter activity of chromoplast specific carotenoid associated gene (*CHRC*) from *Oncidium* Gower Ramsey // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. P. 1861–1866.
78. Chiou C.Y., Yeh K.W. Differential expression of MYB gene (*OgMYB1*) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium* Gower Ramsey // Plant Mol. Biol. 2008. V. 66. P. 379–388.
79. Gómez M.D., Beltrán J.P., Cañas L.A. The pea *END1* promoter drives anther-specific gene expression in different plant species // Planta. 2004. V. 219. P. 967–981.
80. García-Sogo B., Pineda B., Castelblanque L., Antón T., Medina M., Roque E., Torresi C., Beltrán J.P., Moreno V., Cañas L.A. Efficient transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* and production of male-sterile plants by engineered anther ablation // Plant Cell Rep. 2010. V. 29. P. 61–77.
81. Singh M., Bhalla P.L., Xu H., Singh M.B. Isolation and characterization of a flowering plant male gametic cell-specific promoter // FEBS Lett. 2003. V. 542. P. 47–52.
82. Lauri A., Xing S., Heidmann I., Saedler H., Zachgo S. The pollen-specific *DEFH125* promoter from *Antirrhinum* is bound *in vivo* by the MADS-box proteins DEFICIENS and GLOBOSA // Planta. 2006. V. 224. P. 61–71.
83. Hsu S.W., Liu M.C., Zen K.C., Wang C.S. Identification of the tapetum/microspore-specific promoter of the pathogenesis-related 10 genes and its regulation in the anther of *Lilium longiflorum* // Plant Sci. 2014. V. 215–216. P. 124–133.
84. Liu M.C., Yang C.S., Yeh F.L., Wei C.H., Jane W.N., Chung M.C., Wang C.S. A novel lily anther-specific gene encodes adhesion-like proteins associated with exine formation during anther development // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 2023–2037.
85. Ueda K., Ono M., Iwashita J., Wabiko H., Inoue M. Generative cell-specific activation of the histone *gH2A* gene promoter of *Lilium longiflorum* in tobacco // Sex. Plant Reprod. 2012. V. 25. P. 247–255.
86. Tissier A. Trichome specific expression: promoters and their applications // Transgenic plants - advances and limitations / Ph.D. Yelda Ozden Çiftçi (Ed.). InTech, 2012. P. 353–378.
87. Guitton Y., Nicole F., Moja S., Valot N., Legrand S., Jullien F., Legendre L. Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development // Physiol. Plantarum. 2010. V. 138. P. 150–163.
88. Biswas K.K., Foster A.J., Aung T., Mahmoud S.S. Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants // Acta Physiol. Plant. 2009. V. 31. P. 13–19.
89. Koeduka T., Orlova I., Baiga T.J., Noel J.P., Dudareva N., Pichersky E. The lack of floral synthesis and emission of isoeugenol in *Petunia axillaris* subsp. *parodii* is due to a mutation in the *isoeugenol synthase* gene // Plant J. 2009. V. 58. P. 961–969.
90. Sultana S., Hu H., Gao L., Mao J., Luo J., Jongsma M.A., Wang C. Molecular cloning and characterization of the trichome specific chrysanthemyl diphosphate/chrysanthemol synthase promoter from *Tanacetum cinerariifolium* // Sci. Hort. 2015. V. 185. P. 193–199.
91. Sampedro J., Cosgrove D.J. The expansin superfamily // Genome Biol. 2005. V. 6. P. 242.
<https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-12-242>
92. Lü P., Kang M., Jiang X., Dai F., Gao J., Zhang C. *Rh-EXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis* // Planta. 2013. V. 237. P. 1547–1559.
93. Zenoni S., Fasoli M., Tornielli G.B., Dal Santo S., Sanson A., de Groot P., Sordo S., Citterio S., Monti F., Pezzotti M. Overexpression of *PhEXPA1* increases cell size,

- modifies cell wall polymer composition and affects the timing of axillary meristem development in *Petunia hybrid* // *New Phytol.* 2011. V. 191. P. 662–677.
94. Azeez A., Sane A.P., Tripathi S.K., Bhatnagar D., Nath P. The gladiolus GgEXPA1 is a GA-responsive alpha-expansin gene expressed ubiquitously during expansion of all floral tissues and leaves but repressed during organ senescence // *Postharvest Biol. Technol.* 2010. V. 58. P. 48–56.
95. Wang L., Wang L., Tan Q., Fan Q., Zhu H., Hong Z., Zhang Z., Duanmu D. Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in *Lotus japonicas* using CRISPR-Cas9 // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 1333.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01333>
96. Kishi-Kaboshi M., Aida R., Sasaki K. Generation of gene-edited *Chrysanthemum morifolium* using multi-copy transgenes as targets and markers // *Plant Cell Physiol.* 2017. V. 58. P. 216–226.
97. Watanabe K., Kobayashi A., Endo M., Sage-Ono K., Toki S., Ono M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B)* locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 10028.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10715-1>
98. Shibuya K., Watanabe K., Ono M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *EPHEMERAL1* locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 131. P. 53–57.
99. Kishi-Kaboshi M., Aida R., Sasaki K. Genome engineering in ornamental plants: Current status and future prospects // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 131. P. 47–52.
100. Zhang N., McHale L.K., Finer J.J. Changes to the core and flanking sequences of G-box elements lead to increases and decreases in gene expression in both native and synthetic soybean promoters // *Plant Biotechnol. J.* 2018.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13010>
101. Jiang P., Rausher M. Two genetic changes in cis-regulatory elements caused evolution of petal spot position in *Clarkia* // *Nat. Plants.* 2018. V. 4. P. 14–22.