

Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas

Main promoters used in plant genetic transformation

Zoraya M De Guglielmo C*, Rafael Fernandez Da Silva **

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61529

Resumen

El conocimiento pleno de los promotores determina el éxito en la obtención de nuevos cultivares de plantas a través de técnicas biotecnológicas, ya que dicha secuencia del ADN regula la transcripción de otras regiones adyacentes o cercanas, encontrándose los siguientes promotores: constitutivos, tejido-específicos o estadio-específicos, inducibles y sintéticos. En esta revisión se resume de manera precisa los conceptos, ventajas y limitaciones de los distintos tipos de promotores, con ejemplos claros de ello.

Palabras clave: promotor, biotecnología vegetal, transcripción genética.

Abstract

Full knowledge of promoters determines success in obtaining new plant cultivars through biotechnology techniques. This DNA sequence regulates the transcription of adjacent or nearby regions, which are mainly constitutive, tissue-specific or stage-specific, inducible and synthetic. This review summarizes the precise concepts, advantages and limitations of different types of promoters, including clear examples of them.

Key words: promoter, plant biotechnology, gene transcription.

Recibido: febrero 10 de 2016

Aprobado: octubre 3 de 2016

Introducción

El desarrollo de nuevos cultivares que satisfagan las crecientes y diversas necesidades agroalimentarias y médico-farmacéuticas e industriales se fundamenta en la aplicación de técnicas biotecnológicas de avanzada, en particular la optimización de sistemas eficientes de transformación genética, donde la inserción de diferentes secuencias génicas de interés juega un papel preponderante. La expresión estable de dichos noveles genes en las plantas está determinado esencialmente por las secuencias promotoras (Porto *et al.*, 2014). En este sentido, en la regulación de la expresión genética intervienen “señales” que actúan sobre genes que codifican proteínas. Dentro de estas señales reguladoras, las llamadas moléculas *cis*-acting controlan la expresión de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) físicamente adyacentes y funcionales, mientras que las *trans*-acting influyen en la expresión de genes

distantes, incluso ubicados en cromosomas diferentes. Dicha regulación depende en gran medida de elementos reguladores conocidos como promotores (Potenza *et al.*, 2004). En los procedimientos de transformación genética vegetal es fundamental todo lo relacionado al control de expresión de transgenes en cultivos de importancia económica como el café (Fernández & Menéndez, 2002; Fernández *et al.*, 2010), de allí la importancia de estudiar y conocer la disponibilidad y funcionamiento de los distintos tipos de promotores genéticos vegetales, incluyendo ventajas, desventajas y limitaciones, el cual es el objetivo de la presente revisión.

Concepto de promotor

Se considera que los promotores son regiones reguladoras *cis*-acting que dirigen la transcripción de otras regiones adyacentes o cercanas al ácido ribonucleico

* PhD. Ciencias. Lab. Genética Molecular-Instituto de Oncología y Hematología-MPPS, Caracas. zdegugli@gmail.com

** PhD. Ciencias. Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología-Universidad de Carabobo, rafaelfer2103@hotmail.com

mensajero (ARNm), el cual es traducido en proteínas. Funcionalmente, un promotor es una secuencia de ADN localizada “upstream” o “aguas arriba” (hacia el extremo 5’ de la región codificante de un gen) que incluye las regiones de enlazamiento para factores de transcripción (Potenza *et al.*, 2004). Generalmente se asume que las secuencias promotoras se enlazan a la enzima ARN Polimerasa II, encargada de la producción del ARN. Sin embargo, existen secuencias de ADN dentro de una región promotora que actúan como sitios de unión para factores de transcripción *trans-acting* que pueden activar o inhibir la transcripción de un gen. Así, un promotor incluye distintos elementos estructurales que pueden tener interacciones funcionales complejas (Rodríguez & Chamberlin, 1982; NEPAD, 2010). Los promotores en general se dividen en dos regiones: una región central o núcleo del promotor y regiones de regulación aguas arriba. El núcleo del promotor consiste en una secuencia de 50-100 pb adyacente al sitio de iniciación que interactúa con la maquinaria de transcripción y asegura su inicio por la ARN polimerasa II; posee una caja TATA o caja de “Hogness” (secuencia consenso de ADN, rica en adenina y timina) y/o un elemento iniciador que se enlaza a elementos “*trans-acting*” y también puede mediar el inicio de la transcripción en algunos promotores que no tienen caja TATA (Dutt *et al.*, 2014).

Así, las partes de un promotor son las siguientes (Dutt *et al.*, 2014):

- 1) Promotor mínimo o núcleo del promotor: se localiza hasta 100 pares de bases “aguas arriba” y está constituido por la caja TATA (sitio de ensamblaje del complejo de iniciación por la ARN polimerasa II),
- 2) Secuencias reguladoras proximales (constituidas por las cajas CAAT y GC a las que se unen proteínas y factores de transcripción que facilitan el ensamblaje del complejo de iniciación) y
- 3) Secuencias reguladoras distales (se localizan a más de 100 pb “aguas arriba” del sitio de iniciación de la transcripción y regulan la actividad del núcleo del promotor) que son de dos tipos:
 - a) Intensificadores o “enhancer”, secuencias de acción *cis* que potencian la tasa de transcripción de los promotores que se encuentran en la misma molécula, a los que se unen factores de transcripción activadores;

- b) Silenciadores, inhibidores o “silencers”, secuencias de acción *cis* a las que se unen represores, inhibiendo a los activadores y reduciendo el nivel de transcripción (Rodríguez & Chamberlin, 1982).

Importancia del estudio de los promotores

El interés en los promotores radica en el potencial que ofrecen para regular y controlar la expresión de genes de interés en organismos silvestres y en aquellos modificados genéticamente. Actualmente son muy estudiados en procesos biotecnológicos, ya que no solo pueden incrementar la actividad transcripcional sino también proporcionar niveles adicionales de control, por ej., a nivel de la expresión tejido o estadio-específica de un gen (CAMBIA, 2003). Distintos investigadores profundizan en el estudio de las regiones promotoras, sus componentes e interacciones, así como en la búsqueda de nuevos promotores vegetales que dirijan altos niveles de expresión transgénica estable y hagan posible la introducción de múltiples transgenes en células vegetales eliminando, al mismo tiempo, el riesgo de silenciamiento genético dependiente de homología (Xiao *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2012). Este fenómeno se ha observado en numerosas plantas transgénicas y puede involucrar interacciones entre elementos repetitivos próximos ubicados en una molécula de ADN o secuencias homólogas en moléculas separadas, en posiciones alélicas o no alélicas (Jakowitsch *et al.*, 1999).

Tipos de promotores

Con base en el funcionamiento, tipo y nivel de expresión genética observado, los promotores usados en la Ingeniería Genética Vegetal se han clasificado en: constitutivos, tejido-específicos o estadio-específicos, inducibles y sintéticos. La escogencia del promotor usado en una construcción transgénica depende fundamentalmente de los objetivos del proyecto de ingeniería (Potenza *et al.*, 2004; Porto *et al.*, 2014).

1. Promotores constitutivos

Inducen la expresión de genes ubicados “downstream” o “aguas abajo” en todos o, al menos, en la mayoría de los tejidos del organismo, independientemente de factores ambientales o del estadio de desarrollo. Justamente, la principal ventaja de estos promotores es que generalmente promueven altos niveles de expresión



Figura 1. Representación esquemática de las secuencias de un promotor.

transgénica independiente del tejido o estadio, por lo que han sido ampliamente utilizados en la transformación de mono y dicotiledóneas, especialmente para la detección y/o selección de células o plantas transformadas (Park *et al.*, 2010). Los primeros promotores constitutivos usados para regular la expresión transgénica en plantas fueron aislados de patógenos vegetales, como los promotores de Opinas y el promotor CaMV35S aislado a comienzo de los años 80 del virus del mosaico del coliflor y usado ampliamente en sistemas transgénicos. Uno de sus derivados, el promotor CaMV19S, ha sido usado con menos frecuencia a pesar de tener una alta funcionalidad (CAMBIA, 2003). Otros promotores de origen viral con actividad similar o mejor al CaMV35S incluyen el promotor del virus del mosaico de la yuca CsVMV, el del virus de la hoja del cestrum amarillo, el del virus rayado de banana BSV y el promotor FMV-35S (“Figwort Mosaic Virus”) de un virus de coliflor relacionado con el CaMV35S; cabe mencionar que estos dos promotores son ampliamente utilizados en pruebas para la detección molecular de organismos modificados genéticamente (Sangers *et al.*, 1990; Schenk *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Dorries *et al.*, 2010; Dutt *et al.*, 2014).

Aunque estos promotores dirigen altos niveles de expresión transgénica en dicotiledóneas, su efectividad en monocotiledóneas, especialmente en cereales, es considerablemente menor, particularmente a largo plazo (Dahleen *et al.*, 2001; Dutt *et al.*, 2014). Al respecto, en algunas monocotiledóneas, como cereales, se ha encontrado que secuencias presentes en el extremo 5' de regiones transcritas no traducidas (intrones) de ciertos genes estructurales son esenciales para la eficiencia de la expresión genética. De esta manera, los promotores que funcionan bien en dicotiledóneas que carecen de tales intrones, generalmente no funcionan bien en monocotiledóneas (CAMBIA, 2003). Otras de las limitaciones de estos promotores es justamente el origen viral y la percepción del posible efecto negativo que pudiera implicar su uso en la transformación vegetal para la salud humana (Hull *et al.*, 2000); algunos investigadores han señalado que el silenciamiento de los transgenes pudiera ser menor al usar promotores constitutivos de origen vegetal (Potenza *et al.*, 2004). Así, la actividad de promotores derivados de monocotiledóneas es generalmente mayor o más eficiente en este grupo de plantas que en dicotiledóneas. Los más conocidos son los promotores de la Ubiquitina, proteína involucrada en diversos procesos celulares como la reparación del ADN y la estructura de la cromatina, y los promotores de actinas, componente fundamental del citoesqueleto vegetal. Destacan los promotores de Ubiquitina de maíz (*Ubi 1* y *Ubi 2*), identificados por A. Christensen, R Sahrrock y P Quail en 1992 y de *Nicotiana sylvestris* (*Ubi U4*) donde se han identificado dos elementos de acción *cis* que parecen ser críticos para la expresión genética (Plesse *et al.*, 2001).

El promotor de la actina de arroz (*Act 1*) fue identificado por Mc Elroy y colaboradores (1990) y es frecuentemente usado en sistemas de cereales; también se ha descrito el promotor *Act 2* de *Arabidopsis*. Existen elementos de choque térmico de la región reguladora del promotor *Ubi* que incrementan la expresión de la proteína ubiquitina en respuesta a estrés térmico, lo que le da carácter inducible, mientras que *Act 1*, a pesar de tener expresión constitutiva, tiene mayor actividad en la raíz, lo que le confiere cierto carácter tejido-específico (Dahleen *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2001; CAMBIA, 2003; Potenza *et al.*, 2004). Sin embargo, para monocotiledóneas no cereales la efectividad del promotor CaMV35S incrementa considerablemente cuando se le emplea duplicado (Kanno *et al.*, 2000). En este sentido, la duplicación de dicho promotor parece tener un efecto “enhancer” en la regulación de la expresión transgénica. A pesar de que el promotor CaMV35S es, al parecer, más fuerte que otros promotores constitutivos, los promotores *Act 1* y *Ubi 1* tienen la ventaja, desde el punto de vista de la bioseguridad, de ser de origen vegetal; algunos investigadores también han informado que, si bien el número de transformantes iniciales obtenidos con el promotor CaMV35S es más elevado que con el *Ubi 1* o el *Act 1*, con el primero pudiera ser igualmente mayor el eventual silenciamiento observado (Dahleen *et al.*, 2001).

A pesar de que los promotores constitutivos actúan en todos los tejidos, cada vez que se insertan genes regulados por este tipo de promotores se observan diferencias en cuanto a la especificidad para el tejido o el grado de expresión de los genes bajo su control. En consecuencia, aun cuando se activan los genes, no siempre se activan en el mismo grado en todos los tejidos en los distintos estadios de desarrollo (Rodríguez & Chamberlin, 1982). Por ej., el promotor *ZmUbi 1* es ampliamente usado en cultivos de monocotiledóneas debido a que dirige altos niveles de expresión en la mayoría de los tejidos de plantas jóvenes, pero estos niveles disminuyen marcadamente a medida que los tejidos maduran (Cornejo *et al.*, 1993). Así, el promotor se selecciona sobre la base de la especie vegetal, del gen que se quiere insertar y el tejido o la etapa del desarrollo en los cuales se va a expresar el gen, lo que a su vez se determina realizando pruebas donde varíen cada uno de los parámetros involucrados.

Los promotores CaMV35S, *Ubi* y *Act*, han sido utilizados en distintos protocolos:

Steinitz *et al.* (2002), transformaron algodón con el gen *cryIA(c)* (correspondiente a proteínas insecticidas de *Bacillus Thuringiensis*) bajo el control del promotor CaMV35S, al igual que Ahmad *et al.* (2002), en arroz.

Leroy *et al.* (2000), trabajando en transformación de café utilizaron este mismo promotor duplicado, con lo cual demostraron un efecto “enhancer” o intensificador en la regulación de la expresión del gen *csr1-1* aislado de *Arabidopsis thaliana*, el cual confiere resis-

tencia al herbicida clorosulfurón, usado como marcador de selección. También usaron el promotor *EF1 α* de *A. thaliana*, cuya eficiencia ya había sido probada por van Boxtel *et al.* (1995), junto con la secuencia “enhancer” o intensificadora Ω (secuencia líder no traducida en el extremo 5' del ARNm), derivada del virus del mosaico del tabaco. Sin embargo, la eficiencia de transformación fue mayor con el promotor *CaMV35S*. Este promotor también controló la expresión del gen reportero *gus* en la estandarización de los parámetros de transformación de café mediante biobalística (De Guglielmo *et al.*, 2010).

Sági *et al.* (1995), al transformar banano y plátano, estudiaron la regulación de varios promotores en la expresión del gen reportero *gus*, mediante ensayo histoquímico y fluorométrico. Los promotores utilizados fueron el *CaMV35S* duplicado, el *Emu* y el *Ubi*, de los cuales el último resultó ser más eficiente. Este promotor también ha sido asociado a altos niveles de expresión en otras monocotiledóneas tales como maíz, avena y caña de azúcar y, como ya se mencionó, tiene la ventaja sobre el *CaMV35S* de ser un promotor de origen vegetal.

Sardana *et al.* (1996), usaron de manera efectiva el promotor *Ubi 1* para lograr la expresión de toxinas *cryIA* en endospermo de maíz, como modelo de monocotiledóneas. Estos autores realizaron pruebas usando el promotor *CaMV35S* y obtuvieron mayor expresión con el primero que con el segundo, lo cual era de esperarse considerando que dicho promotor actuaba en su tejido materno. La expresión también fue mayor al utilizar toxinas sintéticas con mayor porcentaje G+C y de esta manera evidenciaron que la regulación de la expresión no sólo depende del promotor sino también de la especie vegetal y del contenido de pares de base de la secuencia de interés, lo que puede interferir en los fenómenos de homología. Esto también pudiera afectar la estabilidad de la secuencia de un ADN foráneo dado.

Cheng *et al.* (1998), lograron la expresión de las mismas toxinas en arroz, usando tres promotores: *CaMV35S* (constitutivo), *Ubi1* de maíz (constitutivo) y *Bp10* de *Brassica*, específico para polen. Con el último la expresión fue tejida específica e inducible y en el caso de los dos primeros fue mayor con el *CaMV35S*, probablemente debido a la fuerza de este promotor. Chen *et al.* (1998), usaron con éxito este mismo promotor en arroz para regular la expresión de los genes *hpt* (de resistencia a la higromicina) y *gus*.

Recientemente, el gen *Ubi 1* fue usado exitosamente en la transformación de trigo mediante biobalística para liberar (*E*)- β -farnesene synthase (*E β fS*), la feromona de alarma para muchas plagas de áfidos, convirtiéndose en el primer cultivo vegetal manipulado genéticamente para expresar este tipo de enzimas como un mecanismo de defensa (Bruce *et al.*, 2015).

Al-Kaff *et al.* (2000), colocaron el gen de la resistencia al herbicida bialaphos (*bar*) bajo el control del promotor *CaMV35S*. Los autores reportan que debido al origen viral del promotor, la infección por CaMV puede desestabilizar características genéticas comercialmente importantes en semillas de oleaginosas, a partir de la observación del silenciamiento del transgen *bar*, cambiando el fenotipo de la planta de resistente a susceptible al herbicida.

Cho *et al.* (2001), utilizaron el promotor *CaMV35S* para transformar repollo chino con el gen *cry1ac* unido a la secuencia “enhancer” o intensificadora delta omega $\Delta\Omega$ (secuencia omega modificada por ingeniería genética) del virus del mosaico del tabaco, con lo cual incrementaron la eficiencia de la transformación en comparación a lo reportado para el promotor sin “enhancer” o intensificador.

Los vectores binarios pCAMBIA1301 y pCAMBIA2301 conteniendo los genes reporteros *gus* y *gfp* (proteína verde fluorescente), respectivamente, bajo el control del promotor constitutivo de la Nopalina Sintetasa (NOS) y del terminador 35S del virus del mosaico del coliflor, fueron usados para la transformación de ñame amarillo *Dioscorea rotundata*, un importante cultivo en países tropicales que en los últimos años se ha visto afectado por niveles crecientes de plagas y enfermedades y que además carece de un sistema eficiente de transformación y regeneración. Nyaboga *et al.* (2014), reportaron la regeneración completa 3 a 4 meses después de la transformación, con una eficiencia de 9,4 a 18,2 %, señalando a este sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* como una plataforma útil para futuros estudios de ingeniería genética en esta especie agronómica y económicamente importante.

Htwe *et al.* (2014) trabajando con explantes de arroz, utilizaron el plásmido pCAMBIA1304 portador del gen marcador de selección *hpt* (de resistencia a la higromicina) y de los genes reporteros *gus* y *gfp* bajo el control del promotor *CaMV35S*, para optimizar el nivel de toxicidad del antibiótico empleado frecuentemente en protocolos de transformación genética. Obtuvieron una alta frecuencia de transformación con la expresión estable de los genes reporteros y de selección, señalando que la resistencia a higromicina puede ser utilizada eficientemente como marcador de selección en la transformación de arroz.

También se han utilizado de manera eficiente, aunque con menor frecuencia, los promotores de badnavirus, los cuales infectan tanto mono como dicotiledóneas (Moore *et al.*, 1998; Tzafirir *et al.*, 1998; Shenk *et al.*, 1999).

En los últimos años se han descrito nuevos promotores constitutivos cuya eficiencia es comparable a la del *CaMV35S*, con la ventaja al nivel de bioseguridad de ser de origen vegetal:

Xiao *et al.* (2005), aislaron y caracterizaron el promotor *MtHP* de *Medicago trunculata* y evaluaron su actividad (a partir de la expresión del gen reportero *gus*) en varias especies de leguminosas, observando similares patrones de expresión genética respecto al promotor *CaMV35S*, pero con niveles considerablemente más altos. Esto convierte al promotor *MtHP* en una herramienta con gran potencial en la Ingeniería Genética Vegetal.

Park *et al.* (2010; 2012), analizaron la actividad de los promotores vegetales *APX*, *SCP1*, *PGD1*, *R161B* y *EIF5* en base a la expresión del gen *gfp* en plantas transgénicas de arroz, en comparación a promotores constitutivos caracterizados previamente (*OsCc1*, *Act1*, *ZmUbi1*), mostrando patrones similares de expresión transgénica, pero con menor silenciamiento dependiente de homología en tres generaciones homocigóticas sucesivas, lo que resalta su potencial como promotores alternativos en aplicaciones biotecnológicas. Es necesario mencionar que los patrones de expresión variaron de acuerdo al órgano y al estadio de desarrollo.

Ron *et al.* (2014), utilizaron el promotor constitutivo de una subclase de actina de *Arabidopsis thaliana* *ACT2/ACT8* para regular la expresión del gen reportero *gus* y evaluar, mediante distintos métodos moleculares, los patrones de expresión en tomate transformado por *Agrobacterium rhizogenes*. Obtuvieron niveles considerables de expresión genética que variaron dependiendo del tejido y que fueron comparables a los de otros promotores constitutivos de origen vegetal.

En cuanto a las desventajas de la expresión constitutiva, se ha señalado que pudiera implicar la sobreexpresión de un transgen específico en una etapa inadecuada del desarrollo o en tejidos donde no es expresado normalmente, acarreando consecuencias desfavorables en el crecimiento y desarrollo de la planta e, incluso, en el medio ambiente (Bowling *et al.*, 1997; Berroca *et al.*, 2002) (tabla 1).

2. Promotores inducibles

Pueden ser activados en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo señales endógenas y factores físicos y químicos externos, bajo condiciones experimentales controladas (CAMBIA, 2003; Láñez, 2005). La ventaja de este tipo de promotores radica en que permite un control espacial y temporal más preciso de la expresión transgénica y permite analizar la función de nuevos genes. Además, los sistemas inducibles facilitan promover cambios locales en los niveles de expresión sin causar alteraciones marcadas en el desarrollo de la planta completa (Borghini, 2010). Al igual que con promotores tejido o estadio-específicos, el principio de la estrategia reside en un transgen latente que es activado subsecuentemente de manera controlada (Moore *et al.*, 2006) (tabla 2). Las señales endógenas corresponden a hormonas (especialmente auxinas, giberelinas y ácido abscísico). Los factores físicos corresponden a estrés biótico, como heridas y ataques por patógenos, usados en el estudio de sistemas de defensa de la planta inducidos por sustancias liberadas por o en respuesta al patógeno llamadas elicitores. Algunos

Tabla 1. Promotores constitutivos.

		Ventajas	Desventajas
Origen viral	De Badnavirus (Tzafrir <i>et al.</i> , 1998; Shenk <i>et al.</i> , 1999) CaMV35S y/o CaMV19S del mosaico del coliflor (CAMBIA, 2013; Htwe <i>et al.</i> , 2014) CaMV35S duplicado (Kanno <i>et al.</i> , 2000) CsVMV del mosaico de la yuca (Li <i>et al.</i> , 2001) BSV del rayado de banana (Schenk <i>et al.</i> , 2001)	<ul style="list-style-type: none"> - Expresión constitutiva - Alto número de transformantes en mono y dicotiledóneas 	<ul style="list-style-type: none"> - Origen viral - El nivel de expresión del transgen puede variar según el tejido y el estadio - Sobreexpresión inconveniente - Puede haber silenciamiento genético a largo plazo
Origen vegetal	Act 1, actina de arroz (Mc Elroy <i>et al.</i> , 1990) Act 2 y ACT2/ACT8, actina de <i>Arabidopsis</i> (An <i>et al.</i> , 1996; (Ron <i>et al.</i> , 2014)) Ubi 1 y 2 -ZmUbi, ubiquitina de maíz (Christensen <i>et al.</i> , 1992; Bruce <i>et al.</i> , 2015) Ubi 4, ubiquitina de <i>Nicotiana sylvestris</i> (Plesse <i>et al.</i> , 2001) EF1 α , de <i>Arabidopsis thaliana</i> (van Boxtel <i>et al.</i> , 1995) <i>MtHP</i> , de <i>Medicago trunculata</i> (Xiao <i>et al.</i> , 2005) <i>APX</i> , <i>SCP1</i> , <i>PGD1</i> , <i>RbiB</i> , <i>E1F5</i> de arroz (Park <i>et al.</i> , 2010 y 2012)	<ul style="list-style-type: none"> - Origen vegetal - Mayor expresión en monocotiledóneas - Menor silenciamiento transgénico a largo plazo 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor número de transformantes que con promotores de origen viral - La expresión puede variar según el estadio de desarrollo y el tejido. - Potencial uso en el control de ácidos

Tabla 2. Promotores inducibles

		Ventajas	Desventajas
Estrés biótico	NOS (<i>Agrobacterium</i>); Peroxidasa de arroz (An <i>et al.</i> , 1990); inhibidor de peroxidasa de arroz (Sasaki <i>et al.</i> , 2007).		
Factores físicos	ftsH6 de tomate, por temperatura; Rubisco, por luz; alcohol deshidrogenasa 1, por anaerobiosis (Iáñez, 2005; Saidi <i>et al.</i> , 2005)	<ul style="list-style-type: none"> - Activación exógena y endógena - Control espacial y temporal de la expresión transgénica más preciso - Efecto reversible 	<ul style="list-style-type: none"> - Pueden ser estadio-específicos - Relativamente baja frecuencia de transformantes - Generalmente de expresión no constitutiva
Factores químicos	AlcR/AlcA, por etanol; poP/LhGR- GR-GVG, por dexametasona; XVE/olexA, por β -estradiol (Borghi, 2010; Baroux <i>et al.</i> , 2005; Roslan <i>et al.</i> , 2001; Samalova <i>et al.</i> , 2005); ACC oxidasa y ACO sintetasa, por etileno (Hiwasa-Tanase <i>et al.</i> , 2012).		

de los promotores activados por estrés físico son NOS (del gen nopalina sintetasa) de *Agrobacterium*, el de peroxidasa de arroz y el inhibidor de la peroxidasa II de arroz (An *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 2007). Otros factores físicos inductores de promotores corresponden a estrés abiótico incluyendo luz, niveles de oxígeno, frío, calor y humedad. Resaltan los promotores activados por temperatura como el promotor del gen *hsp17.3* de soya, que induce la expresión del gen *gus* a temperaturas superiores a 25 °C, y el *ftsH6* de tomate, asociado a factores de transcripción de choque térmico. También se ha descrito el promotor de la enzima RuBISCO, inducible por luz, y de alcohol deshidrogenasa 1, inducible por anaerobiosis (Iáñez, 2005; Saidi *et al.*, 2005).

Los promotores inducibles por estímulo químico son activados por compuestos químicos que no se encuentran naturalmente en el organismo de interés, incluyendo antibióticos, alcoholes, esteroides, herbicidas y metales como el cobre, entre otros. Estos promotores han sido adaptados y refinados para inducir la actividad de un gen independientemente de otros factores bióticos o abióticos (CAMBIA, 2003). Su efecto es reversible (pierden actividad en ausencia del estímulo) y son muy útiles cuando se requiere expresión temporal (Gatz & Lenk, 1998).

Se han descrito varios sistemas bajo este tipo en *Arabidopsis* y *Aspergillus nidulans*, como: AlcR/AlcA inducible por etanol; fusiones GR, GVG y poP/LhGR inducibles por dexametasona; XVE/olexA inducible por β -estradiol y choque térmico (Baroux *et al.*, 2005; Roslan *et al.*, 2001; Samalova *et al.*, 2005; Borghi, 2010). Destaca el caso del etileno, fitohormona involucrada en varios procesos de maduración del fruto y senescencia, que regula varios promotores fruto-específicos como el del gen *ACC oxidasa* y *ACO sintetasa* involucrados en su biosíntesis. Promotores de genes de respuesta al etileno, tales como *E4* y *E8*, han sido

utilizados para identificar elementos activadores y supresores implicados en la expresión genética espacial y temporal de las plantas (Hiwasa-Tanase *et al.*, 2012).

A pesar de las ventajas que ofrecen, algunos investigadores han mencionado que este tipo de promotores generalmente implica el uso de sustancias tóxicas, sin embargo este inconveniente ha sido superado con los promotores inducibles por distintos tipos de estrés y factores físicos (Uno *et al.*, 2000; Hoff *et al.*, 2001).

3. Promotores tejido o estadio-específicos

Solo actúan en tejidos particulares o en ciertos estadios de desarrollo de la planta. Pueden ser inducidos por factores endógenos o exógenos, en cuyo caso también se les clasifica como inducibles. A pesar de que se han descrito sistemas heterólogos (entre especies o, incluso, reinos diferentes o no relacionados), con estos promotores la mayor especificidad es observada en sistemas homólogos (formados por elementos de la misma especie o de especies relacionadas); esto probablemente se deba a que la expresión coordinada de factores de transcripción es necesaria para la regulación de la actividad de los promotores (CAMBIA, 2003; NEPAD, 2010). El conocimiento de este tipo de promotores permite mejorar la expresión de cualidades o características vegetales de interés agronómico, farmacéutico y/o comercial, tener un mejor control temporal (en un momento específico del desarrollo de la planta) y conocer las rutas metabólicas de un órgano o tejido particular para la identificación de nuevos promotores y genes blanco (Potenza *et al.*, 2004) (tabla 3). Los ensayos con este tipo de promotores no solo se han realizado en forma individual; Michniewicz *et al.* (2015), han desarrollado un sistema de vectores con promotores compatibles que regulan la expresión genética tejido-específica para facilitar el análisis espacial de la función de varios genes al mismo

Tabla 3. Promotores tejido u órgano específicos

Tejido u órgano	Promotor		Ventajas	Desventajas
Tallo	Hsp17, de cebada	Cheng <i>et al.</i> ,1998; Peremarti <i>et al.</i> , 2010; Ghasimi <i>et al.</i> ,2009 Annadana <i>et al.</i> , 2002 Kolachevskaya <i>et al.</i> , 2015	<ul style="list-style-type: none"> - Pueden ser inducibles - Estudio de rutas metabólicas - Mejora de cualidades de interés agronómico, comercial y farmacéutico 	Especificidad en sistemas homólogos, con baja expresión transgénica en sistemas heterólogos
Antera	TA29, de tabaco			
Polen	Bp10, de <i>Brassica</i>			
Cotiledón	Faseolina, de poroto			
Raíz o tubérculo	TobRB7, de tabaco; patatina y B33, de papa			
Semilla	Glutenina, de trigo			
Tejidos verdes	PEPC, de maíz			
Flores	UEP1, de Ubiquitina de crisantemo; CER6 de <i>Arabidopsis</i>			
Múltiples tejidos u órganos	Sistema de promotores	Michniewicz <i>et al.</i> , 2015; Ron <i>et al.</i> , 2014	Evaluación de expresión tejido u órgano-específica en menor tiempo	

tiempo, superando así las limitaciones de la clonación de promotores individuales que puede llevar mucho tiempo y facilitando la evaluación y hallazgo de genes noveles involucrados en distintos procesos o etapas del desarrollo vegetal, que al mismo tiempo pudieran ser regulados o inducidos. Similarmente, Ron *et al.* (2014), utilizaron un set de promotores tejido-específicos de *Arabidopsis thaliana* incluyendo AtS32 (floema), AtS18 (xilema), AtPEP (corteza) y AtWER (raíz) para establecer un modelo de estudio de la expresión tejido-específica en tomate *Solanum lycopersicum*.

Entre los promotores órgano o tejido-específicos descritos se encuentran: *hsp17* de cebada (activado por calor en pecíolo y xilema de tallo), *TA29* del tapete de la antera de tabaco, *Bp10* de *Brassica* específico para polen, faseolina de los cotiledones de poroto, *TobRB7* de la raíz de tabaco, patatina del tubérculo de papa, glutenina del endospermo de trigo y de avena y fosfoenolpiruvatocarboxilasa (PEPC) de maíz inducible por luz (solo en tejidos verdes) (Cheng *et al.*, 1998; Lamacchia *et al.*, 2001; Ghasimi *et al.*, 2009; Peremarti *et al.*, 2010). Para semilla también se conoce el promotor de α -globulina aislado de algodón, tabaco y *Arabidopsis* (Sunilkumar *et al.*, 2002). Dentro de los promotores específicos para flores cuentan el *UEP1* de Ubiquitina de crisantemo y el *CER6* de *Arabidopsis* para mejorar la resistencia a insectos y retrasar la maduración de la flor (Annadana *et al.*, 2002).

En cuanto a promotores que intervienen en el desarrollo vegetal, resaltan los involucrados en la maduración de la semilla, la floración o que mantienen al tejido en cultivo en el estadio de producción de un metabolito secundario de interés comercial. Por ejemplo, el pro-

motor *bZIP53* de *Arabidopsis* promueve la maduración de la semilla y ha sido usado en otras plantas como estrategia de transformación para fines agronómicos (Alonso *et al.*, 2009). Kolachevskaya *et al.* (2015), utilizaron el gen *tms1* de *Agrobacterium* involucrado en la biosíntesis de auxinas, bajo el control del promotor de la papa B33, que a pesar de ser constitutivo posee mayor actividad en tubérculos, por lo que facilita el desarrollo reproductivo vegetativo por tuberización; observaron el incremento de auxinas órgano y tejido-específico en plantas de papa, evitando el uso de promotores heterólogos.

4. Promotores sintéticos o quiméricos

Los distintos elementos o motivos que constituyen un promotor presentan una organización en número y ubicación (incluyendo la distancia entre ellos) que afecta la interacción con factores de transcripción (TFs) y determina la fuerza, así como las características espaciales y temporales de la expresión genética. En consecuencia, estos patrones de expresión pueden ser modificados a conveniencia mediante la reorganización del tipo, número de copias y distancia entre los motivos de un promotor, lo cual es la base de la construcción de promotores sintéticos. Allí radica la potencialidad de los promotores y TFs sintéticos como herramientas para la regulación precisa de la expresión transgénica (Liu *et al.*, 2013). Su uso combinado permite el control transcripcional coordinado de múltiples transgenes, deseado en distintas aplicaciones biotecnológicas que incluyen la ingeniería metabólica y bioenergía (Petolino & Davies, 2013; Liu & Stewart, 2015).

En la construcción de promotores quiméricos destaca el uso de secuencias virales derivadas del promotor CaMV35S (Dutt *et al.*, 2014). Son llamados de “siguiente generación” y básicamente consisten en la combinación de elementos de regiones promotoras de distinto origen, bien sea de organismos distintos (relacionados o no) o elementos *cis* reguladores de promotores diferentes de un mismo organismo, incluyendo repeticiones en “tándem”, eliminando fenómenos de homología (Marzabal *et al.*, 1998; CAMBIA, 2003; Vogl *et al.*, 2014). En este sentido, Rushton *et al.* (2002), concluyeron que la combinación, número y distribución de diferentes elementos *cis* reguladores (cajas W, GCC o S) determinan la respuesta del promotor frente a estrés biótico (infección con hongos y bacterias) y abiótico (heridas). Con esta estrategia, se incrementó la actividad del promotor CamV35S mediante la fusión de secuencias *cis* reguladoras de otros promotores (CoYMV y CsVMV) (Peremarti *et al.*, 2010). Otros promotores sintéticos, llamados bidireccionales, son usados en procedimientos de transformación multigénica ya que el promotor mínimo ha sido duplicado por ingeniería genética en ambas direcciones, por lo que controlan la expresión simultánea de dos genes. Esta estrategia se ha descrito para mejorar la transcripción de genes que dirigen la oleosina metionina sulfoxidoreductasa (enzima implicada en el envejecimiento o senescencia) en canola, y de los genes *Cab 1* y *Cab 2* para la síntesis de proteínas de unión a la clorofila *a/b* en *Arabidopsis* (Peremarti *et al.*, 2010).

Conclusiones

El éxito de la aplicación de la ingeniería genética en el mejoramiento vegetal, el estudio de los mecanismos subyacentes en la regulación genética y el desarrollo vegetal depende en gran parte de la capacidad de controlar la expresión transgénica. A su vez, en las estrategias para lograr tal control resaltan los promotores. Actualmente se dispone de un amplio rango de estos elementos reguladores, con distintas características y potencial para aplicaciones específicas. Así, el promotor se selecciona sobre la base de la especie vegetal, del gen que se quiere insertar y el tejido o la etapa del desarrollo en los cuales se va a expresar el gen, lo que a su vez se determina realizando pruebas donde varíen cada uno de los parámetros involucrados. A medida que se avanza en el estudio de promotores genéticos, se afinan los procedimientos para su uso y se avanza en la eliminación del silenciamiento genético, en el perfeccionamiento de los patrones de expresión transgénica (tanto en especificidad como a nivel espacial y temporal) y, muy importante, en la bioseguridad de las plantas modificadas genéticamente.

Referencias bibliográficas

Ahmad, A, Bano, S, Riazuddin, S, & Sticklen, M. (2002). Expression of synthetic *cry 1Aby cry 1Ac* genes in *Basmati rice* via *Agrobac-*

terium-mediated transformation for the control of the european corn borer. *In Vitro Plant Cell*, 38 (1), 213-220.

- Al-Kaff, N, Kreike, M, Pitcher, R, & Dale, P. (2000). Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nat Biotech*, 18 (1), 995-999.
- Alonso, R, Onate, L, Weltmeier, F, Ehlert, A, Díaz, I, Dietrich, K, Carbajosa, J, & Droge, W. (2009). A Pivotal Role of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor bZIP53 in the Regulation of *Arabidopsis* Seed Maturation Gene Expression Based on Heterodimerization and Protein Complex Formation. *Plant Cell*, 21(1), 1747-1761.
- An, G, Costa, MA, & Ha, SB. (1990). Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxine-inducible. *Plant Cell*, 2 (1), 225-233.
- Annadana, S, Beekwilder, M, Kuipers, G, Visser, P, Outchkourov, N, Pereira, A, Udayakumar, M, De Jong, J, & Jongsma, M. (2002). Cloning of the chrysanthemum UEP1 promoter and comparative expression in florets and leaves of *Dendranthemagrandiflora*. *Transgenic Res*, 11 (1), 437-445.
- Baroux, C, Branvillian, R, Betts, H, Batoco, H, Craft, C, Martínez, A, Gallois, P, & Moore, I. (2005). Predictable activation of tissue-specific expression from a single transgenelocus using the pOp/LhG4 transactivation system in *Arabidopsis*. *Plant Biotech J*, 3(1), 91-101.
- Berocal, M, Molina, A, & Solano, R. (2002). Constitutive expression of ethylene-response-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J*, 29 (1), 23-32.
- Borghi, L. (2010). Inducible gene expression systems for plants. *Methods Mol Biol.*, 655 (1), 65-75.
- Bowling, S, Clarke, J, Liu, Y, Klessig, D, & Dong, X. (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, 9 (1), 1573-1584.
- Bruce, J, Aradottir, G, Smart, L, Martin, J, Caulfield, J, Doherty, A, Sparks, C, Woodcock, C, Birkett, M, Napier, J, Jones, H, & Pickett, J. (2015). The first crop plant genetically engineered to release an insect pheromone for defence. *Scientific Reports*, 5, 11183. doi: 10.1038/srep11183.
- CAMBIA. (2003). Promoters used to regulate gene expression. Disponible en: http://www.patentmaze.cougarlaw.com/linked_files/promoters-for-gene-regulation.pdf. Consultado: enero de 2013.
- Chen, L, Zhang, S, Beachy, R, & Fauquet, C. (1998). A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Rep.*, 18 (1), 25- 31.
- Cheng, X, Sardana, R, Kaplan, H, & Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium* transformed rice plants expressing synthetic *cry1A b* and *c* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Nat Acad Sci.*, 95 (1), 2767-2772.
- Cho, H, Cao, J, Ren, J, & Earle, E. (2001). Control of lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* sp. *pekinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1AC* gene. *Plant Cell Rep.*, 20 (1), 1-7.
- Cornejo, M, Luth, D, Blankenship, K, Anderson, O, & Blechl, A. (1993). Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol.*, 23 (1), 567-581.
- Dahleen, L, Okubara, P, & Blechl, A. (2001). Transgenic approaches to combat Fusarium Head Blight in wheat and barley. *Crop Sci.*, 41 (1), 628-637.
- De Guglielmo, Z, Fernández, R, Hermoso, L, Altosaar, I, & Menéndez, A. (2010). Optimización de los parámetros de transformación genética de café mediante biobalística con el gen reportero Gus. *Acta. Biol. Venez.*, 30 (1-2), 23-34.

- Dorries, H, Remus, I, Gronewald, A, Gronewald, C, & Berghof, K. (2010). Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem.*, 396, 2043–2054.
- Dutt, M, Dhekney, S, Soriano, L, Kandel, R, & Grosser, J. (2014). Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticulture Research*, 1. doi:10.1038/hortres.2014.47.
- Fernández, R, De Guglielmo, Z, & Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación (IUPC)*, 71 (3), 57-84.
- Fernandez, R, & Menéndez-Yuffa, A. (2002). Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. *Electronic J Biotech.*, 6 (1), 1-9.
- Gatz, C, & Lenk, L. (1998). Promoters that response to chemical inducers. *Trends Plant Sci.*, 3 (1), 352-358.
- Ghasimi, Z, Rahnama, H, Panahandeh, J, Kohneh, B, Arab, K, & Mahna, N. (2009). Green-tissue-specific, C₄-PEPC-promoter-driven expression of *Cry 1Ab* makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (*Phthorimaea perculella*, Zeller). *Plant Cell Rep.*, 28 (1), 1869-1879.
- Gupta, P, Raghuvanshi, S, & Tyagi, A. (2001). Assessment of the efficiency of various gene promoters via biolistics in leaf and regenerating seed callus of millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crus-galli*. *Plant Biotech.*, 18 (1), 275–282.
- Hiwasa-Tanase, K, Kuroda, H, Hirai, T, Aoki, K, Takane, K, & Ezura, H. (2012). Novel promoters that induce specific transgene expression during the green to ripening stages of tomato fruit development. *Plant Cell Rep.*, 31, 1415–1424.
- Hoff, T, Schnorr, K, & Mundy, J (2001). A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Mol Biol.*, 45 (1), 41-49.
- Htwe, N, Ling, H, Qamaruz, F, & Maziah, M. (2014). Plant genetic transformation efficiency of selected Malaysian rice based on selectable marker gene (*hptII*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17 (4), 472-481.
- Hull, R, Covey, S, & Dale, P. (2000). Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microb Ecol Health Dis.*, 12 (1), 1–5.
- Iláñez, E. (2005). Introducción a la biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada-España. Disponible en: <http://www.urg.es/~eianez/biotecnologia/introbiotec.htm>. Consultado: enero de 2014.
- Jakowitsch, J, Papp, I, Moscone, E, Winden, J, Matzke, M, & Matzke, A. (1999). Molecular and cytogenetic characterization of a transgen locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in *trans*. *Plant J.*, 17 (1), 131-140.
- Kanno, T, Naito, S, & Shimamoto, K. (2000). Post-transcriptional gene silencing in cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.*, 41 (3), 321-326.
- Kolachevskaya, O, Alekseeva, V, Sergeeva, L, Rukavtsova, E, Getman, I, Vreugdenhil, D, Buryanov, Y, & Romanov, G. (2014). Expression of auxin synthesis gene *tms1* under control of tuber-specific promoter enhances potato tuberization *in vitro*. *Journal of Integrative Plant Biology*, Doi: 10.1111/jipb.12314.
- Lamacchia, C, Shewry, P, Di Fonzo, N, Forsyth, J, Harris, N, Lazzari, P, Napier, J, Halford, N, & Barcelo, P. (2001). Endosperm specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *J Exp Bot.*, 52 (1), 243–250.
- Li, Z, Jayasankar, S, & Gray, D (2001). Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci.*, 160 (1), 877–887.
- Liu, W, Yuan, J, & Stewart C, Jr. (2013). Advanced genetics tools for plant biotechnology. *Nat Rev Genet.*, 14, 781-793.
- Liu, W, & Stewart, C. (2015). Plant synthetic biology. *Trends Plant Sci.*, 20, 309-317.
- Leroy, T, Henry, A, Royer, M, Altosaar, I, Frutos, R, & Phillippe, R. (2000). Genetically modified coffee plants expressing the *B. thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.*, 19 (1), 382-389.
- Marzabal, P, Busk, P, Ludevid, M, & Torrent, M. (1998). The bifactorial endosperm box of gamma-zein gene: characterization and function of the Pb3 and GZM cis-acting elements. *Plant J.*, 16 (1), 41-52.
- Michniewicz, M, Frick, E, & Strader, L. (2015). Gateway-compatible tissue-specific vectors for plant transformation. *BMC Research Notes*, 8, 63-71. doi 10.1186/s13104-015-1010-6.
- Moore, I, Galweilwr, L, Schell, J, & Palme, K. (1998). A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc Nat Acad Sci.*, 95 (1), 376-381.
- Moore, I, Samalova, M, & Kurup, S. (2006). Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J.*, 45 (1), 651-683.
- NEPAD. (2010). Commonly used promoters. Disponible en: <http://www.nepadbiosafety.net/subjects/biotechnology/commonly-used-promoters>. Consultado en : enero de 2013.
- Nyaboga, E, Tripathi, J, Manoharan, R, & Tripathi, L. (2014). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*): an important tool for functional study of genes and crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 5 (463). Doi: 10.3389/fpls.2014.00463.
- Park, S, Yi, N, Kim, Y, Jeong, M, Bang, S, Do, Y, & Kim, J. (2010). Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *J Exp Bot.*, 61 (9), 2459-2467.
- Park, S, Woon, S, Seo, J, Jung, H, Reveche, M, Il, H, Hyun, K, Shic, Y, & Kim, J. (2012). Analysis of the APX, PGD1 and R1G1B constitutive gene promoters in various organs over three homozygous generations of transgenic rice plants. *Planta*, 235 (1), 1397-1408.
- Plesse, B, Criquei, M, Durr, A, Parmentier, Y, Fleck, J, & Genschik, P. (2001). Effects of the polyubiquitin gene *Ubi.U4* leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol.*, 45 (1), 655–667.
- Potenza, C, Aleman, L, & Sengupta-Gopalan, C. (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol.*, 40 (1), 1–22.
- Peremarti, A, Twyman, R, Gomez-Galera, S, Naqvi, S, Farré, G, Sabalza, M, Miralpeix, B, Dashevskaya, S, Yuan, D, Ramessar, K, Christon, P, Zhu, C, Bassie, L, & Capell, T. (2010). Promotor diversity in multigene transformation. *Plant Mol Biol.*, 73 (1), 363-378.
- Petolino, J, & Davies, J. (2013). Designed transcriptional regulators for trait development. *Plant Sci.*, 201-202, 128-136.
- Porto, M, Pinheiro, M, Lyra, V, dos Santos, R, Melo, P, & de Lima, L. (2014). Plant Promoters: An Approach of Structure and Function. *Mol. Biotechnol.*, 56 (1), 38-49
- Rodríguez, R., & Chamberlin, M. (1982). Promoters. New York, USA. Praeger Publishers. 524 p.
- Ron, M, Kajala, K, Pauluzzi, G, Wang, D, Reynoso, M, Zumstein, K, Garcha, J, Winte, S, Masson, H, Inagaki, S, Federici, F, Sinha, N, Deal, R, Bailey-Serres, J, & Brady, S. (2014). Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring

- celltype-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant Physiology*, 166, Doi:10.1104/pp.114.239392.
- Roslan, H, Salter, M, Wood, C, White, M, Croft, K, Robson, F, Coupland, G, Doonan, J, Laufs, P, Tomsett, A, & Caddick, M. (2001). Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 28 (1), 225-235.
- Rushton, P, Reinstadler, A, Lipka, V, Lippok, B, & Somssich, I. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell*, 14 (1), 749-762.
- Saidi, Y, Finka, A, Chakhporanian, M, Zryd, J, Schaefer, D, & Goloubinoff, P. (2005). Controlled expression of recombinant protein in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: a tool for plant research and biotechnology. *Plant Mol Biol*, 59 (1), 697-711.
- Sági, L, Panis, B, Schoofs, H, Swennen, R, & Cammue, B. (1995). Genetic transformation of banana and plantain via particle bombardment. *Biothe*, 13 (1), 481-485.
- Samalova, M, Brzobohaty, B, & Moore, I. (2005). pOp6/LhGR: a stringently regulated and highly responsive dexamethasone-inducible gene expression system for tobacco. *Plant J*, 41 (1), 919-935.
- Sanger, M, Daubert, S, & Goodman, R. (1990). Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol Biol*, 14, 433-443.
- Sardana, R, Dukiandjiev, S, Cheng, X, Cowan, K, & Altosaar, I. (1996). Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences *cryIA b* and *c* by expression in maize endosperm culture. *Plant Cell Rep.*, 15 (1), 677-681.
- Sasaki, K, Yuichi, O, Hiraga, S, Gotoh, Y, Seo, S, Mitsuhashi, I, Ito, H, Matsui, H, & Ohashi, Y. (2007). Characterization of two rice peroxidase promoters that respond to blast fungus infection. *Mol. Genet Genomic.*, 278 (1), 709-722.
- Schenk, P, Remans, T, Sagi, L, Elliott, A, Dietzgen, R, Swennen, R, Ebert, P, Grof, C, & Manners, J. (2001). Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. *Plant Mol Biol.*, 47 (1), 399-412.
- Schenk, P, Sagi, L, Remans, T, Dietzgen, R, Graham, M, & Manners, J. (1999). A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. *Plant Mol Biol.*, 39 (1), 1221-1230.
- Steinitz, B, Gafni, Y, Cohen, Y, Tabib, Y, & Navon, A. (2002). Insecticidal activity of a *cry1Ac* transgene in callus derived from regeneration-recalcitrant cotton. *In Vitro Cell Plant.*, 38 (1), 217-251.
- Sunilkumar, G, Connell, J, Smith, C, Reddy, A, & Rathore, K. (2002). Cotton α -globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, *Arabidopsis* and tobacco. *Transgenic Res.*, 11 (1), 347-359.
- Tzafirir, I, Torbert, N, Lockhart, B, Sommer, D, & Olszewski, N. (1998). The sugarcane bacilliform badnavirus promoter is active in both monocots and dicots. *Plant Mol Biol.*, 38 (1), 347-356.
- Uno, Y, Furuhata, T, Abe, H, Yoshida, R, Shinozaki, K, & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Novel *Arabidopsis* bZIP transcription factor involved in an abscisic-acid-dependent signal transduction pathway under drought and high salinity condition. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 97, 11632-11637.
- van Bostel, J, Berthouly, M, Carasco, C, & Eskes, A. (1995). Transient expression of β -Glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. *Plant Cell Rep.*, 14 (1), 748-752.
- Vogl, T, Ruth, C, Pitzer, J, Kickenweiz, T, & Glieder, A. (2014). Synthetic core promoters for *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol.*, 3, 188-191.
- Xiao, K, Zhang, C, Harrison, M, & Wang, Z. (2005). Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Mol Breeding.*, 15 (1), 221-231.
- Xu, D, McElroy, D, Thornburg, R, & Wu, R. (1993). Systemic induction of a potato *pin2* promoter by wounding methyl jasmonate and abscisic acid in transgenic rice plant. *Plant Mol Biol.*, 22 (1), 573-5.