Cereal Biotechnology and Biochemistry

Razi University

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

A review of the role and function of promoters in cereal crops

Mehdi Sohani[1]✉, Tayebeh Fallahi[2] & Saideh Alidoost[3]

[1]✉ Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan. E-mail: mhdsohani@gmail.com

[2] Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan.

[3] Faculty of Agricultural Sciences & Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

ABSTRACT

Promoters are essential for gene expression, and it is the promoter that determines the function of genes. The eukaryotic promoter is composed of several components. In the absence of auxiliary proteins, promoters cannot perform their hypothetical functions. Scientists analyze or predict the function of promoters in the laboratory, or by using bioinformatics information. There are different types of promoters, including constitutive forms that are active in almost all tissues, locations and times. An spatio-temporal counterpart induces gene expression in certain stress conditions, tissues and locations. Inducible promoters are excellent tools in research because experts can fully control expression of the target gene. They limit gene activity to specific conditions, such as abiotic or biotic stresses. Based on their knowledge of molecular elements, scientists can now make synthetic promoters that control the expression of genes with greater ease and confidence. The role of introns in promoting promoter activity is well-documented, and introns can play a positive regulatory role. The issues discussed in this article can lead scientists to choose the most appropriate promoter for their target gene and be able to move forward in their research.

Keywords: Promoter structure, constitutive, spatio-temporal, synthetic promoters.

Article Type: Review Article

Article history: Received: 06/07/2021, **Revised:** 26/09/2022, **Accepted:** 29/10/2021, **Published online:** 26/03/2022

Cite this article: Sohani, M., Fallahi, T. & Alidoost, S. (2022). A review of the role and function of promoters in cereal crops. Cereal Biotechnology and Biochemistry. 1 (1). 100-135. DOI: 10.22126/cbb.2022.1955

© The Author(s).

Publisher: Razi University

10.22126/cbb.2022.1955

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

مروری بر نقش و کارکرد پروموترها در غلات

محمد مهدی سوهانی[1]✉، طیبه فلاحی[2] و سعیده علیدوست[3]

[1]✉ دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان. رایانامه: mhdsohani@gmail.com

[2] دانشجوی مقطع دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان.

[3] دانشجوی مقطع دکتری، گروه زراعت و اصلاح نبات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشکده محقق اردبیلی.

چکیده

پروموترها از عناصر حیاتی فعالیت ژن‌ها و تعیین کننده وظیفه و نقش آن‌ها در فرآیندهای سلولی هستند. پروموترهای یوکاریوتی از اجزای مختلف تشکیل شده‌اند. پروموترها به تنهایی و بدون وجود پروتئین‌های کمکی قادر به انجام وظایف فرضی خود نیستند. دانشمندان کارکرد پروموترها را در آزمایشگاه و یا با استفاده از اطلاعات بیوانفورماتیکی تجزیه تحلیل و یا پیش‌گویی می‌کنند. پروموترها انواع مختلفی دارند که شامل انواع با فعالیت دائمی که تقریباً در همه بافت‌ها و همه مکان‌ها فعال هستند، انواع مکانی زمانی و در نهایت انواع مختص سلول است. یک قابلیت مهم پروموترهای مورد استفاده در تحقیقات، القاءپذیری آن‌ها است که می‌تواند فعالیت ژن را محدود به یک شرایط خاص مثلاً تنش‌های زیستی و غیر زیستی کند. توانایی دانشمندان در سنتز پروموترهای مصنوعی که حاصل شناخت آن‌ها از عناصر مولکولی است، سبب شده است تا کنترل بیان ژن‌ها با اطمینان بیشتری انجام شود. نقش اینترون‌ها در فعالیت پروموترها شناخته شده و اغلب دارای کارکرد تنظیمی مثبت هستند. مطالبی در خصوص همه این موارد در مقاله حاضر بحث و بررسی شده است.

واژه‌های کلیدی: پروموترهای دائمی، پروموترهای زمانی-مکانی، پروموترهای القاء شدنی، پروموترهای سینتتیک یا مصنوعی.

نوع مقاله: مقاله مروری

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۵ **اصلاح:** ۱۴۰۰/۰۷/۰۴ **پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۸/۰۷، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۱/۰۱/۰۶

استناد: سوهانی، م. م.، فلاحی، ط. و علیدوست، س. (۱۴۰۱). مروری بر نقش و کارکرد پروموترها در غلات. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات. ۱ (۱). ۱۰۰-۱۳۵.

DOI: 10.22126/cbb.2022.1955

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

۱- مقدمه

اگرچه همه سلول‌های یک گیاه حاوی ژن‌های یکسان و اطلاعات ژنتیکی مشابه هستند، اما فقط گروه کوچکی از ژن‌ها در هر زمان مشخص بیان می‌شوند تا در تقسیم سلولی، رشد، تمایز، نمو، تولیدمثل، کنترل محیطی و دیگر فرآیندهای مهم سلول، هماهنگی به وجود آید و این وظایف پیچیده به طریق هماهنگ شده انجام شود. به‌طور کلی، بیان ژن می‌تواند در هر کدام از مراحل رونوشت برداری، فرآوری mRNA، پایداری رونوشت، جابجایی mRNA به سیتوپلاسم، ترجمه یا تغییرات پروتئین تنظیم و کنترل شود. یک نقطه کلیدی در تنظیم بیان ژن، آغاز رونوشت‌برداری است و اطلاعات زیادی درباره استقرار ماشین رونوشت‌برداری در نزدیک مکان آغاز و شروع رونوشت‌برداری وجود دارد (Robinson et al., 2016). مطالعات نشان داده است که اجزاء اصلی در این فرآیندها در مخمر، حیوانات و گیاهان به‌شدت حفاظت شده است (Datla et al., 1997).

تمام ساختارهای تراژن - شامل ژن‌های هدف و ژن‌های نشانگر- نیازمند پروموترهایی برای تنظیم رونوشت برداری هستند تا بتوانند به طور تکرار شدنی و قابل پیش‌بینی عمل کنند. تراژن‌ها همراه با انواع مختلفی از پروموترهای ناهم‌نهاد[1] (از منابع دیگر) و یا هم‌نهاد[2] (گیاه مورد مطالعه)، در طی ساخت ژن‌های کایمری در داخل وکتورهای تراریزش، کلون می‌شوند و بدین وسیله، متخصصان بیوتکنولوژی طیف وسیعی از الگوهای بیان را در اختیار خواهند داشت که مناسب تحقیقات و آزمایشات آن‌ها باشد. پروموتر(های) مورد استفاده در گیاهان تراریخت عاملی است که در بسیاری موارد تفاوت بین یک پروژه موفق بیوتکنولوژی گیاهی و پروژه‌ای ناشناخته و ناموفق را مشخص می‌کند. لذا دقت در انتخاب آن‌ها از اهمیت حیاتی در هر پروژه‌ای برخوردار است.

۲- پروموترها

پروموترها توالی‌هایی هستند که بلافاصله در چند هزار باز در بالادست و اطراف مکان آغاز رونوشت‌برداری (TSS) قرار گرفته و حاوی اطلاعاتی هستند که مشخص می‌کند که بیان ژن در کجا، چه زمان و به چه میزان انجام شود. پروموتر، عمدتاً در منطقه '5 توالی رونوشت قرار دارد و مکان اتصال کمپلکس‌های پروتئینی RNA پلیمراز است که برای رونوشت‌برداری ژن مورد نیاز هستند. در یوکاریوت‌ها RNA پلیمراز I سنتز rRNA، RNA پلیمرازII سنتز mRNA، و RNA پلیمرازIII سنتز 5SRNA، tRNAها و دیگر mRNAها را بر عهده دارند. در گیاهان RNA پلیمراز IV و V در سنتز miRNA و همچنین در خاموشی ژن نقش دارند (Krebs et al., 2017). در این نوشته پروموترهای مربوط به RNA پلیمراز II مد نظر هستند و توضیح داده شده‌اند.

[1] Heterologous or exogenous
[2] Homologous or native

فعالیت رونوشت برداری ژن‌ها را اساساً لوکوس‌های عمل کننده-cis و فاکتورهای عمل کننده-trans کنترل می‌کنند. لوکوس‌های عمل کننده-cis یک ناحیه ژنتیکی است که بر فعالیت ژن‌ها در همان مولکول DNA تأثیر دارد. این نواحی عموماً پروتئین کد نمی‌کنند، بلکه مکانی برای اتصال پروتئین‌های متصل شونده به DNA هستند. تقویت کننده‌ها، اپرون‌ها و پروموترها نمونه‌هایی از لوکوس‌های عمل کننده-cis هستند. در برخی موارد مشاهده شده است که توالی‌های عمل کننده-cis در داخل اینترون‌ها یا منطقه '3 توالی‌های کد کننده قرار دارند (Griffiths et al., 1999; Rugg-Gunn, 2019).

فاکتورهای عمل کننده-trans (یا فاکتورهای رونوشت‌برداری؛ TF)، پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌باشند که عمومی و یا مختص-ژن بوده و عناصر موجود بر روی پروموتر یا مناطق تنظیم کننده دیگر را، شناسایی و بیان ژن را تنظیم می‌کنند.

۳- ساختار پروموترها در موجودات یوکاریوت

از دیدگاه ساختاری، پروموترها به مناطق مختلف تقسیم می‌شوند (شکل ۱). سه دسته عنصر[3] نیز بر اساس مکان‌های نسبی آن‌ها وجود دارند. در نزدیک TSS مرکز پروموتر[4] قرار دارد که منطقه اتصال RNA پلیمراز II است. عناصر عمل کننده-cis[5] در نزدیک پروموتر قرار دارند و محل اتصال پروتئین‌هایی هستند که در اتصال RNA پلیمراز II به پروموتر به آن کمک می‌کنند. عناصر عمل کننده-cis در مسافت‌های دورتر نیز عمل می‌کنند (Griffiths et al., 1999; Grotewold & Springer, 2018).

قبل از اینکه RNA پلیمراز به DNA متصل شود، کمپلکس ماقبل آغازین (PIC) به‌ترتیب زیر، در منطقه مرکزی پروموتر شکل می‌گیرد: کمپلکس TFIID، TFIIB، RNA پلیمرازII، TFIIF، TFIIE و TFIIH. جعبه TATA را پروتئین متصل شونده به TATA (TBP) شناسایی می‌کند که زیرواحد TFIID است؛ در حالی‌که TFIIB یک پلی‌پپتید منفرد است که با TBP و DNA بالادست کنش متقابل دارد. این دو فاکتور نقش مهمی در شناسایی عناصر پروموتر مرکزی دارند (Griffiths et al., 2002; Krebs et al., 2017). مکانیسم عمل - از مسافت دور - فعال کننده‌ها و سرکوب کننده‌ها، با مدل‌هایی توضیح داده شده است که در طی آن حلقه شدن DNA [6] اتفاق می‌افتد. در این مدل با حلقه شدن DNA، پروتئین‌های فعال کننده متصل به عناصر تقویت کننده دور، به مجاورت کمپلکس‌های پروتئینی مرتبط و متصل به توالی‌های عمل کننده cis در پروموتر نزدیک آورده می‌شود. این مکانیسم سبب می‌شود تا

[3] Element
[4] Core promoter
[5] *Cis*-acting elements
[6] DNA looping

تقویت کننده در مجاور پروموتر هدف قرار گیرد (Griffiths et al., 2002).

۴- آنالیز پروموترها

اطلاعات وسیعی از توالی ژن‌ها و ژنوم گیاهان در بانک ژن موجود است. استفاده از این ژن‌ها در مطالعات تراریزش، نیازمند اطلاعات قبلی از مکان و سطح بیان آن‌ها است. برای تعیین خصوصیات کارکردی بیان ژن، جداسازی و آنالیز ساختاری منطقه بالادست ژن ضروری است (Li et al., 2020; Porto et al., 2014).

در خصوص کارهای آزمایشگاهی در اوایل، دُمین‌های ساختار پروموترهای گیاهی عموماً با آنالیزِ حذف شناسایی شد. در این قبیل آنالیزها، تأثیر حذف نوکلئوتیدهای یک پروموتر بر بیان ژن گزارشگر متصل به آن، اندازه‌گیری می‌شود. یک سازه[۷] در آزمایشگاه ساخته می‌شود که شامل پروموتر(های) تغییریافته است و در پایین دست آن، ژن گزارشگر (از قبیل gus) قرار دارد (شکل ۲). آنالیز موتاسیون نقطه‌ای یا درج‌شدنی[۸] و سپس آزمون توانایی اتصال آنها به پروتئین‌های هسته‌ای (خالص یا ناخالص) در شرایط in vitro انجام می‌شود. همچنین، گیاه مدل یا هدف با این سازه تراریزش می‌شود و مکان و زمان بیان ژن gus در گیاه تراریخت در شرایط in planta ردیابی می‌شود. اطلاعات آنالیز موتاسیون نقطه‌ای پروموتر در این قبیل سازه‌ها سبب شناسایی توالی موتیف‌های مهم یا عناصری شدند که برای اختصاصی عمل کردن یک پروموتر لازم هستند. برای مثال، مطالعات مولکولی اولیه در خصوص پروموترهای واکنش دهنده به ABA نشان داد که القاء آن‌ها از طریق جعبه ACGT با توالی ثابت "GTACGTGGCGC" انجام می‌شود (Shen et al., 2000).

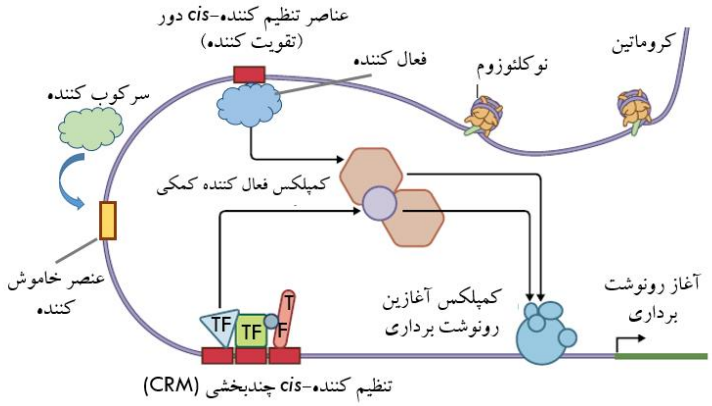
پروموترهای ژن‌هایی که به صورت مشترک در طی نمو دانه‌های گرده تنظیم می‌شوند، دارای عناصر تقویت کننده با توالی‌های کاملاً حفاظت شده می‌باشند (Twell et al., 1991). پروموتر ژن β-فازئولین[۹] لوبیای فرنگی، یکی از پروموترهای مختص بذر است که مطالعات زیادی در خصوص آن انجام شده است. مطالعات بیان تراژن با این پروموتر نشان داد که یک توالی به‌شدت غنی از AT در منطقه بالادست، برای بیان مختص بذر ضروری است. علاوه بر این، پروموتر شامل دو توالی تنظیم کننده مثبت بالادست به نام UAS1 (۲۹۵-تا ۱۰۹-) و UAS2 (۴۶۸-تا ۳۹۱-) و دُمین‌های تنظیم کننده منفی به نام‌های NRSI (۳۹۱-تا ۲۹۵-) و NRS2 (۵۱۸-تا ۴۱۸-) است. واکنش‌های ترکیبی بین دُمین‌های تنظیم کننده مثبت و منفی سبب تنظیم مکانی و زمانی این پروموتر می‌شود (Lalonde et al., 1986). توالی پروموترها می‌تواند با استفاده از ابزارهای محاسباتی در سایت‌هایی مانند PLACE و PlantCare آنالیز شود که در نتیجه آن TFهای فرضی شناسایی

[7] Constract
[8] Insertional
[9] β-phaseolin

می‌شوند که با هم‌ردیف سازی و مطالعات قابل آنالیز هستند. در این سایت‌ها، عناصر-cis شناسایی و تعیین خصوصیت شده متعددی ذکر شده و به مقاله مربوط ارجاع داده شده است. نتایج توالی‌های به دست آمده می‌تواند برای زیرکلون سازی به داخل وکتور بیانی و سپس تراریزش به داخل گیاه مدل (برای برآورد سطح بیان پروموتر جدا سازی شده)، استفاده شود.

تنوع در منطقه کد کننده یک ژن، از عوامل رایج ایجاد کننده تنوع آللی است. اما تغییر در سطح بیان ژن به سبب تنوع توالی در منطقه پروموتر نیز برای ایجاد تفاوت در صفات مهم است. مثال‌های بارز در تغییرات نوع دوم FZP و NOG1 در برنج (Bai et al., 2017; Huo et al., 2017) و tb1 در ذرت (Doebley et al., 1997) است. اخیراً در مطالعه‌ای در گیاه برنج نشان داده شد که جایگزینی یک G به جای A در منطقه پروموتر، سبب افزایش سطح بیان ژن TGW2 شده و در نتیجه آن، پهنا و وزن دانه کاهش یافت (Ruan et al., 2020). آنها استنتاج کردند که یک موتیف در حوالی SNP در پروموتر TGW2 می‌تواند با فاکتورهای رونویسی متعدد تنظیم شود. بنابراین، بهبود محصول دانه برنج می‌تواند با کاهش بیان TGW2 به‌دست آید.

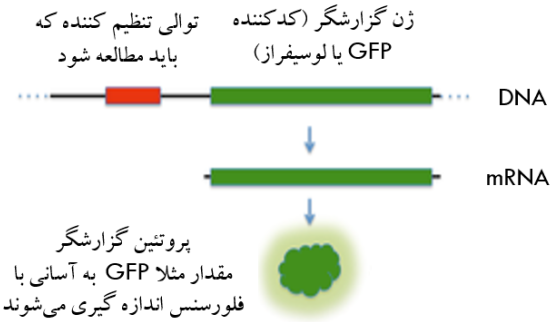
پیشرفت در شناخت پروموترهای گیاهی سبب شد تا محققین بتوانند پروموترهای جدید نوترکیب را طراحی و تولید کنند. شناسایی یک توالی تقویت کننده در CaMV 35S عامل ساخت پروموتر دوگانه 35S شد که سطح بیان را ۵ تا ۱۰ برابر افزایش داده بود (Kay et al., 1987) .



شکل ۱- مثالی از کارکرد تنظیم کننده‌های چندبخشی-cis و تقویت کننده. یک تنظیم کننده چندبخشی-cis (CRM) با چندین TF اتصال برقرار می‌کند. این کمپلکس TF به‌همراه یک فاکتور ورودی از یک عنصر تنظیم کننده-cis دور (CRE) که در نقش

تقویت کننده عمل می‌کند، سبب ایجاد کمپلکس فعال کننده کمکی و در نهایت ارتقاء رونوشت‌برداری می‌شود. در طی رونوشت‌برداری فعال‌کننده‌های کمکی یا خاموش‌کننده‌های کمکی و TF هم‌زمان به موتیف خاص DNA متصل و با ماشین رونوشت‌برداری متصل به پروموتر مرکزی کنش متقابل دارند (Griffiths et al., 2002; Krebs et al., 2017; Uno et al., 2000).

Figure 1. A cis-regulatory module and enhancer in action. Cis-regulatory modules (CRMs) can connect with various TFSs. TF complexes, in combination with an input factor from a distal cis-regulatory element, serve as activators and enhance transcription. During transcription, auxiliary promoters and suppressors bind simultaneously to the DNA motif and communicate with core promoters (Griffiths et al., 2002; Krebs et al., 2017; Uno et al., 2000).



شکل ۲- ساخت یک سازه حامل پروموتر ناشناخته از یک ژن به همراه توالی کدکننده ژن گزارشگر (از قبیل gus یا gfp). اندازه‌گیری مقدار کمی محصول آنزیم نشان دهنده مقدار رونوشت برداری ژن و به عبارتی قدرت و شرایطی است که پروموتر در آن بیان می‌شود.

Figure 2. The construct contains an unknown promoter and a reporter gene (such as gus or gfp). The amount of an enzyme is a measure of transcription, or the strength or condition in which the promoter is active.

۵- جداسازی پروموترهای گیاهی

مشخص است که فقط گروه کوچکی از ژن‌ها اختصاصاً در هر زمان بیان می‌شوند که به سلول یا بافت خاص، مرحله نمو و شرایط محیطی گیاه بستگی دارد. ابزارهای مولکولی و

رهیافت‌هایی که این رونوشت‌ها[10] را شناسایی کنند، به‌طور موفقیت آمیزی در گیاهان استفاده شده است و برخی از این مطالعات، منتهی به جداسازی پروموترهای گیاهی و اختصاصی سلول و بافت گردیدند (Porto et al., 2014). در اوایل دهه ۸۰ میلادی، جداسازی پروموترهای گیاهی از رهیافت‌های رایج شامل شناسایی cDNA و به‌دنبال آن جداسازی پروموتر از کلون ژنومیک ژن مربوط انجام می‌شد. در دو دهه بعدی، برای جداسازی بیشتر از روش‌های differential display، subtractive hybridization و برچسب‌زنی ژن/ پروموتر (با استفاده از T-DNA یا ترانس‌پوزون) استفاده شده است. در این روش‌ها نیازی به اطلاعات قبلی از توالی ژن یا محصول آن نیست (Datla et al., 1997).

۶- خصوصیات پروموترهای استفاده شده در تراریزش گیاهی

پروموترها بر اساس خصوصیات و جنبه‌های اختصاصی، به انواع مختلفی دسته‌بندی می‌شوند که انواعی از آنها تقریباً در تمام سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها در مراحل مختلف نمو فعال هستند که اصطلاحاً پروموترهای دائمی[11] (مانند پروموتر ژن‌های اصطلاحاً خانه‌دار) نامیده می‌شوند. این گروه ژن‌ها پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که در کارکردها و فعالیت‌های پایه‌ای سلول از قبیل متابولیسم کربوهیدرات یا بیوسنتز پروتئین دخالت دارند. گروه دوم پروموترهای زمانی-مکانی[12] هستند که عمدتاً در بافت‌های خاص، فقط در پاسخ به تنش غیرزیستی (شرایط غیرهوازی، رادیکال‌های اکسیژن سمی ...)، تنش زیستی (آلودگی با پاتوژن) یا در پاسخ به سیگنال‌های داخلی یا آسیب‌های فیزیکی فعال می‌شوند (Potenza et al., 2004). بر همین اساس، سبب بیان افتراقی ژن می‌شوند که به تغییرات در فعالیت رونوشت برداری آن در طی نمو یا در واکنش به وضعیت محیطی، اطلاق می‌شود.

علاوه بر این، برخی پروموترها را بیش از یک عامل تنظیم می‌کند، زیرا محصولات ژن مربوط برای گیاه در شرایط مختلف ضروری است. برای مثال پروموترهایی که در شرایط تنش‌های مختلف تنظیم می‌شوند، به برخی از هورمون‌ها و مراحل نموی خاص نیز واکنش نشان می‌دهند. برای مثال در توالی پروموتر Os03g01700 انواع گوناگون عناصر-cis مختص بافت از قبیل مختص برگ، مختص آندوسپرم، مختص دانه گرده، مختص بذر و مختص میوه شناسایی شده‌اند (Li et al., 2015). لیست کاملی از حدود ۱۵۰ پروموتر ایزوله شده گیاهی و خصوصیت آن‌ها در سایت PLACE و Strawberry لیست و قابل آنالیز می‌باشند (Datla et al., 1997) (جدول ضمیمه ۱). انتخاب پروموتر برای استفاده در داخل ساختار تراژن، اساساً به هدف پروژه بستگی دارد. تعداد زیادی پروموترها در منابع ذکر شده است

[10] transcripts
[11] Constitutive
[12] Spatio-temporal

که خصوصیات آن‌ها به خوبی مشخص شده و به تعدادی از آن‌ها در اینجا اشاره می‌شود که ابزارهای با ارزشی در مهندسی ژنتیک گیاهان هستند.

۶-۱- پروموترهای دائمی با منشأ ویروسی و منشاء گیاهی

خلق گیاهان تراریخت، اساس تحقیقات مهندسی ژنتیک گیاهی است که در آن‌ها ژن فرا بیان و در نهایت پروتئین مورد نظر در داخل سیستم تولید شود. رایج‌ترین پروموتر استفاده شده برای فرا بیان دائمی، پروموتر 35S است که از ویروس موزائیک کلزا (CaMV) به دست آمده است. لذا منشاء آن یک ویروس گیاهی است (Bak & Emerson, 2020; Odell et al., 1985; Amack & Antunes, 2020).

این پروموتر همانند سایر پروموترهایی که در سیستم‌های گیاهی استفاده می‌شوند، از ژنوم‌های DNA دو رشته‌ای جدا شده است، از RNA پلیمراز هسته میزبان استفاده می‌کند و به هیچ‌یک از محصولات ژنی ویروسی عمل کننده-trans وابسته نیست. به‌طور اختصاصی با ارزش بودن پروموتر 35S نه فقط به سبب ایجاد بیان بالا (تقریباً در تمام اندام‌ها و بافت‌های گیاه تراریخت)، بلکه دسترسی آسان به آن از طریق ارتباطات آکادمیک است و در کاست‌های وکتور تراریزش گیاهی وجود دارند که همین امر زیر کلون سازی [13] تراژن مطلوب را آسان می‌کند (Somssich, 2019). پروموتر CaMV 35S سطوح بالای بیان تراژن را در دولپه‌ای‌ها ایجاد می‌کند (Battraw & Hall, 1990). البته برخی دانشمندان مشاهده کردند که میزان بیان آن در تک لپه‌ای‌ها کمتر بوده و لذا از پروموترهای جایگزین در ذرت و برنج استفاده کرده‌اند (Nuccio, 2018). از طرفی مشخص شد که اندازه کامل پروموتر 35S اصلی (۹۴۱- تا ۹+) و قطعه‌ای از آن شامل نوکلئوتیدهای ۳۴۳- تا ۹+ از نظر فعالیت و عمل برابر هستند. لذا طول پروموتر 35S تیپیک معمولاً ۳۵۲-bp است (Fang et al., 1989).

اشکالاتی در استفاده از این پروموتر مشاهده شد؛ بدین معنی که بیان ژن‌های تحت کنترل CaMV 35S در مکان‌های تغذیه شده با نماتد به شدت کاهش و تنظیم منفی شده است (Urwin et al., 1997). گزارشاتی وجود دارد مبنی بر اینکه نه تنها ژن پایین دست، بلکه ژن‌های مجاور نیز تحت تأثیر این پروموتر قرار می‌گیرند که علت آن احتمالاً وجود یک تقویت کننده قوی است (Gudynaite-Savitch et al., 2009). در برخی تحقیقات مشخص شد که پروموتر در همه بافت‌ها و انواع سلولی فعال نیست و گاه دارای الگوی فعالیت لکه‌ای [14] است که در پروموتر اُبی‌کوئیتین مشاهده نشد (Holtorf et al., 1995). گرچه کاربرد و تجاری‌سازی آن به سبب گواهی

[13] Subcloning

[14] Patchy

ثبت اختراع چندگانه همپوشان[15] با محدودیت روبروست، اما این پروموتر همچنان یکی از رایج‌ترین پروموترهای غیرگیاهی مورد استفاده است (Cody & Scholthof, 2019). حدود ۸۰ درصد از گیاهان زراعی تراریخت، حامل این پروموتر هستند و چند دهه است که بدون اینکه تأثیرات سوء بر سلامت انسان از آنها ثبت شده باشد، از آن استفاده می‌شود (Commission, 2010; Science, 2012).

به سبب موفقیت پروموتر CaMV 35S، پروموترهای ویروسی دیگر استفاده و یا در حال سنتز می‌باشند. بسیاری از این پروموترهای با منشأ ویروسی عملکرد مشابه و یا بهتر از پروموتر CaMV 35S داشته‌اند و بیان بالایی را در تک لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها القاء کرده‌اند. این پروموترها شامل پروموتر ویروس موزائیک آوند کاساوا (CsVMV)، پروموترهای ویروس خطی موز استرالیایی (BSV)، پروموتر ویروس موزائیک لاله عباسی (MMV) و پروموتر ویروس موزائیک علف خنازیر (FMV) هستند (Dey & Maiti, 1999; Li et al., 2001; Makhzoum et al., 2014; Schenk et al., 2001). به طور کلی بسیاری از دانشمندان موافق استفاده از پروموتر داخلی و ابی‌کوئیتین هستند (Somssich, 2019).

پروموترهای داخلی برنج در بسیاری از موارد برای ایجاد بیان سطح بالای دائمی تراژن به کار می‌روند. این پروموتر های قوی دائمی از ژن های داخلی اکتین، ابی کوئیتین و غیره منشأ گرفته‌اند. پرو موتر برنج Act1 تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از پروموتر Adh1 ذرت در سلول‌های برنج، تراریخت فعال است که نشان می‌دهد منطقه ’5 در Act1 برنج حاوی یک پروموتر کارآمد برای استفاده در تراریزش برنج است (McElroy et al., 1990a; McElroy et al., 1990b). بیان ژن Act1 برنج مشابه با ژن های خانه‌دار دیگری همچون Tubulin، 18S rRNA و eIF-1α بهتر از ژن Ubiquitin 5 است و یکی از پایدارترین ژن های مرجع گزارش شده است (Caldana et al., 2007; Manna et al., 2016).

۶-۲- پروموترهای زمانی-مکانی

بیان دائمی یک ژن خارجی ممکن است منجر به آسیب به گیاه میزبان شود و مشکلات متعددی به وجود آورد. اگر یک تراژن خاص در زمان اشتباه فرا بیان شود، مثلاً در بافت‌هایی بیان شود که معمولاً در آنجا بیان نمی‌شود، و یا در سطح خیلی بالا بیان شود، می‌تواند عواقب غیرقابل پیش‌بینی بر رشد و نمو گیاه میزبان و به طور بالقوه بر محیط زیست داشته باشند (Hsieh et al., 2002; Zhong et al., 2006). گیاهان تراریخته با بیان دائمی قوی ژن و یا فاکتورهای رونویسی کارکردی، اغلب از فنوتیپ‌های نامطلوب آسیب می‌بینند. برای مثال، آرابیدوپسیس تراریخت 35S::DREB1A تأخیر در رشد و کاهش شدید در تولید بذر را نشان داد (Kasuga et al., 2004). به طریق مشابه، یک گوجه فرنگی تراریخته بیان

[15] Multiple overlapping patent

کننده 35S:CBF1 (Hsieh et al., 2002; Hsieh et al., 2004)، یک برنج تراریخته بیان کننده 35S::Adc (Capell et al., 1998) و یک تنباکوی تراریخت بیان کننده 35S::TPS1 (Romero et al., 1997) به‌ترتیب درجات متفاوتی از تأخیر در رشد، نمو غیرطبیعی و کاهش تولید بذر را نشان دادند. بیان دائمی ژن‌های AtCBF با فنوتیپ‌های منفی شامل برگ‌های کوچکتر، توقف رشد در گیاهان، تأخیر در گلدهی و کاهش یا فقدان تولید غده در گیاه سیب‌زمینی همراه بوده است. در حالی‌که همان شدت از مقاومت به یخزدگی، کنترل بیان AtCBF ازطریق پروموترهای القاءپذیر با تنش، بدون اینکه فنوتیپ‌های منفی مشاهده شود، به‌دست آمد؛ ضمن اینکه، همان سطح تولید غده در مقایسه با گیاهان وحشی مشاهده شد (Pino et al., 2007). OsPT2 یک ترانسپورتر جذب و تجمع کم فسفات آلی (Pi) در شاخه‌های گیاه برنج است. ژن کد کننده عمدتاً در ریشه‌های اولیه و ثانوی بیان می‌شوند و مسئول انتقال Pi از ریشه به شاخساره‌ها هستند. اما، فرا بیان ژن تحت کنترل 35S سبب تجمع Pi اضافی در شرایط کفایت Pi در سلول می‌کند و فرا بیان تأثیرات منفی بر رشد گیاهچه برنج داشته است (Liu et al., 2010). بیان دائمی سیگنال‌های انتقال که سوئیچ‌های اصلی مقاومت به پاتوژن در گیاهان هستند، می‌تواند سبب کاهش رشد شود و یا حساسیت به دیگر پاتوژن ها را افزایش دهد (Berrocal-Lobo et al., 2002; Bowling et al., 1997). بنابراین، برای حل این مشکلات لازم است که تعدادی پروموترهای مختص بافت یا القاءپذیر جداسازی شود تا بیان ژن هدف در گیاهان تراریخته کنترل شود. در برخی موارد مشاهده شده است که جایگزینی پروموترهای مختص بافت با انواع دائمی سبب شده است تا بیان تراژن بدون آسیب به سایر بافت‌ها، حتی چند برابر شود (Cai et al., 2007; Hajiahmadi et al., 2017; Tanabe et al., 2015).

اخیراً تکنیک‌های تراریزش چندژنی[16] ابداع شده اند و موتانت‌هایی با مکان‌های ژنی یا لوکوس‌های گروه چندگانه تراژن‌های پایدار (SMART) تولید می‌شوند. انتقال هم‌زمان ژن‌های چندگانه به گیاهان، محققین را قادر می‌سازد تا کل مسیرهای متابولیکی را مطالعه و دستکاری کنند، پروتئین‌های مولتی‌مری یا کمپلکس‌های پروتئینی را بیان کنند و کنترل‌های ژنتیکی مدارها[17] و سلسله مراتب تنظیم کنندگی را کنترل کنند (Naqvi et al., 2010). در همین خصوص استفاد از پروموترهای چندگانه مدنظر قرار دارد. زیرا، هر تراژن اضافی نیازمند پروموتر خاص خود است. لذا لازم است پروموترهای متفاوت که پروفیل بیان یکسان یا بیان هماهنگ شده داشته باشند، برای هر تراژن یافت شود، و یا اینکه یک پروموتر خاص چند بار در یک گیاه تراریخت استفاده شود. در مورد اول ممکن است کمبود پروموتر با پروفیل بیانی مطلوب وجود داشته باشد. لذا، بسیاری از

[16] Multigene transformation
[17] Circuits

دانشمندان به دنبال ایزوله کردن و جداسازی پروموترهای زمانی-مکانی جدید هستند. در حالی که در مورد دوم، ورود تعمدی توالی‌های تکراری به داخل لوکوس در برخی موارد تأثیرات جانبی سوء بر بیان و پایداری تراژن داشته باشد (Peremarti et al., 2010).

لازم است فرا بیان دائمی تراژن‌هایی که در فرآیندهای طبیعی گیاه اختلال ایجاد کنند، اصلاح شود. ایجاد پروموترهای مکانی - زمانی با فعالیت مختص بافت یا مختص مرحله‌ای خاص از رشد - به منظور فعال کردن بیان یک تراژن - کمک می‌کند تا این نیاز برطرف شود. بیان هدفمند[18] بخصوص برای تولید گیاهان زراعی آینده اهمیت دارد. زیرا، افکار عمومی تراژنِ با بیان کمتر را بهتر می‌پذیرد (Potenza et al., 2004). برای مثال، محدودسازی[19] محصول حشره‌کشی تراژن به بافت‌هایی که حشرات آفت به آن‌ها حمله می‌کنند، به جای تولید آن در اندام‌های قابل برداشت و مصرف، می‌تواند به‌طور بالقوه مانع از شکست پروژه‌های مختلف تولید گیاهان زراعی تراریخت یا به‌عبارتی کنار گذاشتن کامل آنها شود. علاوه‌براین، استفاده از پروموترهای یکسان مانند 35S در بیان چندگانه تراژن‌های کد کننده پروتئین‌های خارجی به‌دلیل خاموشی رونوشت‌ها، توصیه نمی‌شود (Naqvi et al., 2010). از دیدگاه زیست محیطی، نگرانی‌ها از اینکه فرا بیان دائمی سم باکتری باسیلوس تورین‌جینسیس در گیاهان زراعی مقاومت به حشرات هدف را افزایش دهد، سبب شد تا "آژانس محافظت از محیط زیست[20]" قوانینی به‌منظور مدیریت مقاومت با کاشت پناهگاه[21] گیاهان زراعی رایج را اعلام کند. پروموترهای گیاهی که به طور دقیق در زمان و مکان مورد نیاز، فعال شوند ایده‌آل‌ترین گزینه برای استراتژی‌های مهندسی به منظور افزایش مقاومت به بیماری‌ها می‌باشند.

ایجاد پروموترهای مختص-بافت برای اهداف مهندسی ژنتیک می‌تواند پیچیده باشد. طول قطعه پروموتر جداسازی شده بر بیان آن تأثیر دارد. زیرا عناصر تقویت‌کننده cis در '5 ممکن است در جریان ایزوله کردن پروموتر حذف شوند. واکنش‌های متقابل trans بالقوه که بر اساس ساختار یا مکان کروماتین در داخل ژنوم اتفاق می‌افتد نیز می‌تواند با تلفیق تصادفی تراژن به‌داخل ژنوم میزبان، از بین برود. ممکن است کنش‌های متقابل مؤثر بین عناصر-cis پروموتر با فاکتورهای عمل کننده-trans هترولوگوس موجود در گیاه میزبان تراریخت، وجود نداشته باشد. اطلاعات بیشتری در خصوص فعالیت پروموترهای هومولوگوس و هترولوگوس در گیاه میزبان هدف در تلاش به‌منظور بهبود و کارایی بیان تراژن، ضروری است. شاید بهتر باشد بسیاری از پروموترها را

[18] Targeted expression
[19] Confinement
[20] Environmental Protection Agency
[21] Refuges

"تقویت شده در بافت[۲۲]" نامید زیرا، بیان آن‌ها کاملاً محدود به یک بافت یا بخش گیاه نیست (Potenza et al., 2004).

۶-۲-۱- پروموترهای مختص میوه.

تولید عناصر غذایی میکرو و واکسن‌های خوراکی در یک ناقل خوراکی مانند میوه نیازمند بیان مختص/ تقویت شده در میوه است. آنتی‌ژن‌های نوترکیب بیان شده در بافت‌های خوراکی گیاهان آن‌ها را به واکسن‌های "کپسول شده زیستی[۲۳]" طبیعی تبدیل می‌کند.

پروموتر ژن‌های مرتبط با رسیدگی میوه به سبب خصوصیات بالقوه آن‌ها، در بیان مختص-میوه تراژن ها مورد نظر دانشمندان قرار گرفته‌اند. در تحقیقی یک پروموتر مختص میوه در گوجه فرنگی به نام پروموتر هیستیدین دی کربوکسیلاز-A (SlHDC-A) جداسازی شد (Kim et al., 2019).

با استفاده از تکنیک توالی‌یابی- RNA و آنالیز RT-PCR مشخص شد که این آنزیم عمدتاً در میوه بیان می‌شود و بیان آن در طی رسیدن میوه، پایدار است. برای آزمون اختصاصی بودن بیان ژن در میوه، گوجه فرنگی تراریخته با استفاده از ساختار SIHD-A::GUS تولید شد. در مقایسه با 35S::GUS تراریخت، موتانت اول بیان GUS فقط در میوه مشاهده شد. ضمن اینکه، شدت فعالیت GUS در میوه در این موتانت حدود ۱۰ برابر بیشتر از موتانت 35S::GUS بوده است. آنالیز حذف هم مشخص کرد که منطقه پروموتر مرکزی آن از ۸۸۰- تا ۵۷۷- است (Chung et al., 2020) (جدول ضمیمه ۲).

۶-۲-۲- پروموترهای مختص دانه یا بذر.

بذور بسترهای مناسب برای تولید محصولات تراریخت هستند. بیان مختص-بذر تراژن برای کاربردهای متعددی از مهندسی ژنتیک ازجمله بهبود و کیفیت مواد غذایی بذر، کیفیت کاربردی دانه آسیاب شده و تولید ترکیبات صنعتی و دارویی استفاده می‌شود. اما، تولید محصولات مصرفی یا صنعتی از تحقیقات پایه متمرکز بر فرآیندهای رشد و نمو گیاه بخصوص تنظیم نمو بذر بهره می‌برند (Bak & Emerson, 2020; Cahoon & Shanklin, 2000; Ye et al., 2009).

پروتئین‌های ذخیره بذر در سطوح بالا، در طی نمو بذر بیان می‌شوند و پروموترهای این ژن‌ها یک هدف با ارزش برای استفاده در تکنولوژی مهندسی ژنتیک می‌باشند. پروموترهای اختصاصی بذر که عامل بیان تراژن در بذر هستند، در مهندسی ژنتیک بذر بسیار اهمیت دارند و در فارمینگ مولکولی گیاه، از قبیل برنج با توانایی تولید ویتامین A معروف به برنج طلایی (Paine et al., 2005)، آندوسپرم خاکستری برنج یا گیاه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی زیاد (Zhu et al., 2017)، جنین خاکستری ذرت (Liu et

[22] Tissue enhanced
[23] Bioencapsulated

al., 2018) و کانولا با توانایی تولید روغن ماهی امگا-۳ (Napier et al., 2019) مورد نظر هستند.

پروموترهای مختص-بذر دو لپه‌ای برای القاء بیان مختص-بذر استفاده شده‌اند که از جمله ژن β-کونگلایسینین[۲۴] است که بیان آن به فاز میانی تا پایانی بلوغ جنین محدود است و ژن‌های هلیانتینین[۲۵] گیاه آفتابگردان که طول کامل پروموتر آن (۲۳۷۹- تا ۲۴bp+) بیان سطح بالا و مختص-بذر را در تنباکو ایجاد کرد (Nunberg et al., 1994). پروموتر دیگر که خصوصیات آن به خوبی مشخص شده است ژن β-فازئولین لوبیای فرانسوی است که بیان قوی و مکانی پروموتر آن محدود به بذور در حال نمو تنباکو تراریخت بوده است (Sengupta-Gopalan et al., 1985). منطقه ۲۹۵bp- آن، مخصوصاً بیان بالا در آندوسپرم و جنین را نشان داد. مناطق اتصال ماتریکس (MARS) یافت شده در مجاور ژن β- فازئولین نیز زمانی که در ساختار تراژن وارد شد، سبب تقویت رونوشت برداری بوده است (van der Geest & Hall, 1997). آنزیم فرآوری واکوئل یک پروتئیناز سیستئین تنظیم کننده بلوغ واکوئلی است و مرگ برنامه‌ریزی سلولی را در گیاهان انجام می‌دهد. نتایج نشان داد که ژن کدکننده تیپ□ این آنزیم حاوی یک پروموتر مختص بذر است. جالب اینکه آنالیز حذف پروموتر نشان داد که اختصاصی بودن بذر پروموترِ ژن کد کننده این آنزیم، زمانی از دست رفت که منطقه ۱۰۴۶- تا bp ۱۳۰۶- حذف شد (Gong et al., 2019) (جدول ضمیمه ۳).

۶-۲-۳- پروموترهای مختص گل‌ها و اجزاء آن‌ها.

رنگ یکی از مهم‌ترین جنبه‌های ظاهری گل‌هاست و ارزش اقتصادی زیادی در بازار گل بریده ایجاد می‌کند. رنگ گل یکی از اهداف مهم در به‌نژادی گل است. یک رهیافت تراریخت موفق برای تغییر رنگ نیازمند تراژن و پروموتر مختص گل است. آنتوسیانین‌ها در بروز پیگمان‌های بصری و تولید رنگ‌های نارنجی، قرمز و آبی نقش دارند. لذا هرگونه تغییر و تقویت ژن‌های کدکننده آنتوسیانین‌ها در تولید ارقام با ارزش تجاری بالاتر نقش دارد (Kim et al., 2018). بر همین اساس، تحقیقات زیستی در خصوص جستجو برای پروموترهای مختص-گل برای تولید گیاهان تراریخت و گل‌های با ارزش اقتصادی فراوان انجام شده است. خصوصیات و صفاتی مانند مقاومت به آفات، افزایش عمر گلدانی، تغییر رنگ و عطر مطلوب برای تولید گل‌های تازه نیز از اهداف مهم است (de Vetten et al., 1999). نرعقیمی را به‌نژادگران گیاهی به منظور استفاده در تولید بذر هیبرید، از بین بردن خاصیت آلرژی‌زایی دانه‌های گرده و اجتناب از انتقال افقی دانه‌های گرده از گیاهان GM استفاده می‌کنند. حذف سلولی ژنتیکی برای تحقیق در خصوص گامتوژنسیس نر و ابزار بیوتکنولوژیکی برای تولید گیاهان مهندسی شده نرعقیم با استفاده از پروموتر مختص-

[24] β-conglycinin
[25] Helianthinin

دانه گرده یا -بساک استفاده شده است. این پروموترها معمولاً به یک ژن سمی امتزاج می‌یابند و سبب مرگ سلول زایشی هدف می‌شوند (Millwood et al., 2016; Yue et al., 2017). برای مثال، ژن ریبونکلئاز بارنیز [۲۶] تحت کنترل پروموتر ژن اختصاصی-بساک گیاه نخود (PsEND1) به گیاه زراعی مختلف از جمله بقولات منتقل و ضمن فقدان هرگونه تأثیرات سوء بر فنوتیپ، باعث تحلیل رفتن بساک در ابتدای نمو و مانع تولید دانه گرده بالغ در همه گونه‌های گیاهی مورد آزمون شد (Roque et al., 2019) (جدول ضمیمه ۴).

ایجاد گیاهان نر عقیم با استفاده از بیان هدف‌دار تراژن در دانه گرده که بر اساس آن نسل دوم بذور تراریخت عقیم باشد، بحث‌های زیادی را نیز به دنبال داشته است. به نظر می‌رسد آنچه تحت عنوان "تکنولوژی محدودیت در استفاده ژنتیکی" (GURT) یا "تکنیک خاتمه دهنده"[۲۷] نامیده می‌شود، اصولاً ایجاد شده‌اند تا به‌طور قابل ملاحظه‌ای کابوس "آلودگی" حاصل از تراژن‌ها با دریفت دانه گرده کاهش یابد. اما، فعالان محیط زیست که مخالف موجودات مهندسی شده (GMO) هستند و نیز بخش‌های "کسب و کار کشاورزی [۲۸]" که گیاهان تراریخت را برای اهداف تجاری تولید می‌کنند، هدف تکنولوژی‌های خاتمه دهنده را راهی برای کنترل تولید بذر می‌دانند (Shiva et al., 2000).

پروموترهای مختص-مادگی، -بساک یا -دانه گرده بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. بیان مختص-بساک و مختص-دانه گرده می‌توانند به دو فاز اصلی تقسیم شوند. در فاز اول یا"زودهنگام" ژن دارای پروموترهای مختص بساک و در طی نمو بساک و شکل‌گیری بافت و سلول‌های اسپوروفیتیک [۲۹] بیان می‌شوند. فاز دوم یا بیان "دیر هنگام" شامل ژن‌های مختص-بساک و مختص-دانه گرده هستند که در طی تولید گامتوفیت [۳۰] و شکل‌گیری دانه گرده و بلوغ بیان می‌شوند (Wang et al., 2020). پروموترهای خانواده مختص دانه گرده دیرهنگام L. esculentum به خوبی مطالعه شده‌اند و توالی‌های آنها توصیف شده و مشخص شده است که بیان مختص دانه گرده را تنظیم می‌کند (Eyal et al., 1995). پروموتر ژن‌های با بیان زودهنگام عموماً مختص-بساک محسوب می‌شوند. این ژن‌ها زمانی بیان می‌شوند که مورفولوژی بساک پایه‌ریزی می‌شود، سلول‌های داخل بساک درحال تمایز هستند و سلول‌های مادری میکروسپور در حال انجام تقسیمات میوز هستند تا میکروسپورها تولید شوند (Potenza et al., 2004; Roque et al., 2019).

[26] *barnase*
[27] Terminator technique, suicide seed
[28] Agribusiness
[29] Sporophytic
[30] Gametophytic

پروموترهای اختصاصی گرده و بساک مانند پروموترهای اختصاصی مراحل آخر تشکیل گرده (OsLSP)، می‌توانند برای غیرفعال شدن گرده و ایجاد نر عقیمی در برنج با هدف تولید گیاهان هیبرید، استفاده شوند (Wang et al., 2015). از پروموترهای مختص بساک برنج که بیان قوی و سازنده‌ای از تراژن‌ها را تحت شرایط تنش سرما امکان پذیر می‌سازد، پروموترهای OsACE1، OsCER1، OsMADS58 و OsPGT1 گزارش شده اند که در ریشه‌ها و قسمت‌های هوایی گیاهچه و دانه‌های بالغ خاموش هستند و بیان قوی در بافت بساک نشان می‌دهند (Kato et al., 2010) (جدول ضمیمه ۴).

تاکنون تعدادی از پروموترها تحت عنوان مختص دانه‌گرده در گونه‌های مختلف شناسایی شده‌اند، اما پروموترهای اختصاصی قوی که بتواند در تحقیقات گیاهان مختلف به کار رود، محدود و کم است (Khurana et al., 2012). در میان پروموترهای شناسایی شده، بسیاری از آنها وقتی به سیستم هترولوگوس مثلاً آرابیدوپسیس منتقل می‌شوند، بیان قطعی و مختص دانه گرده ندارند و برای استفاده روتین و به عنوان ابزار تنظیم کننده در برخی تراریزش‌های غلات مشکل‌زا هستند (Li et al., 2020).

یک ژن داخلی کدکننده "پروتئین گسترش یافته ابی‌کوئیتین" (UEP1) از گیاه کریزانتموم با ژن گزارشگر GUS امتزاج یافته و برای بیان مختص بافت استفاده شد. گیاه کریزانتموم با این ساختار که حاوی 1.45 kb پروموتر UEP1 بوده است، تراریخت و بیان تقویت شده-گل از ژن گزارشگر در پرتوگل[31] و صفحه[32] گلچه‌ها مشاهده شد اگرچه، بیان ۹ برابر در برگ‌ها کمتر بوده است. این ساختار در مقایسه با ساختاری که پروموتر CaMV 35S را داشته است، ۸۵-۴۰ برابر بیان بالاتری را در گل ایجاد کرده بود (Annadana et al., 2002). OsSUT3 عضوی از خانواده ژنی انتقال‌دهنده ساکارز است که به‌شدت در دانه‌های گرده در حال نمو بیان می‌شود و نقش اصلی را احتمالاً در انتقال ساکارز به دانه گرده برای تجمع نشاسته ایفا می‌کند که مناطق مختلف پروموتر ایزوله و تعیین خصوصیت شده‌اند (Li et al., 2020).

۶-۲-۴- پروموترهای مختص گره‌های ریشه وابسته به لگوم - ریزوبیوم.

ژن‌های گیاهی مختص-گره (ژن‌های ENOD) در گروه ژن‌هایی به نام نودولین[33] گروه‌بندی می‌شوند. ژن‌های بیان شده در ابتدای اندام‌زایی گره نودولین‌های اولیه (زودهنگام[34]) نامیده می‌شوند؛ مانند پروموتر ژن VFEnod12 از گیاه باقلا که بیان ژن گزارشگر را در سلول‌های کوتیکول ریشه تلقیح نشده گره‌های جوان، پریموردیای گره و ناحیه II گره‌های تراریخت فعال می‌کند

[31] Ray floret
[32] Disk
[33] Nodolins
[34] Early nodulins

(Frühling et al., 2000). این گروه از ژن‌ها قبل از شروع تثبیت نیتروژن بیان می‌شوند. در حالی که ژن‌هایی که بعد از شروع تثبیت نیتروژن بیان می‌شوند، نودولین‌های دیرهنگام[۳۵] نامیده می‌شوند مانند پروموتر Npv30 (۸۶۸- تا ۶۷-) که فعالیت GUS را فقط در گره گیاهان تراریخت Phaseolus vulgaris نشان داد. بسیاری از پروموترهای نودولین دیرهنگام، شامل موتیف‌های حفاظت‌شده نودولین AAAGAT و CTCTT هستند. گروه دوم احتمالاً در فعالیت‌های متابولیکی ضروری برای کارکرد گره‌ها نقش دارند. اغلب کارهای تحقیقاتی که روی پروموترهای نودولین انجام شده است، در جهت مطالعه گره‌ها و اینکه نودولین‌ها کجا و چه زمانی در طی نمو گره و متعاقباً مرحله تثبیت نیتروژن بیان می‌شوند؛ و اینکه کارکرد نودولین‌ها چگونه است (Laplaze et al., 2007) (جدول ضمیمه ۵).

۶-۲-۵- پروموترهای مختص سلول

تعدادی از پروموترهای گیاهی مختص سلول وجود دارند که می‌توانند از یک نوع سلول خاص ایزوله شوند. یکی از انواع آن‌ها، پروموترهای مختص-تریکوم [۳۶] هستند که بافت تغییریافته ساختمان اپیدرم در سطح گیاهان گل‌دار است. دو نوع تریکوم بر اساس ظرفیت تولید، ترشح یا نگهداری مقادیر قابل توجه متابولیت‌های ثانوی قابل تمایز هستند: ۱- تریکوم‌های غیر غده‌ای و یا کرک‌های برگ که فقط نقش فیزیکی دارند؛ مانند جلوگیری از حمله حشرات، جلوگیری از از دست رفتن آب و محافظت در مقابل نور UV و ۲- تریکوم‌های غده‌ای که حاوی یک تا ده غده در قسمت نوک تریکوم هستند.

اهمیت مطالعه پروموترهای مختص-تریکوم متفاوت و برای بررسی فرآیندهای تریکوم قابل استفاده است. مثلاً یکی از آنها مطالعه و شناسایی TFهایی است که مستقیماً بیان ژن‌های مسیر بیولوژیکی تریکوم را فعال می‌کنند و اطلاعات نسبتاً کمی از آنها در دسترس است (Shen et al., 2016) .علاوه بر مهندسی ژنتیک، در دسترس بودن تنظیم کننده‌های مختص تریکوم، می‌تواند به تغییر صفات مرتبط با تریکوم کمک کند. برای مثال تنظیم بیان TFهای اختصاصی کنترل‌کننده تمایز و نمو تریکوم‌ها می‌تواند منجر به افزایش تراکم آنها شود که یک اصلاح و بهبود در تولید مواد ترشحی از تریکوم را به دنبال دارد و شامل موادی مانند اسانس‌ها و ترکیبات فرار[۳۷] است. افزایش در مقاومت به حشرات آفت یا دیگر پاتوژن‌ها به واسطه تریکوم نیز می‌تواند بدین طریق ایجاد شود (Tissier, 2018). پروموترهای ژن سیتوکروم P450 از تنباکو (Lange & Croteau, 1999) و همچنین پروموتر ژن CYP71D16 تنباکو از جمله پروموترهای مختص-تریکوم هستند. مطالعه کاربردی ژن دوم در گیاهان تراریخت و در امتزاج با ژن GUS نشان داد که در مراحل اولیه خروج ریشه تا در برگ‌ها، ساقه‌ها و گل و

[35] Late nodulins
[36] Trichome
[37] Essential oils

در تمام مراحل نمو به شدت در تریکوم بیان شده بود (Wang et al., 2015) (جدول ضمیمه ۶).

پروموترهای مختص-روزنه یا سلول‌های محافظ از آن جهت مطالعه شده‌اند که بازشدن و بسته‌شدن روزنه‌ها می‌تواند کاربرد وسیعی در کنترل واکنش گیاه به تغییرات محیطی شامل خشکی و گرما داشته باشد (Lawson & Matthews, 2020). روزنه‌ها در حقیقت محل تلاقی مدیریت تولید بیوماس و مدیریت آب در گیاه هستند.

تحقیقات در خصوص رسپتورها و اجراکننده در کنار پروتئین‌های دخیل در رشد و نمو سلول‌های محافظ، سبب شناسایی، جداسازی و آنالیز کارکردی تعداد حدود ۱۵ ژن و پروموتر معروف به مختص سلول محافظ [۳۸] شده است) Han et al., 2013). Quan et al., 2018) (جدول ضمیمه ۷).

۶-۲-۶- پروموترهای مختص ریشه.

پروموترهای مختص ریشه دامنه وسیعی از کاربردهای بالقوه و توانایی افزایش بیان پروتئین‌های داخلی و خارجی در ریشه را دارند. استفاده از آنها به‌منظور افزایش مقاومت گیاه به پاتوژن و آفت، افزایش مقاومت به گرما، شوری، خشکی، بهبود ارزش غذایی ریشه‌های خوراکی یا تولید پروتئین‌های نوترکیب به منظور فارمینگ مولکولی و گیاه پالایی رایج است (Jeon et al., 2000; Shen et al., 2000; Werner et al., 2010) (جدول ضمیمه ۸).

در گیاه برنج از پروموترهای ریشه برای بهبود سیستم ریشه‌ای، افزایش مقاومت به تنش خشکی (Gao et al., 2014; Jeon et al., 2000; Li et al., 2005; Redillas et al., 2012); کاهش جذب عناصر خطرناک مانند آرسنیک (Deng et al., 2018)، بهبود جذب عناصر ماکرو و میکرو به طور مثال بهبود جذب فسفر از طریق فرا بیان یک ناقل فسفر به نام OsPT2 در محدوده ریشه استفاده شده است. علاوه بر تمامی کاربردهای ذکر شده از بیان اختصاصی ژن در ریشه، به‌وسیله آن می‌توان از اثرات مخرب بیان دائمی ژن در سراسر گیاه نیز جلوگیری کرد (Li et al., 2019).

پروموترهای مختص ریشه برای القاء بیان ژن مختص ریشه ضروری و برای بهبود برداشت مواد غذایی و آب استفاده می‌شوند. برای مثال، در زمینه مهندسی ژنتیک برای زیست‌پالایی[۳۹]، ژن ACC دی‌آمیناز وقتی تحت کنترل پروموتر مختص ریشه و به منظور زیست پالایی آلودگی‌های خاک به گیاه گوجه فرنگی انتقال یافت، مقاومت بالاتری نسبت به یون های فلزی سنگین (Cd, Co, Ni, Pb, Zn) در مقایسه با موتانت با پروموتر دائمی نشان داد (Fasani et al., 2018; Grichko et al., 2000).

[38] Guard cell-specific

[39] Bioremediation

پروموتر RCc3 برنج با شماره دسترسی AK109149) نیز از جمله این پروموترها است. پروموترهای اختصاصی ریشه Os03g01700 و Os02g37190 برنج در بافت های ریشه ای برنج بسیار فعال هستند و می‌توانند برای تقویت بیان اختصاصی ژن‌های هدف در ریشه مفید باشند. همچنین، با بررسی داده‌های میکرو اریز و آنالیز PCR در زمان واقعی، ۳ ژن با بیان اختصاصی ریشه به نام های rRSG1 (Os02g0658100)، rRSG3 (Os07g0646800) و rRSG5 (Os04g0423800) شناسایی شدند. (Huang et al., 2015).

۶-۲-۷- برگ‌ها و بافت‌های سبز.

بافت‌های واجد کلروفیل مانند برگ، غلاف، خوشه و ساقه بیان ژن‌های قابل القاء با نور را حمایت می‌کنند. پروموترهای با بیان بالا در برگ یا پروموتر ژن‌های مرتبط با فتوسنتز مانند BiGSSP7 برای به‌نژادی تراریختی و بهبود مقاومت به بیماری و آفات در برگ برنج (Chen et al., 2010; Ye et al., 2009)، تحقیقات در خصوص فتوسنتز (Cao et al., 2019) و پیری برگ (Zhu et al., 2017) و غیره مناسب هستند. پروموترهای مختص ساقه برای آسانی تحقیقات در مطالعات طویل شدن ساقه و مقاومت به آفات قابل استفاده هستند. تعدادی پروموترهای مختص بافت سبز در برنج شناسایی شده‌اند، اما اغلب آنها در حقیقت در سلول‌های مزوفیل بیان می‌شوند. لذا یافتن پروموترهایی که در سایر بافت‌های سبز بیان شوند، از اهمیت بالایی در مهندسی ژنتیک برخوردار است (جدول ضمیمه ۹).

PD_{540} یک پروموتر مختص بافت سبز است. پنج عنصر-cis مختص بافت از این پروموتر شناسایی و نامگذاری شد. LPSE1 بیان ژن را در برگ و خوشه جوان فعال کرد. LPSRE2 بیان ژن را در برگ، ریشه، خوشه جوان و ساقه سرکوب کرد PSE1 بیان ژن را در خوشه جوان و ساقه سرکوب کرد. عناصر LPSRE1 و LPSE2 در تنظیم بیان ژن مختص بافت دارای نقش دوگانه بودند بدین طریق که هر دو فعال کننده در برگ اما، LPSRE1 سرکوب کننده در ساقه و LPSE2 سرکوب کننده در خوشه جوان و ریشه عمل کردند (Cai et al., 2007).

۷ - پروموترهای القاء شدنی

یک وضعیت ایده‌آل در تحقیقات برای جلوگیری از بیان نابجای[40] تراژن، توانایی در استفاده از سیستمی است که بیان را به‌طور دقیق بر اساس هدف، زمان مطلوب و مرحله نمو گیاه روشن یا خاموش کند. بدون شک مفیدترین پروموترها در گیاهان انواعی هستند که به‌تغییرات محیطی واکنش نشان می‌دهند. قبلا آثار سوء و فنوتیپ‌های غیرطبیعی و ناهنجار حاصل از بیان دائمی تراژن‌ها با استفاده از پروموترهای مربوط بحث شد. بنابراین، مطلوب است که گیاهان تراریخته‌ای تولید کرد که محصولات

[40] Misexpression

تراریخته فقط در موقع نیاز و یا به‌عبارتی تحت شرایط تنش تجمع یابد تا از بیان نابجا و از به‌وجود آمدن فنوتیپ غیرطبیعی حاصل از بیان دائمی تراژن اجتناب شود. (Verma et al., 2007). از طرفی، بیان هدفمند تراژن‌ها با استفاده از پروموترهای مختص-بافت یک تکنیک قوی برای کنترل بیان ژن است اما، این نوع کنترل همچنان به گیاه و الگوی بیان فاکتورهای فعال کننده-trans داخلی بستگی دارد. از معایب پروموترهای هترولوگوس آن است که وقتی در جنس‌ها، گونه‌ها یا حتی ارقام مختلف یک گیاه خاص استفاده می‌شوند ممکن است متفاوت عمل کنند. سیستم‌های پروموتر القاء شدنی (و سرکوب شدنی) با استفاده از مؤلفه و اجزاء داخلی و خارجی مزیت‌های بالقوه متعددی نسبت به برخی سیستم‌های مختص-بافت دارند (Potenza et al., 2004). پروموترهای القاء شونده با انجام تنش‌های متعدد جداسازی و تعیین خصوصیات شده‌اند. علی‌رغم تلاش‌های فراوان برای تعیین خصوصیت پروموترهای القاءپذیر با تنش، تعداد خیلی کمی از آنها برای بروز پاسخ به استرس‌ها در طی طیف‌های مختلف رشدی گیاهان تراریخت، آنالیز شده‌اند (Yi et al., 2010). نمونه‌ای از چنین پروموترهای القاءپذیر با تنش شامل OsABA2 برنج و RD29A آرابیدوپسیس است که نشان داده شده است در تمام بافت‌ها و مراحل رشد گیاهان تراریخت مؤثر هستند. بنابراین، در حال حاضر کمبود نسبی در پروموترهای کارا برای بیان تراژن القاءپذیر با تنش بخصوص در گیاهان تک لپه وجود دارد. چنانچه قبلاً اشاره شد به‌منظور تجمع محصول ژن‌های متفاوت نیز به پروموترهای متفاوت نیاز است تا خاموشی اتفاق نیفتد (Yi et al., 2010).

تعداد زیادی از پروموتر های القاءپذیر در گیاهان شناسایی شده‌اند که در سه گروه مختلف طبقه بندی می‌شوند: ۱) انواعی که به سیگنال های داخلی (هورمون های گیاهی) پاسخ می‌دهند، گسترده‌ترین پروموترهای واکنش دهنده به هورمون انواعی هستند که توسط جیبرلین‌ها، اکسین‌ها، آبسسیک اسید القاء می‌شوند حتی پروموترهای واکنش دهنده به هورمون‌های خارجی و هترولوگوس (از منشاء حشرات و پستانداران) نیز مفید هستند زیرا، به خودی خود مسیرهای بیولوژی داخلی را فعال نمی‌کنند (Padidam et al., 2003)، ۲) انواعی که به محرک‌های فیزیکی خارجی پاسخ می‌دهند (تنشهای زیستی و غیرزیستی). القاء کننده‌های خارجی پروموترهای مصنوعی شامل عناصر فیزیکی و شیمیایی هستند. مثالی از پروموترهای تنظیم شونده با عناصر فیزیکی شامل پروموترهای تنش گرمایی، پروموترهای القاءپذیر با سرما، پروموترهای القاءپذیر با نور و پروموترهای القاءپذیر با زخم هستند (Dutt et al., 2014) و ۳) انواعی که به محرک‌های شیمیایی خارجی واکنش نشان می‌دهند (Zuo & Chua, 2000). پروموترهای القاءپذیر با مواد شیمیایی شامل پروموترهای القاء شونده با الکل، پروموترهای تنظیم شونده با تتراسایکلین، پروموترهای

واکنش دهنده به استروئید از قبیل پروموتر رسپتور گلوکوکورتیکوید[41]، پروموترهای رسپتور استروژن[42] و اکدایزون[43]، پروموترهای واکنش دهنده به فلزات و پروموترهای مرتبط با بیماری‌زایی هستند.سه مورد از مهمترین سیستم های القاءپذیر در گیاهان، سیستم‌های القاءپذیر با الکل، با گرما و با استروئید می‌باشند . (Corrado & Karali, 2009; Sharma & Sharma, 2009)

۷-۱- پروموترهای القاء شدنی با تنش‌ها و زخم.

در گیاهان انواع مختلفی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی تعداد زیادی از ژن‌ها را القاء می‌کنند. تنش‌ها شامل طیف وسیعی از تغییرات محیطی مانند سرما، گرما، نور UV، شوری یا فلزات سنگین خاک، کمبود یا طغیان آب، یا حمله علف خوارها و عوامل بیماری‌زا یا پاتوژن است که زخم‌های موضعی را در گیاهان ایجاد می‌کنند. وقتی یک گیاه زخمی شود، ژن‌ها به‌منظور دفاع و تعمیر فعال می‌شوند، آنزیم‌هایی القاء می‌شوند تا مواد شیمیایی دافع تولید شود، و پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها تولید می‌شوند تا سیگنال‌هایی مبنی بر بروز حمله، به سرتاسر گیاه به‌طور سیستماتیک ارسال شود. ژن‌های القاء شده با تنش یا دفاعی دارای پروموترهای مفیدی هستند که خصوصیات آن‌ها به‌خوبی شناخته شده است. بسیاری از این پروموترها با ارزش هستند زیرا، آن‌ها بیان هدف‌گیری شده را اختصاصاً در نقطه زخم یا آلودگی تنظیم می‌کنند. این خصوصیات، پروموترهای القاء شدنی با زخم و تنش را به طور بالقوه برای مهندسی ژن‌های مقاومت یا پروتئین‌های با خاصیت حشره‌کشی مناسب ساخته است؛ به گونه‌ای که فقط در زمان حمله آفت فعال می‌شوند، درحالی که سیستم‌های القاء سیستمیک یا عمومی دارای پتانسیل محافظت از کل گیاه از تنش‌های موجود است.

ژن‌های دفاعی گیاهان دارای پروموترهایی هستند که با مواد شیمیایی (الیسیتورهای) تولید شده از طرف آفات و پاتوژن‌ها القاء می‌شوند. ترکیبات مختلف فاکتورهای عمل کننده-trans برای فعال کردن ژن‌های مرتبط دفاعی از طریق الیسیتور نقش دارند و از طرفی عناصر عمل کننده-cis متعدد در پروموترهای نظیر در بسیاری از موارد شناسایی شده‌اند.

بسیاری از گیاهان با بیان گروهی از ژن‌های محافظ، بر جنبه‌های فیزیکی فعالیت آفت (زخم) واکنش نشان می‌دهند که بسیاری از آنها با جاسمونات[44] یا اتیلن هم القاء می‌شوند. ژن‌های القا شونده با زخم شامل انواعی است که پروتئیناز ممانعت کننده II، نوپالین سینتاز، مانوپین سینتاز و پراکسیدازها از قبیل R2329 برنج را کد می‌کنند.

بالا رفتن دما سبب بیان پروتئین‌های اصطلاحاً شوک گرمایی (HSP) می‌شود که به سلول‌های گیاه کمک می‌کند

[41] Glucocorticoid receptor
[42] Estrogen receptor
[43] Ecdysone
[44] Jasmonate

تا پروتئین‌ها و دیگر ترکیبات سلولی آنها پایدار شود و از این‌رو تحمل دمایی[۴۵] ایجاد می‌شود. ژن‌های HSP دارای پروموتر القاءپذیر با گرما هستند. پروموترهای شوک گرمایی برای پروتئین‌های هترولوگوس به خوبی عمل می‌کند، زیرا سیستم واکنش گرمایی از نظر تکاملی در میان گونه‌های مختلف گیاهی حفاظت شده هستند. بسیاری از ژن‌های القاء شده با تنش‌های غیرزیستی شامل دو عنصر عمل کننده-cis در پروموتر خود هستند. آن‌ها عنصر واکنش دهنده به خشکی /کم آبی به نام DRE (TACCGACAT) و عنصر واکنش دهنده به آبسسیک اسید یا (ACGTGG/TC) ABRE می‌باشند. ژن‌های rd29A و rd29B آرابیدوپسیس واکنش دهنده به تنش هستند اما، تحت تنش غیرزیستی آن‌ها به طور متمایزی از یکدیگر القاء می‌شوند. پروموتر rd29A شامل دو عنصر DRE و ABRE است و ژن در شرایط کم‌آبی، شوری بالا، دمای پایین و آبسسیک اسید القاء می‌شوند در حالی که پروموتر rd29B شامل فقط ABREها هستند و القاء وابسته به ABA است (Uno et al., 2000).

۸- پروموترهای سینتیک یا مصنوعی

پروموترهای طبیعی ساختار پراکندهای از عناصر تنظیم کننده-cis (موتیف‌ها) دارند که به‌نظر می‌رسد در بین ژن‌های با الگوی بیان یکسان حفاظت شده نیست. از این رو، نوع، تعداد نسخه‌ها و فاصله موتیف‌ها در داخل یک پروموتر می‌توانند بازآرایی شوند که همین فاکتورها مبنای ساخت پروموترهای مصنوعی است (Mehrotra et al., 2011). دو نوع پروموتر اصلی وجود دارد؛ یکی نوع طبیعی یا به عبارتی تغییر نیافته یا ذاتی، و دیگری نوع مصنوعی که شامل ترکیبی از انواع طبیعی یا ساختار پروموترهای مرکزی ساخته شده جدید همراه با تکرارهای چندگانه، ترکیبات خاص، یا عناصر تنظیم کننده- cis گیاهی یا غیرگیاهی بازآرایی می‌باشد (شکل ۱ ضمیمه). یک پروموتر مصنوعی شامل یک مرکز پروموتر و موتیف‌های مصنوعی برای کنترل زمانی و مکانی رونوشت‌برداری ژن است. به‌طور معمول، یک توالی موتیف از توالی‌های موجود به‌دست می‌آید اما، تکثیر یا به اشکال مختلف ترکیب می‌شوند. توالی‌ها در مرکز پروموتر در مقایسه با مکان آغاز رونوشت برداری (TSS) در فاصله bp ۵۰+/- قرار دارد و شامل یک جعبه TATA، عناصر GA یا سایر عناصر پروموتر مرکزی (لکه Py، عنصر CCAAT، عنصر Inr ، عنصر CA و غیره) است (Porto et al., 2014; Yamamoto et al., 2011). پراکندگی عناصر در مرکز پروموتر نشان دهنده حفاظت موقعیت نسبی در خصوص TSS در گیاهان است. مرکز پروموتر رونوشت برداری دقیق و درست را وقتی TFهای پایه به آن متصل شوند، آغاز می‌کند و فاقد بیان پایه یا به مقدار بسیار ناچیز است.

[45] Thermotolerance

براساس کاربردهای بیوتکنولوژیکی، سیستم‌های بیان دائمی سطح بالا و تراژن‌های القاءپذیر هدفمند، بسیار مهم هستند و از اهداف اصلی برای توسعه پروموترهای مصنوعی جدید می‌باشند. به‌منظور فائق آمدن به محدودیت‌های استفاده از پروموترهای طبیعی و بیان هدفمند تراژن، پروموترهای مصنوعی (یک جهته یا دو جهته) با چهار هدف مختلف تولید می‌شوند. ۱) قابل استفاده بودن بیشتر پروموتر، ۲) کنترل بیان تراژن‌های چندگانه، ۳) جلوگیری از خاموشی ژن بر اساس تشابه توالی‌ها و ۴) کنترل بیشتر بر بیان مختص محیط و مختص بافت تراژن. جزء اصلی یک پروموتر مصنوعی منطقه‌ای است به نام تنظیم کننده چندبخشی[۴۶] که در بالادست مرکز پروموتر امتزاج می‌یابد. وضعیت موتیف-cis (یعنی مکان موتیف‌ها، فاصله‌گذاری، جهت، تعداد نسخه‌ها و ترکیبات خاص آنها) هدف اصلی برای استراتژی های تغییر پروموتر است (Venter, 2007). تغییرات ساختار تنظیم کننده‌های-cis نه تنها کنترل دقیق یا افزایش فعالیت رونوشت برداری و القاءپذیری تراژن‌ها را امکان پذیر می‌کند، بلکه نقش کارکردی توالی‌های موتیف-cis را مشخص می‌کند و نقش آنها در اتصال به TFهای مشخص و در واکنش به یک یا چند محرک خاص را نشان می‌دهد. یک پروموتر مصنوعی بهینه شده قادر به کنترل فعالیت یک یا چند تراژن به حالت کمی، زمانی و مکانی، منطبق با نیازهای خاص از قبیل چندکاره بودن، اختصاصی بودن القاء، کمترین (پس‌زمینه) فعالیت رونوشت برداری پایه از پروموتر مرکزی، کمترین تخلیه TFهای داخلی، پاسخ و القاء سریع، افزایش قدرت پروموتر و القاء تراژن بدون تأثیرات پلیوتروپیک بر روی گیاه است (Gurr & Rushton, 2005; Tavva et al., 2006). یک پروموتر مصنوعی یک جهته می‌تواند با امتزاج یک پروموتر مرکزی در جهت مخالف پایانه ’5 یک تنظیم کننده چندبخشی دوجهته[۴۷] شود و بر این اساس، امکان بیان هم‌زمان دو تراژن را فراهم کند. در مقایسه با تکنیک‌های رایج استفاده شده برای ورود و بیان تراژن‌های چندگانه در گیاهان یعنی استفاده از تلاقی‌ها، تراریزش هم‌زمان یا متوالی (Halpin, 2005)، یک پروموتر دو جهته مهندسی شده مزیت های بالاتری در خصوص فعالیت و القاءپذیری رونوشت را دارا می باشد (Li et al., 2004).

پروموتر حداقل CaMV 35S و سایر پروموترهای حداقل دیگر مبنای ساخت پروموترهای مصنوعی بوده‌اند. بهترین پروموتر حداقل برای استفاده احتمالی انواعی است که از ژن‌هایی به دست آید که نزدیک‌ترین مشخصات بیان را به خصوصیات بیانی پروموتر مصنوعی نهایی داشته باشد. برای یک پروموتر القاء شدنی با خشکی از ژن القاء شونده با خشکی و برای یک پروموتر القاء شده با زخم از ژن القاء شونده با زخم استفاده شود. علاوه بر این، پروموتر بسیاری از ژن‌های با سطح بیان بالا (مثلاً ژن‌های ابی‌کوئیتین) حاوی

[46] Regulatory module

[47] bidirectional

اینترون در 5'-UTR اشان هستند. بنابراین، انتخاب یک پروموتر حداقل که شامل یک اینترون باشد بخش مهمی از استراتژی طراحی چنین پروموترهایی است (Rushton, 2016).

تعداد پروموترهای مصنوعی تولید و به‌کارگرفته شده در شرایط in planta تا سال ۲۰۱۵ میلادی حدود ۲۰۰ نوع بوده است (Dey et al., 2015).

۹ – اثر متقابل اینترون و پروموتر

وجود اینترون در تمام یوکاریوت‌های شناخته شده علیرغم هزینه، یا به‌عبارتی اتلاف انرژی سلول، به‌مفهوم آن است که اینترون‌ها مزایای مهم و مستقیم برای سلول به‌همراه دارند. یکی از نقش‌های مهم اینترون‌ها آن است که تأثیرات حیاتی بر رونوشت برداری ژن دارند. حذف اینترون‌ها از یک ژن، مثلاً با جایگزینی توالی ژنومیک با cDNAی مربوط (با وجود حضور پروموتر و ترمیناتور)، اغلب کاهش بیان را به‌دنبال دارد. برعکس، امتزاج اینترون به‌داخل یک ژن معمولاً فاقد اینترون - شامل انواعی که منشاء باکتریایی دارند – می‌تواند افزایش بیان معنی‌دار ژن را به‌دنبال داشته باشد. البته همیشه نقش افزایشی ندارند، اما برخی بی‌تأثیر و بقیه دارای کارکرد تنظیمی منفی هستند (Bai et al., 2020; Rose et al., 2008).

تأثیراینترون 5'-UTR ژن پلی‌ابی‌کوییتین[48] برنج با تراریزش دائمی لاین سوسپانسیون سلولی برنج مطالعه شد. اینترون فعالیت ژن گزارشگر GUS را در لاین‌های سلولی ۲۹ برابر و در سطح رونوشت‌برداری سلولی دو برابر افزایش داد (Samadder et al., 2008). این پدیده درجلبک، خزه، نهاندانگان (کاج) و بسیاری از تک لپه‌ای‌ها (ذرت، برنج، گندم، یولاف و موز) و دو لپه‌ای‌ها (آرابیدوپسیس، تنباکو، گوجه فرنگی، سیب زمینی، لوبیا و پنبه) مشاهده شده است. این پراکندگی وسیع اشاره به این موضوع دارد که اینترون‌ها نقش اساسی و نقش حفاظت شده تکاملی را در تنظیم بیان ژن یوکاریوتی ایفا می‌کنند (Rose et al., 2008).

رهیافت‌های آزمایشگاهی مطالعه اینترون‌ها معمولاً به این گونه است که دو ساختار (یکی با اینترون و دیگری بدون اینترون) آماده می‌شوند و سپس تراریزش دائم یا موقت این دو نوع ساختار به داخل سلول‌های گیاهی انجام می‌شود. ساختار ژنی معمولاً امتزاج بین پروموتر گیاه و ژن گزارشگر باکتریایی مانند GUS است یا در برخی موارد اینترون از نسخه ژنومی حذف می‌شود. سطح بیان ژن را می‌توان با بررسی تجمع mRNA بررسی کرد (Rose et al., 2008). اینترون‌های متعدد گیاهی بیان ژن را از بالادست توالی‌های رونوشت برداری شده در هر دو جهت افزایش می‌دهند. لذا احتمالاً حاوی عناصر تقویت کننده[49] هستند. برای مثال ژن

[48] Polyubiquitin
[49] Enhancer-containing intron

کدکننده فاکتور طویل‌سازی (eEF-1B) گیاه آرابیدوپسیس بیان را در برگ‌های تراریخته تنباکو افزایش داد. اینترون در بالادست آغاز رونوشت برداری وارد شده و تأثیر آن رو به‌جلو بیشتر از ورود آن در جهت معکوس بود (Gidekel et al., 1996). به طریق مشابه، بخش 5'-UTR ژن ACT1 آرابیدوپسیس مشتمل بر یک اینترون پس از تراریزش در قالب ساختار امتزاج یافته ACT1:GUS سبب بیان ۱۰ برابری مختص بساک شد. مثال دیگر از اینترون کامل تقویت کننده در ژن agamous آرابیدوپسیس است (Deyholos & Sieburth, 2000). مکان اتصال پروتئین تنظیم کننده بیان AG در داخل اینترون شناسایی شده است (Sridhar et al., 2006).

تعدادی از اینترون‌ها توانایی القاء بیان حداقلی و ضعیف را در یک ژن فاقد پروموتر دارا می‌باشند. لذا حاوی پروموترهایی هستند که می‌توانند بیان را تا حدودی افزایش دهند. لذا می‌توانند به‌عنوان جایگزین پروموتر [۵۰] عمل کنند. برای مثال، اینترون اول ژن‌های Ostub16 و OsCDPK2 در برنج (Morello et al., 2006) اینترون اول ژن FAD2 گیاه کنجد که در گیاه آرابیدوپسیس آزمون شد (Kim et al., 2006). فرضیه وجود جایگزین پروموترها بدان جهت پیشنهاد شد که برخی از رونوشت‌ها از داخل توالی‌های اینترون منشاء گرفته است.

شواهدی به دست آمد مبنی بر این که اینترون‌ها سطح mRNA را افزایش می‌دهند بدون اینکه حاوی تقویت کننده یا پروموتر جداگانه باشند در حقیقت مکانیسم این نوع عمل تقویت کنندگی با نحوه عمل در تقویت کننده‌ها و پروموترها متفاوت است. لذا تقویت کنندگی به واسطه اینترون[۵۱] نامیده شد. این قبیل اینترون‌ها برخلاف عناصر تقویت کننده هستند که از مسافت دور در هر دو جهت عمل می‌کنند و رونوشت برداری را از پروموتر فعال می‌کنند (Zabidi & Stark, 2016). آنها همچنین برخلاف پروموترها، باید در پایین دست TSS باشند تا بر بیان مؤثر واقع گردند. آزمون‌ها برای تعیین تفاوت این نوع از تقویت کننده و پروموتر شامل این مسئله است که آیا اینترون می‌تواند بیان را در خارج از توالی‌های رونوشت برداری شده یا در هر دو جهت تقویت کند؟ آیا اینترون می‌تواند بیان یک ژن فاقد پروموتر یا پروموتر حداقلی را تحریک کند؟ و اینکه آیا اینترون حاوی توالی عناصر خاصی است (به غیر از آنهایی که برای جوش نیاز است) که برای تقویت فعالیت یا فاکتور خاصی متصل شود (Gallegos & Rose, 2015).

شواهدی بیشتر در این خصوص که بسیاری از اینترون‌ها سطح mRNA را بدون داشتن تقویت‌کننده‌های جداگانه یا پروموتر تحریک و یا افزایش می دهند از این تلاش‌ها به دست آمد که توالی‌های اینترون های دخیل در IME را با آنالیز حذف تعیین کنند. نتایج نشان داد که گاه تا ٪۸۰

[50] Alternative promoter

[51] Intron-mediated enhancement

اینترون شماره ۱ حذف می‌شود در حالی که نقش تقویت کنندگی همچنان پابرجاست که نشان می‌دهد توالی‌های مسئول IME باید دارای فراوانی بالا باشند ودر سراسر اینترون پراکنده باشند یا محدود به پایانه/ انتهای اینترون باشند. ضمن اینکه، تاکنون توالی خاصی مشخص نشده است که قطعاً در IME نقش داشته باشند. گرچه در این قبیل موارد استفاده از یک الگوریتم کار شناسایی توالی‌های اینترونی مسئول و موثر بر بیان را آسانتر کرده است (Parra et al., 2011). تحقیقات در آرابیدوپسیس و اینترون UBQ10 نشان داد که این امر به سبب توالی‌های فعال در سرتاسر اینترون محرک وجود دارند تا شکل‌گیری یک عنصر جداگانه منفرد مانند مکان اتصال TFها (Rose et al., 2008) اغلب اینترون‌هایی که بیان را در آرابیدوپسیس و ذرت افزایش می‌دهند اولین اینترون‌ها هستند که در 5'-UTR ژن اولیه ژنومی وجود دارند. نکته دیگر این که اینترون باید نزدیک نقطه شروع ژن برای افزایش حداکثری قرار داشته باشند. جابجایی اینترون به 3'-UTR سبب از بین رفتن خاصیت اینترون شد (Jeon et al., 2000). آزمون‌هایی که در آن‌ها مکان یک اینترون محرک بیان [۵۲] در ژن متغیر بود نشان داد که اینترون باید در داخل توالی‌های رونوشت برداری شده و در فاصله کمتر از 1kb از شروع رونوشت برداری باشد تا سطح mRNA را افزایش دهد.

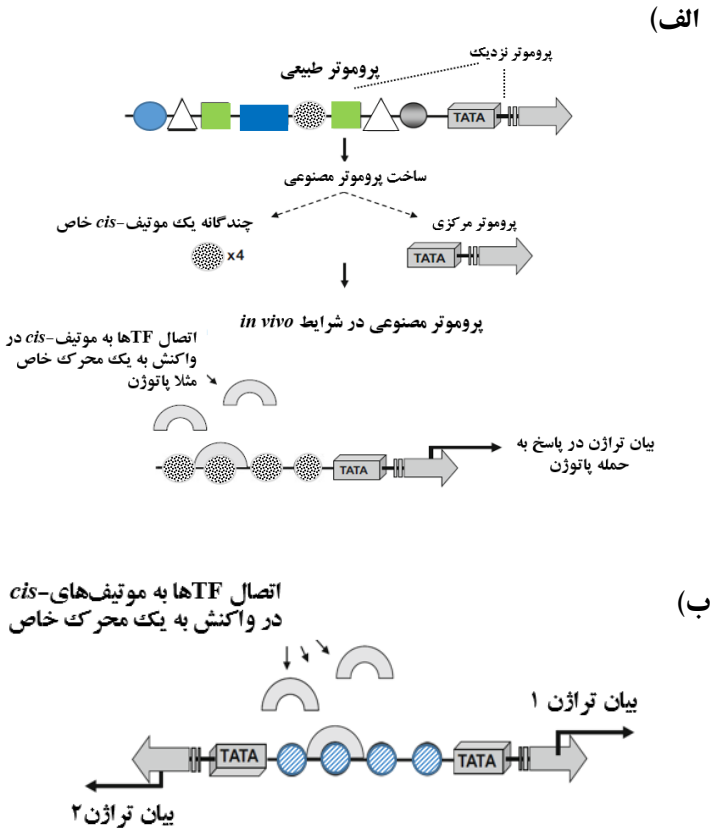
تاثیر اینترون بر بیان از تاثیر پروموتر در یک ژن بیشتر بوده است. در یک مطالعه تبادل اینترون بین اعضاء یک خانواده ژنی مطالعه شد. ژن Profilin رویشی (PRF1, 2, 3) در تمام گیاه بیان می‌شود در حالی که PRF4 و 5 فقط در کلاله و خامه بیان می‌شود. اینترون اول PRF2 نه فقط برای بیان کامل ساختار پروموتر PRF2 متصل به ژن GUS نیاز است بلکه این اینترون می‌تواند بیان PRF5:GUS را از الگوی بیان زایشی به بیان رویشی تبدیل کند (Jeon et al., 2000) . این مطالعه نشان داد که اینترون PRF2 تاثیر بیشتری از پروموتر PRF5 در بیان مختص بافت دارد و تاثیر آن در مقدار بیان از پروموترهای هر دو ژن بیشتر است.

علاوه بر این، در بسیاری از موارد حضور اینترون پایایی mRNA بالغ را در سیتوزول افزایش می‌دهد که در سرعت رونوشت برداری، مهاجرت هسته‌ای و پایداری رونوشت موثر است. علاوه بر این، حضور اینترون می‌تواند کارایی ترجمه را افزایش دهد (Shaul, 2017).

سپاسگزاری

بدینوسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) به جهت پشتیبانی مالی از نویسنده مسئول تشکر و قدردانی می‌شود.

[52] Expression-stimulating



شکل ۱- دو شیوه اصلی برای طراحی پروموترهای مصنوعی. الف) طراحی پروموترهای مصنوعی یک‌جهته. منطقه پروموتر مرکزی که عامل اصلی بیان تراژن است با یک قطعه مصنوعی شامل تکرارهای چندگانه یک موتیف-*cis* خاص (مولتی‌مریزاسیون) امتزاج می‌یابد. اطلاعات اولیه از موتیف-*cis* بخصوص انواع مرتبط با القاء با یک محرک خاص (مثلاً حمله پاتوژن)، امکان ساخت پروموترهای مصنوعی به منظور بیان تراژن در پاسخ به آن تنش خاص را می‌دهد؛ ب) طراحی پروموتر مصنوعی دوجهته. امتزاج یک پروموتر مرکزی اضافی در سمت مخالف امکان تنظیم دوتراژن با استفاده از ساختار تنظیم کنندگی-*cis* مشابه را می‌دهد، اقتباس از (Venter & Botha, 2010)

Figure 1- An illustration of two basic strategies for the design of synthetic promoters (a) unidirectional synthetic promoter design. The core-promoter will be fused to a synthetic stretch of DNA containing multiple repeats of the specifically *cis*-motif (multimerisation). Knowledge of specific *cis*-motif associated with induction (e.g. pathogen attack) enables construction of synthetic promoters in response to pathogen attacks, (b) Bidirectional synthetic promoter design. By integrating an additional promoter on the opposite side, it is possible to regulate two transgenes using the same cis-regulatory architecture. (Venter & Botha, 2010) with some modifications.

جدول ۱- کارکرد برخی موتیف‌های شناخته شده در ناحیه مرکزی پروموتر و انواع مستقل از مسافت

Table 1. The function of some known motifs in the core and distal region of the promoter.

* Source: PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)

عملکرد Function	موتیف Motif	مکان Position	توالی Sequence (5’-3’)
مرکز پروموتر Core promoter	TATA Box	-33	TCCCTATAAATAA
	CAT Box	-49	GCCAAC
	CAAT Box	-80	GGCCAATCT
	G Box	-66	TGACGGTGT
پاسخ به استرس Response to stress	ABRE	-76	TGGTTT
	AB14	-245	CACCG
بخشی از یک عنصر پاسخ دهنده به نور Part of a light-responsive element	I Box	95 to 103	CTCTTATGCT
	L box	58 to 68	TCTCACCAACC
دفاع در مقابل پاتوژن Defense against pathogen	W Box	-72	CTTCTTTGACGTGTCCA
نقش ضروری در القای بی‌هوازی Essential for the anaerobic induction	ARE	-700 to -705	TGGTTT
القای سطوح بالای رونویسی Confer high transcription levels	5'-UTR Py-rich stretch	-533 to -547	TTTCTCTCTCTCTC
عنصر پاسخ دهنده به جیبرلین Gibberellin-responsive element	GARE-motif	139 to 145	AAACAGA
عنصر پاسخ دهنده به نور Light-responsive element	GT1-motif	168 to 178	ATGGTGGTTGG
پاسخ در دفاع و تنش و تکرارهای غنی ازTC Responsive to defense and stress TC-rich repeats		17 to 26	ATTTTCTCCA
جایگاه شناسایی MYB در پروموترهای مربوط به کم آبی MYB recognition site found in promoters of the dehydration	MBS	-425 to -430	CGGTCA
پاسخ به تنش گرما Responsive to heat stress	HSE	79 to 87	AAAAAATTTC
درگیر در پاسخگویی به MeJA Involved in the MeJA responsiveness	CGTCA-motif	1 to 5	CGTCA
مورد نیاز برای بیان اندوسپرم Required for endosperm expression	Skn-1_motif	-624 to 628	GTCAT
مسئول بیان آوندی در آوند چوبی Responsible to vascular expression in xylem	AC-I	58 to 68	TCTCACCAACC
درگیر در پاسخ به سالسیلیک اسید Involved in response to salicylic acid	TCA-element	-101 to -110	CAGAAAAGGA

جدول ۲- تعدادی از پروموترهای اختصاصی میوه

Table 2. Fruit-specific promoters

پروموتر Promoter	منشأ Source	تست شده Tested	منبع Reference	توضیحات Remark/ cis element	بیان Expression
SlAdh2	tomato	tomato	J Plant Biotechnol 47 :172	-	preferentially / temporal
VqSTS6	*Vitis quinquangularis*	tomato	Agri Gene.1: 38	Core functional region –-518 bp to –411 bp	preferentially
(SlHDC-A)	tomato	tomato	Plant Biotechnology Reports 13:43	− 880 to − 577 core functional region	temporal and spatial
E8	tomato	tomato, spring onion, capsicum and lettuce	J. Appl. Emerg. Sci. 6(1)	-	spatio -temporal
FaDOF2	strawberry	strawberry / tobacco	J. of Experimental Botany, 68 : 4529	fruit-specific transcription factor	spatio -temporal

جدول ۳- تعدادی از پروموترهای اختصاصی بذر

Table 3. Seed-specific promoters

پروموتر Promoter	منشا Source	تست شده Tested	منبع Reference	توضیحات Remark/ cis element	بیان Expression
PROLAM26	rice	rice	Plant Cell Tiss Organ Cult 128:125	endosperm	spatial or preferentially
pF128	*foxtail millet (Setaria italica)*	*Arabidopsis /Zea mays/foxtail millet*	Planta 241:57	Embryo	temporal and spatial
PZmBD1 / Skn-1	maize	maize	Plant Cell Physiol. 59(10): 1942	Chimeric /bidirectional	persistent
PGlu-4B	rice	rice	Plant Cell Tiss Organ Cult 128:125	endosperm	spatial or preferentially
PRAL2&4	rice	rice	Plant Cell Tiss Organ Cult 128:125	endosperm	spatial or preferentially
BIP4	rice	rice	Front Plant Sci 7: 766	bidirectional	spatial-temporal
maize α-zein promoter	maize	rice	Physiol Mol Biol Plants. 21(1): 35	Endosperm	temporal and spatial

جدول ۴- تعدادی از پروموترهای اختصاصی گرده/پرچم/بساک

Table 4. Pollen/Stamen/Anther-specific promoters

پروموتر Promoter	منشا Source	تست شده Tested	منبع Reference	توضیحات Remark/ cis element	بیان Expression
OsLSP3 - OsLSP4-OsLSP5-OsLSP6	*Oryza sativa*	*Oryza sativa*	Journal of Integrative Plant Biology 62: 1246	late-stage/pollen	temporal
Zm908	*Zea mays*	tobacco	Front. Plant Sci. 8: 658	–126 to –102 region - transcriptional suppression element/pollen	Spatio-temporal
OsSUT3	rice	*Arabidopsis*	Int J Mol Sci. 21(6): 1909.	p385 (from −385 to −1) monocotyledon and dicotyledon	Spatio-temporal
ASP (38 promotor sequences)	*Oryza sativa L. (rice)*	*Oryza sativa L.*	Breeding Science 68: 420	Anther	temporal preferential
TaRATIN1a	cereals	pWAER1, pWAER2 and pWAER3 vectors	Southwest China Journal of Agricultural Sciences 28 :1	ABA-response element ABRE, 8 CK-response element ARR1ATDRE and MBS / Anther	-
OSIPP3	*Oryza sativa*	*Oryza sativa*	Plant Reproduction 28:133–142	OSIPP3-D3 (388 bp) (late pollen stage)	strong

جدول ۵- تعدادی از پروموترهای اختصاصی گره

Table 5. Nodule-specific promoters

پروموتر Promoter	منشا Source	تست شده Tested	منبع Reference	توضیحات Remark/ cis element	بیان Expression
NIN promoter	common bean	common Bean / *Lotus japonicus*	Journal of Visualized Experiments 130:56140	Cis element (IPN2-RE)	Spatio-temporal
GmINS1	soybean	soybean	Plant Physiology Preview, DOI:10.1104/pp.18.01018	-	preferentially

جدول ۶- تعدادی از پروموتر اختصاصی کرک

Table 6. Trichome-specific promoters

پروموتر Promoter	منشا Source	تست شده Tested	منبع Reference	توضیحات Remark/ cis element	بیان Expression
aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)	*Artemisia annua*	*Artemisia annua*	Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 126: 469	exclusively discovered In young leaves	spatial
pRbcS-T1 and pMALD1	*Nicotiana tabacum*	*N. tabacum*	Planta 251:58	-	constitutive / spatial
TcCHS	*Tanacetum cinerariifolium*	*Chrysanthemum morifolium* /*Nicotiana tabacum*	Scientia Horticulturae 185: 193-199	-	temporal and spatial
MsYABBY5	*Mentha spicata*	tobacco and sweet basil	Plant Biotechnology Journal 14 : 1619	-	preferentially

جدول ۷- تعدادی از پروموترهای اختصاصی روزنه / سلول نگهبان

Table 7. Stomata/ Guard cell-specific promoters

پروموتر Promoter	منشا Source	تست شده Tested	منبع Reference	توضیحات Remark/ cis element	بیان Expression
pCsMYB15	*Solanum lycopersicum*	*Arabidopsis*	Plant Physiology and Biochemistry 130: 54-60	-	spatial
pGC1	Arabidopsis	*Arabidopsis* and tobacco	Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 126: 469	-	spatial / strong
DREB1D(HP15, HP16 and HP17)	*Coffea canephora*	*C. arabica*	Journal of experimental botany	-	spatial
KST1ppro	*Solanum tuberosum*	*Arabidopsis / H. vulgare / V. vinifera / Solanaceae and the Cucurbitaceae*	Journal of Experimental Botany. 68: 2885	-	constitutive

جدول ۸- تعدادی از پروموترهای اختصاصی ریشه / غده

Table 8. Root / Tuber-specific promoters

پروموتر Promoter	منشا Source	تست شده Tested	منبع Reference	توضیحات Remark/ cis element	بیان Expression
Artificially synthetic SRSP	-	tobacco	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.2020 25;36(4):700 in Chinese	OSE1ROOTNODULE, OSE2ROOTNODULE, SP8BFIBSP8AIB, and ROOT MOTIF APOX1	spatial
ZmRCP-1	maize	*Transgenic plantain. Musa spp.*	Journal of Biological Research-Thessaloniki 23,	Cap-specific	spatial
OsGRP7	rice	bread wheat	Plant Cell Reports 35: 469	-	constitutive/ spatial
OsMTL1	rice	bread wheat	Plant Cell Reports 35: 469	-	constitutive /prefrentially
OsAER1	*Oryza sativa*	bread wheat	Functional Plant Biology 46(4): 376	Cis element : Al-toxicity, NaCl and submergence stresses	prefrentially
Os03g01700	rice	*O. Sativa L.*	Plant Physiology and Biochemistry136: 52-57	−1475∼-2013 bp and −1077∼-1475 bp	spatial
SynR2	synthetic root-specific module	Tobacco	3 Biotech.7(4):234	-	preferentially
laccase	(*S. tuberosum* L. cv. Desiree)	tomato	Plant Cell Tiss Organ Cult 120:57	Response weakly to salt stress, mannitol Stress/ tuber	preferential

جدول ۹- تعدادی از پروموترهای اختصاصی برگ / رویشی

Table 9. Leaf / vegetative-specific promoters

پروموتر Promoter	منشا Source	تست شده Tested	منبع Reference	توضیحات Remark/ cis element	بیان Expression
PPRGRMZM2G129783	maize	tobacco	Physiology and Molecular Biology of Plants, 25:277	vegetative organ-specific	preferentially or spatio-temporal
EcSWEET5	*Eucalyptus camaldulensis*	tobacco	Genome .61(11): 777	-	spatial
pGh10424pro	cotton	*Arabidopsis*	Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 31.646	leaf-specific	high activity / spatial

References

Amack, S. C., & Antunes, M. S. 2020. CaMV35S promoter–A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. Current Plant Biology, 100179. https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100179

Annadana, S., Mlynárová, L., Udayakumar, M., de Jong, J., & Nap, J.-P. 2002. The potato Lhca3. St. 1 promoter confers high and stable transgene expression in chrysanthemum, in contrast to CaMV-based promoters. Molecular Breeding, 8 (4), 335-344. https://doi.org/10.1023/A:1015212312928

Bai, J., Wang, X., Wu, H., Ling, F., Zhao, Y., Lin, Y., & Wang, R. 2020. Comprehensive construction strategy of bidirectional green tissue-specific synthetic promoters. Plant Biotechnology Journal, 18 (3), 668-678. https://doi.org/10.1111/pbi.13231

Bai, X., Huang, Y., Hu, Y., Liu, H., Zhang, B., Smaczniak, C., & Xing, Y. 2017. Duplication of an upstream silencer of FZP increases grain yield in rice. Nature Plants, 3 (11), 885-893. https://doi.org/10.21608/assjm.2018.65125

Bak, A., & Emerson, J. B. 2020. Cauliflower mosaic virus (CaMV) biology, management, and relevance to GM plant detection for sustainable organic agriculture. Frontiers in Sustainable Food Systems, 4, 21. https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00021

Battraw, M. J., & Hall, T. C. 1990. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-β-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. Plant Molecular Biology, 15 (4), 527-538. https://doi.org/10.1007/BF00017828

Berrocal-Lobo, M., Molina, A., & Solano, R. 2002. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. The Plant Journal, 29 (1), 23-32. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01191

Bowling, S. A., Clarke, J. D., Liu, Y., Klessig, D. F., & Dong, X. 1997. The cpr5 mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent r¬¬¬¬¬esistance. The Plant Cell, 9 (9), 1573-1584. https://doi.org/10.1105/tpc.9.9.1573

Cahoon, E. B., & Shanklin, J. 2000. Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97 (22), 12350-12355. https://doi.org/10.1073/pnas.210276297

Cai, M., Wei, J., Li, X., Xu, C., & Wang, S. 2007. A rice promoter containing both novel positive and negative cis-elements for regulation of green tissue-specific gene expression in transgenic plants. Plant Biotechnology Journal, 5 (5), 664-674. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00271

Caldana, C., Scheible, W.-R., Mueller-Roeber, B., & Ruzicic, S. 2007. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. Plant Methods, 3 (1), 7. https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-7

Cao, P., Ren, Y., Liu, X., Zhang, T., Zhang, P., Xiao, L., & Wan, J. 2019. Purine nucleotide biosynthetic gene GARS controls early chloroplast development in rice (Oryza sativa L.). Plant cell reports, 38 (2), 183-194. https://doi.org/10.1007/s00299-018-2360-z

Capell, T., Escobar, C., Liu, H., Burtin, D., Lepri, O., & Christou, P. 1998. Over-expression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (Oryza sativa L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants. Theoretical and Applied Genetics, 97 (1-2), 246-254. https://doi.org/10.1007/s001220050892

Chen, F., Gao, M.-J., Miao, Y.-S., Yuan, Y.-X., Wang, M.-Y., Li, Q., & He, Z.-H. 2010. Plasma membrane localization and potential endocytosis of constitutively expressed XA21 proteins in transgenic rice. Molecular Plant, 3 (5), 917-926. https://doi.org/10.1093/mp/ssq038

Chong Pua & Michael R. DaveyVerma, D., Singla-Pareek, S. L., Rajagopal, D., Reddy, M., & Sopory, S. 2007. Functional validation of a novel isoform of Na+/H+ antiporter from Pennisetum glaucum for enhancing salinity tolerance in rice. Journal of Biosciences, 32 (3), 621-628. https://doi.org/10.1007/s12038-007-0061-9

Chung, M.-Y., Naing, A. H., Vrebalov, J., Shanmugam, A., Lee, D.-J., Park, I. H., & Giovannon, J. 2020. The use of SlAdh2 promoter as a novel fruit-specific promoter in transgenic tomato. Journal of Plant Biotechnology, 47 (2), 172-178. https://doi.org/10.5010/JPB.2020.47.2.172

Cody, W. B., & Scholthof, H. B. 2019. Plant virus vectors 3.0: Transitioning into synthetic genomics. Annual Review of Phytopathology, 57, 211-230. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100301

Commission, E. 2010. A Decade of EU-Funded GMO Research 2001–2010. Directorate-General for Research and Innovation, Biotechnologies, Agriculture, Food. Retrived November 11.from https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/d1be9ff9-f3fa-4f3c-86a5-beb0882e0e65

Corrado, G., & Karali, M. 2009. Inducible gene expression systems and plant biotechnology. Biotechnology Advances, 27 (6), 733-743. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.006

Czarnecka, E., Ingersoll, J. C., & Gurley, W. B. 1992. AT-rich promoter elements of soybean heat shock gene Gmhsp 17.5 E bind two distinct sets of nuclear proteins in vitro. Plant Molecular Biology, 19 (6), 985-1000. https://doi.org/10.1007/BF00040530

Dalton, S., Heywood, E., Timms, E., & Morris, P. 2007. A Comparison of Maize and Rice Ubiquitin Promoter Activity using the uidA (gus) Gene in Maize. Transformation, 100, 150. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3269.5444

Datla, R., Anderson, J. W., & Selvaraj, G. 1997. Plant promoters for transgene expression. In Biotechnology Annual Review, 3, 269-296 https://doi.org/10.1007/BF02703916

De Vetten, N., ter Horst, J., van Schaik, H.-P., de Boer, A., Mol, J., & Koes, R. 1999. A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3′, 5′-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96 (2), 778-783. https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.778

Deng, F., Yamaji, N., Ma, J. F., Lee, S. K., Jeon, J. S., Martinoia, E., & Song, W. Y. 2018. Engineering rice with lower grain arsenic. Plant Biotechnology Journal, 16 (10), 1691-1699. https://doi.org/10.1111/pbi.12905

Dey, N., & Maiti, I. B. 1999. Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants. Plant Molecular Biology, 40 (5), 771-782. https://doi.org/10.1023/A:1006285426523

Dey, N., Sarkar, S., Acharya, S., & Maiti, I. B. 2015. Synthetic promoters in planta. Planta, 242 (5), 1077-1094. https://doi.org/10.1007/s00425-015-2377-2

Deyholos, M. K., & Sieburth, L. E. 2000. Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the AGAMOUS second intron. The Plant Cell, 12 (10), 1799-1810. https://doi.org/10.1105/tpc.12.10.1799

Doebley, J., Stec, A., & Hubbard, L. 1997. The evolution of apical dominance in maize. Nature, 386 (6624), 485-488. https://doi.org/10.1038/386485a0

Dutt, M., Dhekney, S. A., Soriano, L., Kandel, R., & Grosser, J. W. 2014. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. Horticulture Research, 1 (1), 1-17. https://doi.org/10.1038/hortres.2014.47

Eyal, Y., Curie, C., & McCormick, S. 1995. Pollen specificity elements reside in 30 bp of the proximal promoters of two pollen-expressed genes. The Plant Cell, 7 (3), 373-384. https://doi.org/10.1105/tpc.7.3.373

Fang, R.-X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S., & Chua, N.-H. 1989. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. The Plant Cell, 1 (1), 141-150. https://doi.org/10.1105/tpc.1.1.141

Fasani, E., Manara, A., Martini, F., Furini, A., & DalCorso, G. 2018. The potential of genetic engineering of plants for the remediation of soils contaminated with heavy metals. Plant, Cell and Environment, 41 (5), 1201-1232. https://doi.org/10.1111/pce.12963

Frühling, M., Hohnjec, N., Schröder, G., Küster, H., Pühler, A., & Perlick, A. M. 2000. Genomic organization and expression properties of the VfENOD5 gene from broad bean (Vicia faba L.). Plant Science, 155 (2), 169-178. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00216-8

Gallegos, J. E., & Rose, A. B. 2015. The enduring mystery of intron-mediated enhancement. Plant Science, 237, 8-15. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.04.017

Gao, S., Fang, J., Xu, F., Wang, W., Sun, X., Chu, J., & Chu, C. 2014. CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE4 integrates cytokinin and auxin signaling to control rice crown root formation. Plant Physiology, 165 (3), 1035-1046. https://doi.org/10.1104/pp.114.238584

Gidekel, M., Jimenez, B., & Herrera-Estrella, L. 1996. The first intron of the Arabidopsis thaliana gene coding for elongation factor 1β contains an enhancer-like element. Gene, 170 (2), 201-206. . https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00837-3

Gong, P., Wei, R., Li, Y., Wang, R., Tang, Y., Wang, L., &Zhang, C. 2019. Molecular cloning and functional characterization of a seed-specific VvβVPE gene promoter from Vitis vinifera. Planta, 250 (2), 657-665. https://doi.org/10.1007/s00425-019-03197-0

Grichko, V. P., Filby, B., & Glick, B. R. 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. Journal of Biotechnology, 81 (1), 45-53. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00270-4

Griffiths, A. J., Gelbart, W. M., Miller, J. H., & Lewontin, R. C. 1999. Regulation of the lactose system. In Modern Genetic Analysis: WH Freeman.

Griffiths, A. J., Gelbart, W. M., Lewontin, R. C., & Miller, J. H. 2002. Modern Genetic Analysis: integrating genes and genomes . The Quarterly Review of Biology, 77 (4) , 448 . https://doi.org/10.1086/374462

Grotewold, E., & Springer, N. 2018. The Plant Genome: Decoding the Transcriptional Hardwiring. Annual Plant Reviews Online, 196-228. https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0377

Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D. A., & Miki, B. L. 2009. Strategies to mitigate transgene–promoter interactions. Plant Biotechnology Journal, 7 (5), 472-485. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00416.x

Gurr, S. J., & Rushton, P. J. 2005. Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? Trends in biotechnology, 23 (6), 283-290. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.009

Hajiahmadi, Z., Shirzadian-Khorramabad, R., Kazemzad, M., & Sohani, M. M. 2017. 'In silico'analysis and transient expression of wound-inducible promoter'MPI'in tomato ('Lycopersicon esculentum'Mill. cv. CH). Plant Omics, 10 (3), 118. https://doi.org/10.21475/poj.10.03.17.pne411

Halpin, C. 2005. Gene stacking in transgenic plants–the challenge for 21st century plant biotechnology. Plant Biotechnology Journal, 3 (2), 141-155. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00113.x

Han, L., Han, Y.-N., & Xiao, X.-G. 2013. Truncated cotton subtilase promoter directs guard cell-specific expression of foreign genes in tobacco and Arabidopsis. PLoS One, 8(3), e59802. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059802

Holtorf, S., Apel, K., & Bohlmann, H. 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in Arabidopsis thaliana. Plant Molecular Biology, 29 (4), 637-646. https://doi.org/10.1007/BF00041155

Hsieh, T.-H., Lee, J.-t., Charng, Y.-y., & Chan, M.-T. 2002. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. Plant Physiology, 130 (2), 618-626. https://doi.org/10.1104/pp.006783

Hsieh, T. H., Lee, J. T., Yang, P. T., Chiu, L. H., Charng, Y. Y., Wang, Y. C., & Chan, M. T. 2004. Erratum: Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. Plant Physiology, 135 (2). https://doi.org/10.1104/pp.003442

Huang, L.-y., Zhang, F., Qiao, Q., WANG, W.-s., Zhang, T., & FU, B.-y. 2015. Identification and validation of root-specific promoters in rice. Journal of Integrative Agriculture, 14 (1), 1-10. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60763-2

Huo, X., Wu, S., Zhu, Z., Liu, F., Fu, Y., Cai, H., & Tan, L. 2017. NOG1 increases grain production in rice. Nature Communications, 8 (1), 1-11. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01501-8

Jeon, J.-S., Lee, S., Jung, K.-H., Jun, S.-H., Kim, C., & An, G. 2000. Tissue-preferential expression of a rice α-tubulin gene, OsTubA1, mediated by the first intron. Plant Physiology, 123 (3), 1005-1014. https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1005

Kasuga, M., Miura, S., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2004. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought-and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. Plant and Cell Physiology, 45 (3), 346-350. https://doi.org/10.1093/pcp/pch037

Kato, H., Xie, G., Sato, Y., & Imai, R. 2010. Isolation of anther-specific gene promoters suitable for transgene expression in rice. Plant Molecular Biology Reporter, 28 (3), 381-387. https://doi.org/10.1007/s11105-009-0162-8

Kay, R., Chan, A., Daly, M., & McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science, 236 (4806), 1299-1302. https://doi.org/10.1126/science.236.4806.1299

Khurana, R., Kapoor, S., & Tyagi, A. K. 2012. Anthology of anther/pollen-specific promoters and transcription factors. Critical Reviews in Plant Sciences, 31 (5), 359-390 https://doi.org/10.1080/07352689.2012.664986

Kim, A. Y., Kim, H. M., Ma, S. H., Park, S. Y., Dat, M. T., Jang, G., & Joung, Y. H. 2019. The promoter of tomato HISTIDINE DECARBOXYLASE A is fruit-specific, and its expression is stably maintained in fruits during ripening. Plant Biotechnology Reports, 13 (1), 43-50. https://doi.org/10.1007/s11816-018-00512-1

Kim, D.-H., Park, S., Lee, J.-Y., Ha, S.-H., & Lim, S.-H. 2018. Enhancing flower color through simultaneous expression of the B-peru and mPAP1 transcription factors under control of a flower-specific promoter. International Journal of Molecular Sciences, 19 (1), 309. https://doi.org/10.3390/ijms19010309

Kim, M. J., Kim, H., Shin, J. S., Chung, C.-H., Ohlrogge, J. B., & Suh, M. C. 2006. Seed-specific expression of sesame microsomal oleic acid desaturase is controlled by combinatorial properties between negative cis-regulatory elements in the SeFAD2 promoter and enhancers in the 5′-UTR intron. Molecular Genetics and Genomics, 276 (4), 351-368. https://doi.org/10.1007/s00438-006-0148-2

Krebs, J. E., Goldstein, E. S., & Kilpatrick, S. T. 2017. Lewin's genes XII: Jones & Bartlett Learning.

Lalonde, B., Arcangioli, B., & Guarente, L. 1986. A single Saccharomyces cerevisiae upstream activation site (UAS1) has two distinct regions essential for its activity. Molecular and cellular biology, 6 (12), 4690-4696. https://doi.org/10.1128/mcb.6.12.4690-4696.1986

Laplaze, L., Svistoonoff, S., Santi, C., Auguy, F., Franche, C., & Bogusz, D. 2007. Molecular biology of actinorhizal symbioses. In Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses, 235-259. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3547-0_9

Lawson, T., & Matthews, J. 2020. Guard cell metabolism and stomatal function. Annual Review of Plant Biology, 71, 273-302. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100251

Li, A. X., Han, Y. Y., Wang, X., Chen, Y. H., Zhao, M. R., Zhou, S.-M., & Wang, W. 2015. Root-specific expression of wheat expansin gene TaEXPB23 enhances root growth and water stress tolerance in tobacco. Environmental and Experimental Botany, 110, 73-84. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.04.006

Li, D., Xu, R., Lv, D., Zhang, C., Yang, H., Zhang, J., & Tan, X. 2020. Identification of the Core Pollen-Specific Regulation in the Rice OsSUT3 Promoter. International Journal of Molecular Sciences, 21 (6), 1909. https://doi.org/10.3390/ijms21061909

Li, R., Jia, X., & Mao, X. 2005. Ethanol-inducible gene expression system and its applications in plant functional genomics. Plant Science, 169 (3), 463-469. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.04.006

Li, Y., Li, C., Cheng, L., Yu, S., Shen, C., & Pan, Y. 2019. Over-expression of OsPT2 under a rice root specific promoter Os03g01700. Plant Physiology and Biochemistry, 136, 52-57. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.009

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 Science, 160 (5), 877-887. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00336-3

Li, Z. T., Jayasankar, S., & Gray, D. 2004. Bi-directional duplex promoters with duplicated enhancers significantly increase transgene expression in grape and tobacco. Transgenic research, 13 (2), 143-154. https://doi.org/10.1023/B:TRAG.0000026074.11859.77

Liu, F., Wang, Z., Ren, H., Shen, C., Li, Y., Ling, H. Q., & Wu, P. 2010. OsSPX1 suppresses the function of OsPHR2 in the regulation of expression of OsPT2 and phosphate homeostasis in shoots of rice. The Plant Journal, 62 (3), 508-517. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04170.x

Liu, X., Yang, W., Mu, B., Li, S., Li, Y., Zhou, X., & Chen, R. 2018. Engineering of 'Purple Embryo Maize'with a multigene expression system derived from a bidirectional promoter and self-cleaving 2A peptides. Plant Biotechnology Journal, 16 (6), 1107. https://doi.org/10.1111/pbi.12883

Makhzoum, A., Benyammi, R., Moustafa, K., & Trémouillaux-Guiller, J. 2014. Recent advances on host plants and expression cassettes' structure and function in plant molecular pharming. BioDrugs, 28 (2), 145-159. https://doi.org/10.1007/s40259-013-0062-1

Manna, M., Achary, V. M. M., Islam, T., Agrawal, P. K., & Reddy, M. K. 2016. The development of a phosphite-mediated fertilization and weed control system for rice. Scientific Reports, 6, 24941. https://doi.org/10.1038/srep24941

McElroy, D., Rothenberg, M., Reece, K. S., & Wu, R. 1990a. Characterization of the rice (Oryza sativa) actin gene family. Plant Molecular Biology, 15 (2), 257-268. https://doi.org/10.1007/BF00036912

McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., & Wu, R. 1990b. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. The Plant Cell, 2 (2), 163-171.

Mehrotra, R., Gupta, G., Sethi, R., Bhalothia, P., Kumar, N., & Mehrotra, S. 2011. Designer promoter: an artwork of cis engineering. Plant Molecular Biology, 75(6), 527-536. https://doi.org/10.1007/s11103-011-9755-3

Millwood, R. J., Moon, H. S., Poovaiah, C. R., Muthukumar, B., Rice, J. H., Abercrombie, J. M., & Stewart Jr, C. N. 2016. Engineered selective plant male sterility through pollen-specific expression of the Eco RI restriction endonuclease. Plant Biotechnology Journal, 14 (5), 1281-1290. https://doi.org/10.1111/pbi.12493

Morello, L., Bardini, M., Cricrì, M., Sala, F., & Breviario, D. 2006. Functional analysis of DNA sequences controlling the expression of the rice OsCDPK2 gene. Planta, 223 (3), 479-491. https://doi.org/10.1007/s00425-005-0105-z

Napier, J. A., Olsen, R. E., & Tocher, D. R. 2019. Update on GM canola crops as novel sources of omega-3 fish oils. Plant Biotechnology Journal, 17 (4), 703. https://doi.org/10.1111/pbi.13045

Naqvi, S., Farré, G., Sanahuja, G., Capell, T., Zhu, C., & Christou, P. 2010. When more is better: multigene engineering in plants. Trends in Plant Science, 15 (1), 48-56. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.010

Nuccio, M. L. 2018. A brief history of promoter development for use in transgenic maize applications. Methods in Molecular Biology,1676, 61-93. https://doi:/10.1007/978-1-4939-7315-6_4

Nunberg, A. N., Li, Z., Bogue, M. A., Vivekananda, J., Reddy, A. S., & Thomas, T. L. 1994. Developmental and hormonal regulation of sunflower helianthinin genes: proximal promoter sequences confer regionalized seed expression. The Plant Cell, 6 (4), 473-486. https://doi.org/10.1105/tpc.6.4.473

Odell, J. T., Nagy, F., & Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature, 313 (6005), 810-812. https://doi.org/10.1038/313810a0

Padidam, M., Gore, M., Lu, D. L., & Smirnova, O. 2003. Chemical-inducible, ecdysone receptor-based gene expression system for plants. Transgenic Research, 12 (1), 101-109. https://doi.org/10.1023/A:1022113817892

Paine, J. A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., &

Silverstone, A. L. 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. Nature Biotechnology, 23 (4), 482. https://doi.org/10.1038/nbt1082

Parra, G., Bradnam, K., Rose, A. B., & Korf, I. 2011. Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants. Nucleic Acids Research, 39 (13), 5328-5337. https://doi.org/10.1093/nar/gkr043

Peremarti, A., Twyman, R. M., Gómez-Galera, S., Naqvi, S., Farré, G., Sabalza, M., & Ramessar, K. 2010. Promoter diversity in multigene transformation. Plant Molecular Biology, 73 (4-5), 363-378. https://doi.org/10.1007/s11103-010-9628-1

Pino, M. T., Skinner, J. S., Park, E. J., Jeknić, Z., Hayes, P. M., Thomashow, M. F., & Chen, T. H. 2007. Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. Plant Biotechnology Journal, 5 (5), 591-604. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00269.x

Porto, M. S., Pinheiro, M. P. N., Batista, V. G. L., dos Santos, R. C., de Albuquerque Melo Filho, P., & de Lima, L. M. 2014. Plant promoters: an approach of structure and function. Molecular Biotechnology, 56 (1), 38-49. https://doi.org/10.1007/s12033-013-9713-1

Potenza, C., Aleman, L., & Sengupta-Gopalan, C. 2004. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40 (1), 1-22. https://doi.org/10.1079/IVP2003477

Quan, W., Hu, Y., Mu, Z., Shi, H., & Chan, Z. 2018. Overexpression of AtPYL5 under the control of guard cell specific promoter improves drought stress tolerance in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry, 129, 150-157. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.033

Redillas, M. C., Jeong, J. S., Kim, Y. S., Jung, H., Bang, S. W., Choi, Y. D., & Kim, J. K. 2012. The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. Plant Biotechnology Journal, 10 (7), 792-805. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00697.x

Robinson, C., Lowe, M., Schwartz, A., & Kikyo, N. 2016. Mechanisms and developmental roles of promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. Journal of Stem Cell Research and Therapy, 6 (3). https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000330

Romero, C., Bellés, J. M., Vayá, J. L., Serrano, R., & Culiáñez-Macià, F. A. 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. Planta, 201 (3), 293-297

Roque, E. M., Gómez-Mena, C., Hamza, R., Beltrán, J. P., & Cañas, L. A. 2019. Engineered male sterility by early anther ablation using the Pea anther-specific promoter PsEND1. Frontiers in Plant Science, 10, 819. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00819

Rose, A. B., Elfersi, T., Parra, G., & Korf, I. 2008. Promoter-proximal introns in Arabidopsis thaliana are enriched in dispersed signals that elevate gene expression. The Plant Cell, 20 (3), 543-551. https://doi.org/10.1105/tpc.107.057190

Ruan, B., Shang, L., Zhang, B., Hu, J., Wang, Y., Lin, H., & Zhu, L. 2020. Natural variation in the promoter of TGW2 determines grain width and weight in rice. New Phytologist, 227 (2), 629-640. https://doi.org/10.1111/nph.16540

Rugg-Gunn, P. J. 2019. Transcription factors make the right contacts. Nature Cell Biology, 21 (10), 1173-1174. https://doi.org/10.1038/s41556-019-0399-x

Rushton, P. J. 2016. What have we learned about synthetic promoter construction? In Plant Synthetic Promoters, 1482, 1-13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6396-6-1

Samadder, P., Sivamani, E., Lu, J., Li, X., & Qu, R. 2008. Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5′ UTR intron of rice rubi3 gene in transgenic rice cells. Molecular Genetics and Genomics, 279 (4), 429-439. https://doi.org/10.1007/s00438-008-0323-8

Schenk, P. M., Remans, T., Sági, L., Elliott, A. R., Dietzgen, R. G., Swennen, R., & Manners, J. M. 2001. Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. Plant Molecular Biology, 47 (3), 399-412. https://doi.org/10.1023/A:1011680008868

Science, A. A. f. t. A. o. 2012. Statement by the AAAS board of directors on labeling of genetically modified foods. In. Retrived june 12. from https://www.aaas.org/news/statement-aaas-board-directors-labeling-genetically-modified-foods

Sengupta-Gopalan, C., Reichert, N. A., Barker, R. F., Hall, T. C., & Kemp, J. D. 1985. Developmentally regulated expression of the bean β-phaseolin gene in tobacco seed. Proceedings of the National Academy of Sciences, 82 (10), 3320-3324. https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3320

Sharma, A. K., & Sharma, M. K. 2009. Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. Biotechnology Advances, 27 (6), 811-832. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.004

Shen, Q., Lu, X., Yan, T., Fu, X., Lv, Z., Zhang, F., & Tang, K. 2016. The jasmonate-responsive Aa MYC 2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in Artemisia annua. New Phytologist, 210 (4), 1269-1281. https://doi.org/10.1111/nph.13874

Shen, S., Li, Q., He, S. Y., Barker, K. R., Li, D., & Hunt, A. G. 2000. Conversion of compatible plant–pathogen interactions into incompatible interactions by expression of the Pseudomonas syringae pv. syringae 61 hrmA gene in transgenic tobacco plants. The Plant Journal, 23 (2), 205-213. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00772.x

Shiva, V., Woodwell, G., & Zamora, O. B. 2000. Open Letter from World Scientists to All Governments Concerning Genetically Modified Organisms (GMOs). https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4959.9605

Somssich, M. 2019. A short history of plant transformation ,2167-9843. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_3

Sridhar, V. V., Surendrarao, A., & Liu, Z. 2006. APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. Development, 133 (16), 3159-3166. https://doi.org/10.1242/dev.02498

Tanabe, N., Tamoi, M., & Shigeoka, S. 2015. The sweet potato RbcS gene (IbRbcS1) promoter confers high-level and green tissue-specific expression of the GUS reporter gene in transgenic Arabidopsis. Gene, 567 (2), 244-250. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.006

Tavva, V. S., Dinkins, R. D., Palli, S. R., & Collins, G. B. 2006. Development of a methoxyfenozide-responsive gene switch for applications in plants. The Plant Journal, 45 (3), 457-469. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02628.x

Tissier, A. 2018. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. Molecular pharming: applications, challenges, and emerging areas. Hoboken: Wiley, 353-382.

Twell, D., Yamaguchi, J., Wing, R. A., Ushiba, J., & McCormick, S. 1991. Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. Genes & Development, 5 (3), 496-507. https://doi.org/10.1101/gad.5.3.496

Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97 (21), 11632-11637. https://doi.org/10.1073/pnas.190309197

Urwin, P. E., Møller, S. G., Lilley, C. J., McPherson, M. J., & Atkinson, H. J. 1997. Continual green-fluorescent protein monitoring of cauliflower mosaic virus 35S promoter activity in nematode-induced feeding cells in Arabidopsis thaliana. Molecular Plant-Microbe Interactions, 10 (3), 394-400. https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.3.394

Van der Geest, A. H., & Hall, T. C. 1997. The β-phaseolin 5′ matrix attachment region acts as an enhancer facilitator. Plant Molecular Biology, 33(3), 553-557. https://doi.org/10.1023/a:1005765525436

Venter, M. 2007. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. Trends in Plant Science, 12 (3), 118-124. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.002

Venter, M., & Botha, F. 2010. Synthetic promoter engineering. In Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives. (1st ed.) , 2 , 393-414. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_20chen

Wang, M., Yan, W., Peng, X., Chen, Z., Xu, C., Wu, J., & Tang, X. 2020. Identification of late-stage pollen-specific promoters for construction of pollen-inactivation system in rice. Journal of Integrative Plant Biology, 8 (62), 1246-1263. https://doi.org/10.1111/jipb.12912

Wang, R., Zhu, M., Ye, R., Liu, Z., Zhou, F., Chen, H., & Lin, Y. 2015. Novel green tissue-specific synthetic promoters and cis-regulatory elements in rice. Scientific Reports, 5, 18256. https://doi.org/10.1038/srep18256

Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., & Schmülling, T. 2010. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in Arabidopsis and tobacco. The Plant Cell, 22 (12), 3905-3920. https://doi.org/10.1105/tpc.109.072694

Yamamoto, Y. Y., Yoshioka, Y., Hyakumachi, M., & Obokata, J. 2011. Characteristics of core promoter types with respect to gene structure and expression in Arabidopsis thaliana. DNA Research, 18 (5), 333-342. https://doi.org/10.1093/dnares/dsr020

Ye, R., Huang, H., Yang, Z., Chen, T., Liu, L., Li, X., & Lin, Y. 2009. Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C*-free endosperm. Pest Management Science, 65 (9), 1015-1020. https://doi.org/10.1002/ps.1788

Yi, N., Kim, Y. S., Jeong, M.-H., Oh, S.-J., Jeong, J. S., Park, S.-H., & Kim, J.-K. 2010. Functional analysis of six drought-inducible promoters in transgenic rice plants throughout all stages of plant growth. Planta, 232 (3), 743-754. https://doi.org/10.1007/s00425-010-1212-z

Yue, Y., Yin, C., Guo, R., Peng, H., Yang, Z., Liu, G., & Hu, H. 2017. An anther-specific gene PhGRP is regulated by PhMYC2 and causes male sterility when overexpressed in petunia anthers. Plant Cell Reports, 36 (9), 1401-1415. https://doi.org/10.1007/s00299-017-2163-7

Zabidi, M. A., & Stark, A. 2016. Regulatory enhancer–core-promoter communication viatranscription factors and cofactors. Trends in Genetics,32¬¬¬ (12), 801-814. https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.10.003

Zhong, R., Demura, T., & Ye, Z.-H. 2006. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. The Plant Cell, 18 (11), 3158-3170. https://doi.org/10.1105/tpc.106.047399

Zhu, Q., Yu, S., Zeng, D., Liu, H., Wang, H., Yang, Z., & Li, H. 2017. Development of "purple endosperm rice" by engineering anthocyanin biosynthesis in the endosperm with a high-efficiency transgene stacking system. Molecular Plant,10 (7), 918-929. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.05.008

Zuo, J., & Chua, N.-H. 2000. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. Current Opinion in Biotechnology, 11 (2), 146-151. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00073-2