ساخت و آنالیز بیان ناقل جفتی گیاهی pCaBGi

فرهاد شکوهی فر[۱*]، ناهید عباسپور[۲]، صهبا طوسی[۳]، نیره سادات غفاریان نیا[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٤/۷
تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/۱۱/۳

چکیده

بیان موقت مبتنی بر تزریق اگروباکتریوم در برگ گیاه روش نسبتاً سریع و قابل اعتمادی برای آنالیز توالی‌های تنظیمی است. به منظور بهره‌گیری از مزایای این تکنیک یک ناقل بیانی مناسب برای انجام آزمون بیان موقت عناصر تنظیمی مبتنی بر تزریق اگروباکتریوم مورد نیاز است. در این مطالعه بمنظور ساخت یک ناقل بیانی گیاهی، جایگاه‌های آنزیمی مناسب از وکتور pBGi به عنوان قطعه در نظر گرفته شد و وکتور pCAMBIA3301 حامل ژن گزارشگر GUS پس از حذف پرموتر 35S CaMV به عنوان توالی پایه استفاده شد. وکتور جدید به نام pCaBGi از طریق وارد نمودن قطعه BamHI/SnaBI از وکتور pBGi به جای قطعه BamHI/SnaBI در وکتور pCAMBIA3301 ساخته شد. تایید ناقل جدید با استفاده از روش کلنی PCR و توالی یابی بوسیله آغازگرهای R/F2-PSh4 انجام شد. عدم بیان ژن گزارشگر در میزبان پروکاریوتی با سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز در سویه GV3101 اگروباکتریوم به عنوان یک سیستم پروکاریوتی

۱*- استادیار، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
(نویسنده مسئول: Shokouhifar@um.ac.ir)
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، دانشگاه بین المللی قزوین
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد،
٤- دانش آموخته کارشناسی ارشد، زیست شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تایید شد. تزریق سلول‌های اگروباکتریوم حامل وکتور pCaBGi در برگ توتون بیان پایه بسیار جزئی ناشی از فعالیت توالی حداقل پروموتری مشاهده شد. توالی وکتور pCaBGi با استفاده از برنامه SequIn با شماره بازیابی MG719235 در بانک ژن ثبت شد.

واژه های کلیدی: وکتورهای جفتی، ساخت وکتور، بیان موقت،

مقدمه

آنالیز توالی‌های تنظیمی با قرار دادن آنها در سازه‌های مناسب در سیستم‌های بیانی قابل انجام است. انتقال این سازه ها به گیاه و تولید گیاهان تراریخت حامل مجموعه توالی تنظیمی متصل شده به ژن گزارشگر در مطالعات متعددی جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی بکار گرفته شده است (Shokouhifar et al., 2011a; Shokouhifar et al., 2011b). مزایا و معایب این روش در مقالات مروری مورد بررسی قرار گرفته است (Gurr and Rushton 2005; Cazzonelli and Velten 2008; Gupta et al., 2011; Blazeck and Alper, 2013).از جمله معایب این روش می‌توان به زمانبر بودن مراحل کار و هزینه بالای آن اشاره نمود. هرچند به دلیل تولید گیاه تراریخت امکان تکرار آزمایش با کشت مجدد گیاه تراریخت ممکن خواهد بود. ولی از آنجا که وارد شدن مجموعه ژنی در ژنوم گیاه می‌توانند به دلیل موقعیت ورود آن در ژنوم و تعداد نسخه وارد شده تحت تاثیر قرار گیرد بیان موقت با توجه به دیگر مزایای آن می‌تواند جایگزین مناسبی جهت تولید گیاهان تراریخت باشد (Liu et al., 2011; Bahrabadi et al., 2014).

بمنظور انجام آنالیز توالی‌های تنظیمی با استفاده از روش اگروانجکشن به عنوان یکی از ساده‌ترین روش‌های بیان موقت به یک وکتور جفتی با ویژگی‌های خاص مورد نیاز است. از زمان ابداع روش استفاده از وکتورهای جفتی (Hoekema et al., 1983) در سال ۱۹۸۳ تا کنون وکتورها جفتی مفید زیادی ساخته شده است (Chen et al., 2003; Gynheung 1987; Hellens et al., 2005; Hellens et al., 2000; Hoekema et al., 1983; Lee and Gelvin 2008; PCAMBIA ; Sainsbury et al., 2009; Xiang et al., 1999) که هریک با مهیا نمودن امکانات جدید شرایط انتقال ژن را به گیاه تسهیل نموده‌اند. در این بین وکتورهایی به منظور استفاده در آزمایشات بیان موقت (Hellens et al. 2005; Sainsbury et al., 2009) و آنالیز توالی‌های تنظیمی (Hellens et al., 2005; PCAMBIA ; Sprenger Haussels and Weisshaar 2001) بطور جد اگانه طراحی و معرفی شده اند. ولی با توجه به ویژگی‌های مورد انتظار از یک وکتور جهت آنالیز توالی‌های

تنظیمی در آزمایشات بیان موقت ضرورت دارد تا ویژگی‌های مورد نیاز از هر دو هدف در یک وکتور وجود داشته باشد. از جمله این ویژگی‌ها به حضور یک ژن گزارشگر اینترون دار می‌توان اشاره کرد که امکان تمایز بیان پروکاریوتی و یوکاریوتی ژن گزارشگر را مهیا نماید (Yang et al., 2000). از سوی دیگر باید در بالا دست این ژن گزارشگر یک توالی حد اقل پروموتری قرار گرفته باشد و در فاصله ای مناسب از آن جایگاه‌های آنزیمی جهت کلونینگ توالی‌های تنظیمی وجود داشته باشد(Gurr and Rushton 2005; Rushton et al., 2002). همچنین حضور یک ژن پائین دست یک پروموتر با بیان ثابت بعنوان کنترل می‌تواند در نرمال کردن بیان ژن گزارشگر در آزمون کمی سنجی فعالیت ژن گزارشگر مفید باشد (Hollon and Yoshimura, 1989).

از بین وکتورهای مختلفی که تا کنون بمنظور آنالیز بیان توالی‌های تنظیمی طراحی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند، وکتورpGPTV (Thompson et al., 1987) به دلیل دارا بودن جایگاه کلونینگ مناسب جهت قرار گرفتن توالی‌های تنظیمی کاربرد زیادی داشته است (Heise et al., 2002; Kirsch et al., 2001; Mazarei et al., 2008; Rushton et al., 2002; Shokouhifar et al., 2011a; Shokouhifar et al., 2011b). با این حال ژن گزارشگر این وکتور فاقد اینترون است و به همین دلیل استفاده آن در روش اگروانیجکشن می‌تواند سبب تداخل بیان پروکاریوتی ژن گزارشگر با بیان یوکاریوتی شود و در نتیجه نتایج را غیر قابل اعتماد نماید. از سوی دیگر تعد اد نسخه این وکتور در *E. coli* بسیار کم است (Sprenger Haussels and Weisshaar 2001). این موضوع مراحل کلونینگ این وکتور را با مشکل می‌سازد. لذا رفع این نواقص می‌تواند کارایی این وکتور را در مطالعات آنالیز بیان افزایش دهد. نسل جدید وکتورهای جفتی دارای دو منشاء همانندسازی می‌باشند که یکی مسئول تکثیر وکتور در سلول *E. Coli* است و دیگری به سلول اگروباکتریوم مربوط می‌شود (An et al., 1985). منشاء همانند سازی ColE1 می‌تواند تعد اد نسخه بالائی از وکتور را در *E. coli* تکثیر نماید. همچنین منشاءهای همانند سازی در پلاسمیدهای pVS1 و pRi به ترتیب با تعد اد ۷ تا ۱۰ و ۱۰ تا ۱۵ نسخه در سلول اگروباکتریوم در مقایسه با منشاءهای همانندسازی دیگر مانند منشاء همانندسازی در پلاسمید pSa با دو تا چهار نسخه اختلاف قابل توجهی دارند (Lee and Gelvin, 2008). در وکتورهای مربوط به گروه pCAMBIA منشاء همانند سازی مربوط به *E. coli* و اگروباکتریوم به ترتیب ColE1 و pVS1 است (PCAMBIA). این دو منشاء سبب می‌شود تا این دسته از وکتورها در *E. coli* به تعد اد زیاد تکثیر شده و در اگروباکترویوم در تعداد ۷ تا ۱۰ نسخه بطور پایدار حضور داشته باشند.

ترتیب مجموعه‌های ژنی روی منطقه T-DNA از نکات مهم دیگری به شمار می رود که در یک ناقل بیانی باید مورد توجه قرار گیرد. این مسئله از آن جهت اهیمت دارد که در هنگام انتقال T-DNA توسط سلول اگروباکتریوم به گیاه بطور جهت دار ابتدا ناحیه برش خورده بازوی

راست به درون سلول گیاه تزریق می‌شود. در نتیجه در صورتیکه ژن گزینشگر که جهت غربالگری سلول‌های تراریخت استفاده می‌شود در سمت بازوی راست باشد تعداد زیادی از سلول ها که تنها این بخش از T-DNA را دریافت نمود ه اند قابلیت رشد روی محیط حاوی ماد ه گزینشی مانند آنتی بیوتیک و یا علف کش خواهند د اشت بدون اینکه ژن گزارشگر را که هدف تراریختی است را دریافت نمود ه باشند. این نکته سبب می‌شود تا تعد اد زیادی از نمونه‌های گزینش شد ه مثبت کاذب باشند. این آرایش منطقه T-DNA در بسیاری از وکتورهای جفتی مانند pBI121 قابل مشاهده است (Chen et al., 2003).

در صورتیکه بتوان ویژگی‌های مناسبی از جمله حضور ژن گزارشگر اینترون دار، توالی پروموتر حد اقل، جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی، منشاء همانندسازی با نسخه بالا در *E. coli* جهت تسهیل مراحل کلونینگ و منشاء همانند سازی با ثبات در سلول‌های اگروباکتریوم را در یک وکتور تجمیع نمود می‌توان وکتور مناسبی را جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی در سیستم بیان موفقت در اختیار داشت. لذا مطالعه حاضر با هدف ساخت وکتوری بر پایه وکتورهای pCAMBIA با ویژگی هایی از جمله حضور ژن گزارشگر واجد اینترون و حامل جایگاه های کلونینگ در فاصله مناسب از جایگاه شروع نسخه برداری، انجام شد. این وکتور در آزمایش‌های آنالیز توالی های تنظیمی و الگوی بیان آنها در شرایط مختلف و در پاسخ به عوامل القائی متفاوت کاربرد خواهد داشت. بخصوص در زمانی که از روش بیان موقت مبتنی بر تزریق باکتری بخواهیم استفاده نمائیم.

مواد و روش

مواد باکتریائی و وکتورها: در این تحقیق از سویه DH5α از باکتری *E. coli* جهت انجام مراحل کلونینگ استفاده شد. وکتورهای pCAMBIA3301(Sprenger Haussels)pGPTV، (PCAMBIA 2001 and Weisshaar) و pBGi(Shokouhifar 2009) جهت ساخت و تایید وکتور جدید مورد استفاده قرار گرفت. از واریته *Xantin* توتون و سویه GV3101باکتری *Agrobacterium* tumefaciens تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و وکتورهای pBI121(Chen et al., 2003)، جهت آنالیز بیان موقت استفاده شد.

مراحل ساخت وکتور pCaBGi: مراحل ساخت وکتور pCaBGi با استفاده از نرم افزار Vector Nti, V11 بطور کامل شبیه سازی شد. بمنظور جد اسازی قطعه حامل جایگاه کلونینگ توالی‌های‌های تنظیمی- توالی پروموتر از وکتور pBGi با استفاده از آنزیم‌های BamHI/SnaBI بطور مضاعف در شرایط واکنش حاوی یک میگروگرم وکتور، ۲ واحد آنزیم BamHI و ۲ واحد آنزیم 3-SnaBI در حضور غلظت یک برابر از بافر Thermo Fisher Scientific Inc(Tango) درحجم ۲۰ میکرولیتر هضم شد. همچنین وکتور pCAMBIA3301 در واکنش مشابهی هضم شد تا قطعه

در برگیرنده توالی کامل وکتور جفتی به استثنای توالی پروموتر بالادست ژن گزارشگر از آن جداسازی گردد. محصول واکنش هضم هر دو وکتور در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد. باند های مربوط به قطعه 5'-BamHI:::SnaBI-3' به اندازه ۷۲۰ جفت باز از الگوی الکتروفورزی وکتور pBGi و باند مربوط به قطعه 5'-SnaBI:::BamHI-3' به ترتیب ۹۹۲۷ جفت باز مربوط به وکتور pCAMBIA3301 از روی ژل جداسازی شد و با استفاده از کیت خالص‌سازی از ژل (AccuPrep Gel Purification Kit, Bioneer, Korea) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده قطعات خالص‌سازی شدند. غلظت قطعات خالص شده پس از الکتروفورز روی ژل یک درصد با استفاده از روش تخمین غلظت باند ها در مقایسه با غلظت نزدیکترین باند در اندازه مارکر DNA تعیین شد و مقادیر مورد نیاز از هر قطعه جهت تهیه واکنش اتصال با استفاده از برنامه تحت شبکه ligation calculator (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) محاسبه شد. واکنش اتصال شامل ۱۵ نانوگرم از قطعه 5'-BamHI:::SnaBI-3'، ۵۰ نانوگرم از قطعه 5'-SnaBI:::BamHI-3'، ۱ واحد آنزیم T٤ لیگاز (Thermo Fisher Scientific Inc) و ۲ میکرولیتر از بافر T٤ ۱۰ برابر غلظت (Thermo Fisher Scientific Inc) در حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱٦ درجه نگهداری شد. مرحله تراریختی سلول‌های Dh5α با اضافه نمودن ۲ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال به تیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد و بر اساس روش شوک حرارتی (Sambrook and Russel, 2001) انجام شد. سلول‌های تراریخت شده جهت انتخاب کلنی‌های نوترکیب روی محیط LB (۱۰گرم بر لیتر Bacto-tryptone، ۵گرم بر لیتر Bacto-yeast extract، ۱۰ گرم بر لیتر NaCl و ۱۵ گرم بر لیتر آگار (Microbiology Agar, Sigma) حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین پخش شدند. با توجه به حضور ژن انتخابگر مقاومت به آمپی سیلین در وکتور pBGi و ژن مقاومت به کانامایسین در وکتور pCAMBIA3301 لذا انتظار می‌رفت تنها کلنی‌های نوترکیب حاوی توالی پایه وکتور pCAMBIA3301 روی محیط انتخابی قادر به رشد باشند.

تایید مولکولی کلنی های نوترکیب: کلنی‌های انتخاب شده با استفاده از تکنیک کلنی PCR(Sambrook and Russel, 2001) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تایید شدند. پرایمرها با استفاده از نرم افزار Primer premier V5 طراحی و توسط شرکت Macrogene (South Korea) سنتز شدند. محتویات واکنش شامل یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت پارس توس)، ۱X PCR buffer، ۲۰۰ میکرومولارازمخلوط dNTPs(Genet Bio. Co, South Korea)، ۱/۵ میلی مولار MgCl2 و ۵ پیکومولار پرایمرهای 2F-PSh4 باتوالی 5'-CAC CAT GTT GGC-3' وپرایمر R-PSh4باتوالی 5'-CAC GCC AAT GAC TCC AGA CGA-3'

3-A'در حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه شد و با استفاده از نوک سمپلر استریل هریک از کلنی‌های انتخاب شده بعنوان الگو در واکنش اضافه شدند و بصورت موازی روی محیط LB حاوی کانامایسین کشت شدند. واکنش دردستگاه ترموسایکلر (Personal Thermocycler, MWG Co. Germany) با ۵ دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد (واسرشته سازی اولیه) و ۳۵ چرخه بابرنامه ٤۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتیگراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در ٦۰ درجه سانتیگراد (دمای اتصال)،یک دقیقه در ٦۸ درجه سانتیگراد (دمای بسط بهینه آنزیم پلیمرازبراساس توصیه شرکت پارس توس) ودرنهایت ۵ دقیقه دردمای ۷۲ درجه سانتیگراد(بسط نهایی) انجام شد. محصول واکنش در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی ۱ هزارم غلظت از رنگ green viewer (شرکت پارس توس) جهت رنگ آمیزی استفاده شد. تصویر ژل‌ها با استفاده از دستگاه Geldoc تهیه شد.

استخراج پلاسمید، توالی یابی و آنالیزها: کلنی‌های گزینش شده جهت استخراج پلاسمید در ۳ میلی لیتر محیط LB مایع بصورت شبانه کشت شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (AccuPrep® Plasmid Extraction Kit, Bioneers Co. South Korea) انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده بر اساس دستور العمل شرکت Macrogen آماده شد و با استفاده از پرایمرهای PSh-2F (باتوالی5'- 3-GGTGTTCAATGCTTTTCAAGATAC')و R-PSh3 (با توالی 5'- 3-CCATCAGCACGTTATCGAATCCT') به ترتیب از بالا دست و پائین دست منطقه کلونینگ توالی یابی شدند. نتایج توالی یابی با استفاده از نرم افزار Chromas, V. 2 مورد بررسی قرار گرفت. صحت توالی کلنی‌ها با توالی شبیه سازی شده با استفاده از برنامه Vector Nti, V11 مورد بررسی قرار گرفت. جهت نمایش منطقه T-DNA وکتور ساخته شده از نرم افزار Seqbuilder از مجموعه نرم افزاری Lasergen V.۷ استفاده شد. توالی کامل وکتور با استفاده از نرم افزار Sequin, V ۱۲/۳ در پایگاه داده های زیستی بانک ژن ثبت شد.

تهیه سلول مستعد از سویه GV۳۱۰۱ اگروباکتریوم و انتقال وکتورهای pGCGi،pBI۱۲۱ و pCAMBIA۳۳۰۱ به آن با استفاده از روش انجماد آنی انجام شد (*Hofgen & Willmitzer* 1988). در سلول‌های تراریخت شده با استفاده از تکنیک کلنی PCR و با استفاده از پرایمرهای F-PSh3 (با توالی 5'- 3-GCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGA') و R-PSh3 تایید شد. کلنی‌های تایید شده در محیط LB مایع حاوی ۳۰ میلیگرم در لیتر ریفآمپیسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین کشت و به مدت یک شب در ۲۸ درجه سانتیگراد و با ۱۵۰ دور در دقیقه در شیکر نگهداری شد. حجم یک میلی لیتر از کشت شبانه کلنی ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سلول‌های رسوب د اده شده پس از حذف محلول روئی جهت سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز مورد استفاده قرار گرفت.

بیان پایه توالی پروموتر حداقل تعبیه شده در وکتور pCaBGi مطابق با استفاده از روش تزریق سوسپانسیون اگروباکتریوم در برگ توتون مورد بررسی قرار گرفت (Yang et al., 2000). از سویه‌های حامل وکتورهای pCAMBIA3301 و pBI121 نیز بعنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

گیاهچه ها بعد از تزریق بوسیله پوشش های پلاستیکی پوشانده شدند و در دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از ۲٤ ساعت پوشش های پلاستیکی حذف گردید و برگ های تزریق شده بعد از ۲٤ ساعت جهت سنجش هیستوشیمیایی فعالیت ژن[۱] GUS مورد استفاده قرار گرفتند. سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونید از و تصویربرداری از نمونه ها مطابق با روش Bahrabadi و همکاران در سال ۲۰۱٤ انجام شد (Bahrabadi et al., 2014).

نتایج

به منظور ساخت وکتور بیانی مناسب جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی وکتور pCaBGi طراحی و ساخته شد. در ساخت این وکتور از دو وکتور pCAMBIA3301 و pBGi(Shokouhifar, 2009) استفاده شد. وکتور pCAMBIA3301 بعنوان توالی پایه دارای منشاء تکثیر با تعداد نسخه بالا در سویه‌های اشرشیاکلی، منشاء تکثیر با پایداری بالا در سویه‌های اگروباکتریوم، حامل ژن مقاومت به کاناماسین جهت گزینش در سلول‌های پروکاریوتی و ژن[۲] bar جهت مقاومت به علفکش مورد استفاده قرار گرفت. وکتور pBGi به عنوان دهنده جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی و همچنین توالی پروموتر حداقل بکارگرفته شد. از آنجا که در وکتور pCAMBIA3301 ژن گزارشگر GUS تحت کنترل پروموتر 35S CaMV قرار دارد با حذف توالی این پرومتر و قرار دادن توالی پروموتر حداقل و جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی در بالادست ژن گزارشگر می‌توان وکتور مناسبی جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی بدست آورد. مقایسه توالی دو وکتور نشان داد آنزیم BamHI در هر دو وکتور در بالادست توالی پروموتری دارای جایگاه برشی است. در وکتور pCAMBIA3301 این جایگاه در بالادست پروموتر CaMV35S و در پائین دست پروموتر مربوط به ژن گزینشگر bar (به عنوان مسئول مقاومت به علف کش سیستمیک گلوفوسینیت[۳]) قرار دارد. لذا با این آنزیم میتوان توالی پروموتر مربوط به ژن GUS را از وکتور pCAMBIA3301 جدا نمود. در وکتور pBGi آنزیم BamHI در بالادست جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی قرار دارد و با استفاده از آن می‌توان قطعه در برگیرنده جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی و توالی پروموتر حداقل را بدست آورد. مقایسه توالی هر دو وکتور در مناطق پائین دست توالی پروموتری نشان

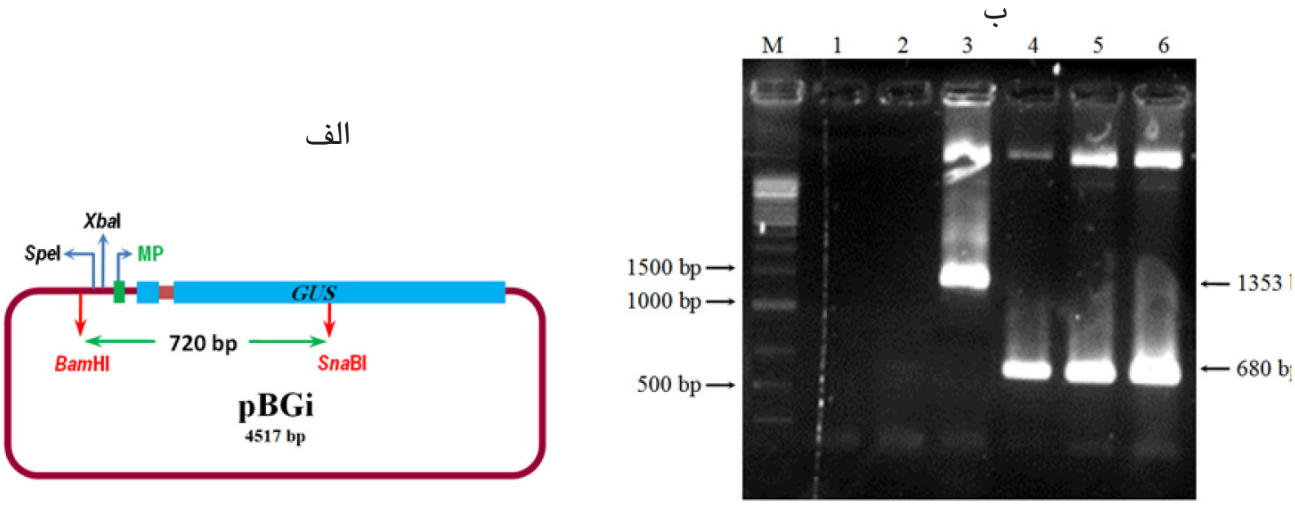
۱-β-glucuronidase
۲-Bialaphos Resistance (bar) gene
۳-Glufosinate

داد آنزیم SnaBI در موقعیت مشابهی درون ژن گزارشگر GUS قرار گرفته است. هضم آنزیمی دو وکتور pBGi و pCAMBIA3301 با جفت آنزیم BamHI/SnaBI به ترتیب به تولید قطعات (۷۲۰–۳۷۹۷) و (۱۳۹۲–۹۹۲۷) منتج شد (نتایج هضم آنزیمی ارائه نشد ه است). در این بین قطعات 3-BamHI:::SnaBI-'5 و 3-SnaBI:::BamHI-'5 به ترتیب به اندازه های ۷۲۰ و ۹۹۲۷ جفت باز از محصول هضم آنزیمی وکتورهایpBGi و pCAMBIA3301جداسازی شد و با اتصال این دو قطعه وکتور pCaBGi به اند ا زه ۱۰٦٤۷ جفت باز ساخته شد.

محصول واکنش اتصال به سلول‌های مستعد منتقل و سلول‌های تراریخته با توجه به ژن گزینشگر پروکاریوتی (کانامایسین) موجود در توالی پایه مربوط به وکتور pCAMBIA3301 روی محیط حاوی کانامایسین گزینش شدند. وکتور pBGi حامل ژن مقاومت به آمپی سیلین است لذا سلول‌های حاوی این وکتور و یا پلاسمید حاصل از باز اتصال آن قادر به رشد روی محیط کشت نخواهند بود. لذا تنها کلنی‌های حاوی وکتور pCAMBIA3301 و سازه نوترکیب pCaBGi قادر به رشد روی محیط کشت نخواهد بود. بمنظور تمایز این کلنی ها و در نهایت انتخاب کلنی‌های حامل سازه نوترکیب pCaBGi یک جفت پرایمر اختصاصی برای منطقه بالادست جایگاه BamHI و دیگری در بالادست جایگاه آنزیم SnaBI و درون قطعه جد ا شد ه از pBGi به ترتیب به نام‌های F2-PSh4 و R-PSh4 طراحی شد (شکل ۱– الف). به دلیل اختصاصی بودن پرایمر F2-PSh4 با توالی وکتور pCAMBIA3301 امکان اتصال آن به وکتور pBGi وجود ندارد، لذا انتظار می‌رود از کلنی‌های حاوی این وکتور باندی تکثیر نشود. در مقابل هر دو پرایمر شانس اتصال به کلنی‌های حاوی pCAMBIA3301 و سازه نوترکیب pCaBGi را د ارند ولی به دلیل تفاوت اند ازه قطعه حد فاصل این دو جایگاه در این دو وکتور باند های حاصل از هریک کاملا متفاوت است. همانگونه که در نمای شماتیک وکتور pCaBGi(شکل ۱ –الف) مشاهده می‌شود با استفاده از جفت پرایمر PSh4-R/F2 انتظار می‌رود باندی به اند ازه ٦۸۰ جفت باز در محصول PCR مربوط به کلنی‌های حاوی سازه نوترکیب pCaBGi تکثیر شود، در حالیکه طول قطعه قابل تکثیر در وکتور pCAMBIA3301 به دلیل حضور توالی کامل پروموتر CaMV35S در بالادست ژن گزارشگر GUS بیش از ۱۳۰۰ جفت باز خواهد بود. بر این اساس با استفاده از تکنیک کلنی PCR کلنی‌های حاوی سازه نوترکیب انتخاب شدند. پس از کشت شبانه و استخراج پلاسمید از کلنی‌های نوترکیب نتایج الکتروفورز نشان د اد غلظت پلاسمید استخراج شد ه مانند وکتور pCAMBIA3301 بسیار بالاتر از غلظت مشاهده شده از استخراج کلنی‌های حاوی وکتور pGPTV است.

بمنظور تایید مجدد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی R/F2-PSh4 صحت سازه جدید تایید شد. بدین منظور از پلاسمید های مربوط به وکتورهای pBGi و pCAMBIA3301 بعنوان کنترل

استفاده شد. همانگونه که در شکل ۱–ب مشاهده می‌شود در چاهک مربوط به وکتور pBGi مشابه با نمونه کنترل منفی باندی قابل مشاهده نبود در حالیکه در چاهک مربوط به وکتور pCAMBIA3301 باندی حد واسط باند های ۱ و ۱,۵ کیلوباز مربوط به مارکر تکثیر شده بود که با اندازه مورد انتظار انطباق داشت. در چاهک‌های ۵ تا ۸ که مربوط به کلنی‌های مورد ارزیابی است تکثیر باندی در حدواسط باند های ۵۰۰ و ۷۵۰ جفت باز مربوط به مارکر قابل مشاهده است که با اند ازه قطعه قابل تکثیر از سازه نوترکیب pCaBGi به اندازه ٦٨٠ جفت باز انطباق دارد. باند های سنگین که در الگوی الکتروفورزی نمونه ها در محدود ه بالاتر از ۱۰ کیلوباز مشاهده می‌شوند به پلاسمید اضافه شده در واکنش مربوط می‌شود که بعنوان DNA الگو استفاده شده‌اند.



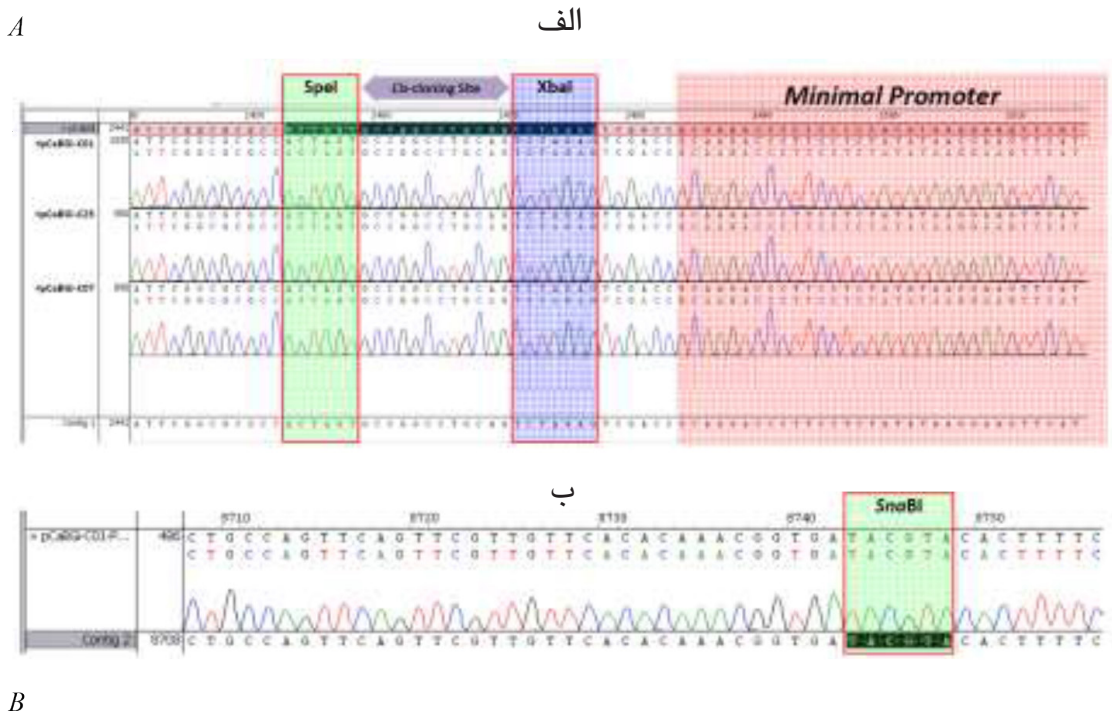
شکل ۱: نمای شماتیک وکتور pCaBGi (الف) و نتایج کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای PSh4–R/F2 (ب).

الف: منطقه T-DNA وکتور pCaBGi نشان د هند ه جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی، توالی پروموتر حداقل مربوط به CaMV35S متصل شد ه به ژن گزارشگر GUS واجد اینترون.

ب: تایید کلنی‌های نوترکیب با استفاده از تکنیک کلنی PCR، ۱– کنترل منفی PCR ۲و ۳– به ترتیب 3301 بعنوان کنترل منفی و مثبت؛ ٤، ٥ وpCAMBIA و pBGi مربوط به وکتورهای PCR محصول DNA، مارکر وزنی M– ٦. کلنی‌های نوترکیب منتخب

با توجه به اهمیت جایگاه‌های آنزیمی XbaI و SpeI و همچنین اطمینان از عدم وجود جهش در محل‌های اتصال پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های نوترکیب به نام‌های pCaBGi-C۱, ۷, ۲۵ با استفاده از پرایمر R-PSh4 توالی یابی شدند. مقایسه نتایج توالی یابی سازه‌های نوترکیب با توالی شبیه سازی شده مربوط به وکتور pCaBGi صحت توالی این سازه ها را در ناحیه

بالادست ژن GUS کاملاً تایید نمود (شکل ۲ –الف). این نتایج نشان داد این ناحیه فاقد توالی پروموتر CaMV35S است و توالی مربوط جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی در حد فاصل جایگاه آنزیم‌های 5'-XbaI:::SpeI-3' بطور صحیح در بالادست توالی مربوط به پروموتر حداقل قرار گرفته است. از میان سه کلنی تایید شده کلنی pCaBGi-C1 انتخاب و صحت توالی آن در محل جایگاه آنزیم SnaBI مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پرایمر R-PSh3 با فاصله حدود ۲۰۰ جفت باز در پائین دست جایگاه این آنزیم طراحی شد (شکل ۱–الف) و پلاسمید pCaBGi-C1 بوسیله آن توالی یابی شد. نتایج توالی یابی نشان داد در این ناحیه نیز توالی کلنی نوترکیب انتخاب شده با توالی مورد انتظار کاملاً انطباق دارد (شکل ۲– ب). این نتایج نشان داد مراحل کلونینگ صحیح انجام شده است و سازه نوترکیب انتخاب شده دارای توالی مورد انتظار است.

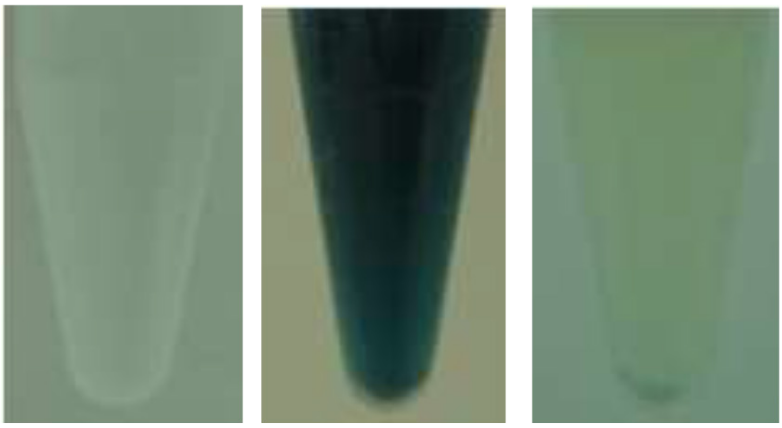


شکل ۲: آنالیز نتایج توالی‌یابی کلنی‌های pBCaF7، pBCaF25 و pBCaF1

الف: نتایج توالی یابی با پرایمر R-PSh4 نشان د هند ه صحت توالی کلنی‌های توالی یابی شد ه د ر منطقه میان آنزیم‌های XbaI و SpeI

ب: نتیجه توالی یابی کلنی pCaBGi-C01 با پرایمر R-PSh3 تایید کنند ه صحت جایگاه کلونینگ SnaBI

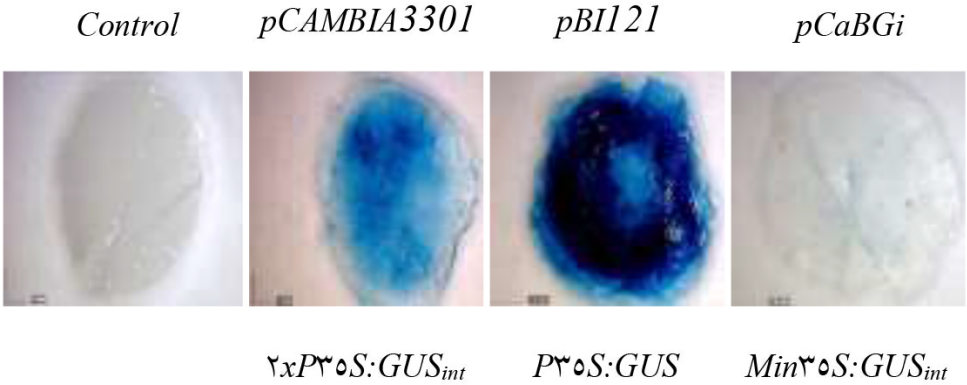
عدم بیان ژن GUS اینترون د ار در سلول‌های اگروباکتریوم با سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونید از در سلول‌های ترایخت شده با وکتور pCaBGi در مقایسه با سلول‌های حامل سازه‌های pCAMBIA3301 و pBI121 مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳) . نتایج نشان داد سلول‌های حامل وکتور pBI121 که د ارای ژن GUS فاقد اینترون است بخوبی و با شدت در سیستم پروکاریوتی قادر به بیان می‌باشد. در مقابل در سلول‌های حامل وکتور pCAMBIA3301 که دارای ژن GUS اینترون دار است فعالیت آنزیم بتاگلوکورونید از مشاهده نشد. در سلول‌های حامل وکتور pCaBGi نیز مشابه با وکتور pCAMBIA3301 فعالیت آنزیم بتاگلوکورونید از مشاهده نشد (شکل ۳). این نتایج نشان داد حضور اینترون در ژن گزارشگر GUS مانع از بیان آنزیم بتاگلوکورونیداز در سیستم‌های پروکاریوتی می‌شود که کاملا مورد انتظار بود.



pCaBGi *pBI121* *pCAMBIA3301*

شکل ۳: سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونید از در سلول‌های سویه GV3101 حامل وکتورهای pCAMBIA3301، pCaBGi و pBI121.

عدم بیان پایه پروموتر حد اقل وکتور pCaBGi در مقایسه با بیان پروموتر کامل 35S CaMV با استفاده از روش تزریق اگروباکتریوم در برگ گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت (شکل ٤). نمونه‌های تزریق شد ه با استفاده از سویه GV3101 اگروباکتریوم حامل وکتور pBI121 د ارای پروموتر کامل و ژن GUS فاقد اینترون به شدت فعالیت آنزیم بتاگلوکرونید از را ۲٤ ساعت پس از تزریق کاملا نشان د ادند. در حالیکه در نمونه مربوط به سازه pCAMBIA3301 شدت بیان اندکی کمتر بود. بیان پایه در نمونه‌های مربوط به وکتور pCaBGi بسیار اندک بود (شکل ٤).



شکل٤: آنالیز عملکرد وکتورهای pCAMBIA3301، pCaBGi و pBI121 با استفاده از روش بیان موقت ژن GUS مبتنی بر تزریق اگروباکتریوم د ر برگ توتون ۲٤ ساعت پس از تزریق.

Control: دیسک‌های برگی تزریق شد ه با سویه فاقد وکتور بعنوان کنترل منفی، 2xP35S:GUSint: مجموعه بیان حامل د و نسخه پروموتر CaMV35S و ژن گزارشگر GUS اینترونـد ار، P35S:GUS: مجموعه بیانی حامل پروموتر CaMV35S و ژن گزارشگر GUS فاقد اینترون، Min35S:GUSint: مجموعه بیانی حامل توالی حد اقل پروموتر CaMV35S و ژن گزارشگر GUS اینترون دار.

بحث و نتیجه گیری

آنالیز بیان موقت مبتنی بر تزریق سلول‌های اگروباکتریوم روش بسیار ساده و در دسترسی برای بررسی کارکرد ژن ها و پروموترها بشمار می‌رود. این مطالعه با هدف ساخت وکتور مناسب جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی در روش تزریق سلول‌های اگروباکتریوم انجام شد. اجزاء مورد نیاز برای آنالیز توالی‌های تنظیمی از وکتور pBGi گرفته شد و در بالادست توالی ژن گزارشگر pCAMBIA3301 قرار داده شد. پس از تایید مراحل کلونینگ با استفاده از روش‌های مولکولی و صحت توالی وکتور در منطقه جایگزین شده با توالی یابی مورد تایید قرار گرفت و وکتور جدید به نام pCaBGi نام گذاری شد. آنالیز بیان وکتور جدید با استفاده از روش تزریق سلول‌های اگروباکتریوم در برگ گیاه توتون انجام شد و میزان بیان پایه در وکتور جدید در گیاه مدل توتون مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی نتایج مطالعه نشان می‌د هد با توجه به مهیا بودن شرایط جهت بیان موقت ژن بتاگلوکورونید از، بیان پایه پروموتر حد اقل بکاربرد ه شد ه در ساختار وکتور pCaBGi در مقایسه با پروموتر کامل CaMV35S بسیار جزئی است. بیان پایه اندک در انتخاب وکتورهای آنالیز پروموتر بسیار ضروری است (Gurr and Rushton 2005; Yang et al., 2000). جهت ساخت پروموترهای مصنوعی با شرایط بیان اختصاصی از وکتورهای دارای بیان پایه اندک استفاده شد

ه است (Rushton et al., 2002; Shokouhifar et al., 2011a). بر اساس نتایج بدست آمده وکتور pCaBGi ساخته شده در مطالعه حاضر با توجه به بیان پایه بسیار اندک قابلیت بالائی جهت ساخت پروموترهای مصنوعی با بیان اختصاصی خواهد داشت. همچنین این وکتور بخوبی می‌تواند جهت استفاده در مطالعات آنالیز توالی‌های تنظیمی مورد استفاده قرار گیرد.

مشخصات وکتور pCaBGi: وکتور pCaBGi یک وکتور بیانی جفتی فاقد توالی پروموتری است. این وکتور ۱۰٦٤۷ جفت باز طول دارد و توالی کامل آن در پایگاه داده های زیستی NCBI با شماره بازیابی MG719235 در دسترس می‌باشد. اجزاء تشکیل دهنده منطقه T-DNA وکتور در شکل ٥ ارائه شده است. این ناحیه با طول ٤٤١٤ جفت باز در حدفاصل بازوی چپ در انتهای 5' و بازوی راست در انتهای 3' محدود شد ه است و حامل دو مجموعه ژنی است. مجموعه ژن گزینشگر bar تحت کنترل پروموتر کامل مضاعف شده CaMV35S و خاتمه دهنده poly A روی رشته آنتی سنس و در سمت بازوی چپ قرار گرفته است. مجموعه دوم شامل ژن گزارشگر GUS که فاقد توالی پروموتری بوده و در پائین دست جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی و توالی پروموتر حد اقل قرار گرفته است و در پائین دست آن توالی خاتمه دهنده Nos poly A قرار گرفته است. ژن گزارشگر GUS واجد توالی اینترونی است. این مجموعه روی رشته سنس و در بالادست بازوی راست قرار گرفته است.

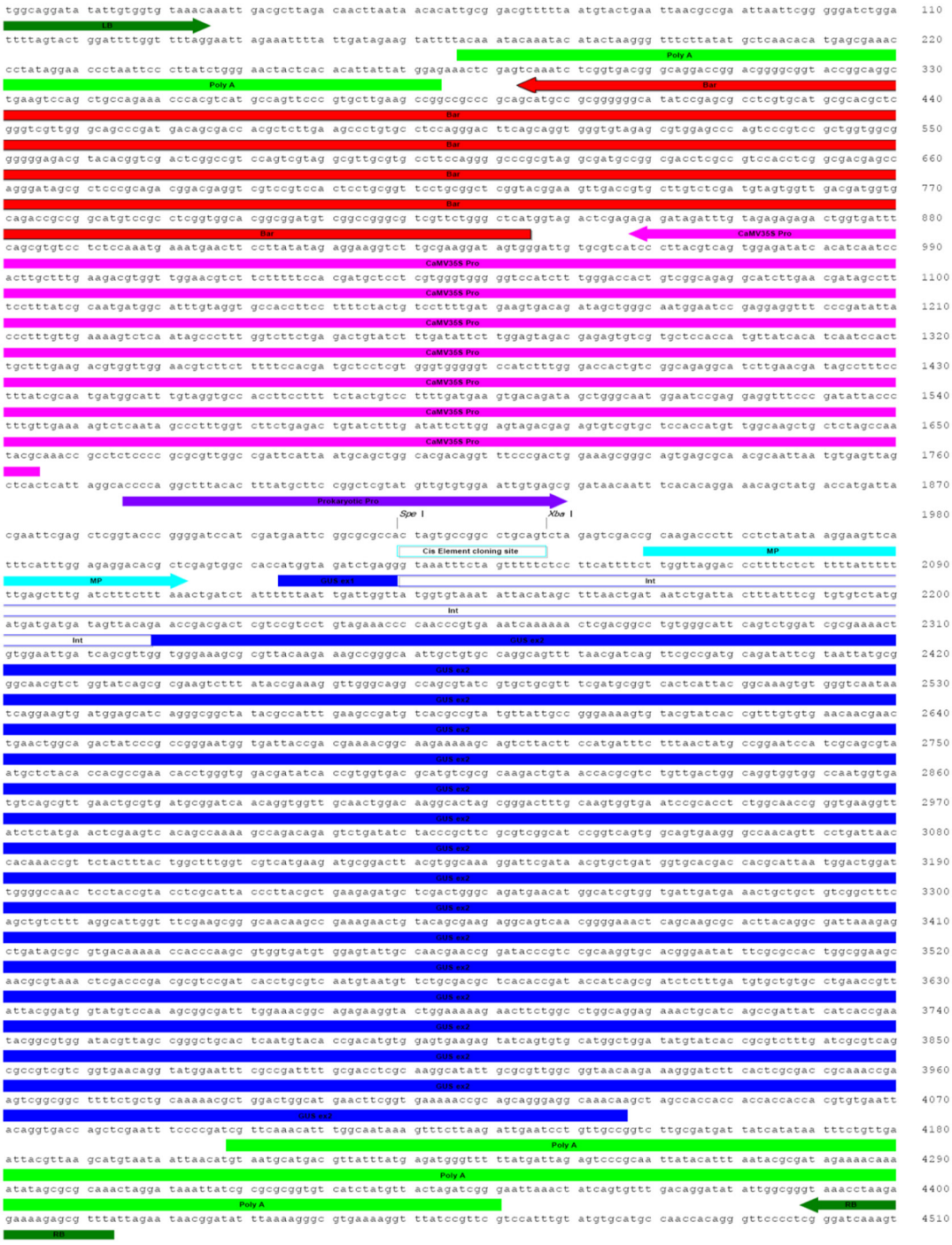
ترتیب ژن گزارشگر و گزینشگر در وکتور pCaBGi بگونه ای در نظر گرفته شده است که ژن گزینشگر در انتهای قطعه T-DNA باشد و لذا گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک و یا علف کش با احتمال زیادی ژن گزارشگر را نیز دریافت نموده اند. این ساختار در وکتورهای جفتی مانند مجموعه وکتورهای مربوط به خانواده VTPGp (raahssieW dna slessuaH regnerpS 1002) و pCAMBIA (PCAMBIA)همچنین در وکتورهای جدیدتر (Hellens et al., 2005; Xiang et al., 1999) نیز رعایت شده است.

یکی دیگر از ویژگی‌های وکتور pCaBGi لحاظ نمودن جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی در حدفاصل آنزیم‌های 5'-SpeI::XbaI-3' است. این دو آنزیم به دلیل دارا بودن انتهای سازگار پس از برش امکان مضاعف سازی و ساخت ترکیبات مختلفی از توالی‌های تنظیمی را مهیا می‌نمایند. این این ویژگی در ساخت پروموترهای مصنوعی مختلفی بکار گرفته شده است (Mazarei et al., 2008; Rushton et al., 2002; Shokouhifar 2009; Shokouhifar et al., 2011a; Shokouhifar et al., 2011b). این ویژگی از وکتور pBGi (Shokouhifar 2009) به وکتور pCaBGi منتقل شده است. جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی در فاصله حدود ۲۰ نوکلئوتیدی از توالی TATA Box موجود در توالی پروموتر حداقل قرار گرفته است. حضور ژن گزارشگر

GUS واجد اینترون یکی دیگر از ویژگی‌های وکتور pCaBGi است. حضور اینترون تنها بیان ژن GUS را به سلول‌های یوکاریوتی محدود می‌نماید. در نتیجه تنها سلول‌های گیاهای تراریخت شد ه قادر به بیان این ژن و در نتیجه تولید آنزیم بتاگلوکورونید از خواهند بود. به همین دلیل در هنگام سنجش فعالی این آنزیم و بررسی عملکرد توالی‌های تنظیمی بالادست آن از تداخل بیان پروکاریوتی که ناشی از بیان ژن در سلول اگروباکتریوم است ممانعت می‌شود. مطالعات نشان داده است در وکتورهای حامل ژن GUS فاقد اینترون مانند pBI121 و pGPTV در هنگام سنجش فعالیت آنزیم مشکلاتی بروز می‌نماید که ناشی از بیان باکتریائی این ژن و تد اخل آن در نتایج کمی و کیفی است (Shokouhifar, 2009).

ویژگی مهم دیگر وکتور pCaBGi بهره‌گیری از ژن گزینشگر bar است. ژن bar قادر است علف کش بیولافوس با نام تجاری گلیفوسینیت را تجزیه نماید (Thompson et al., 1987) و اولین بار در سال ۱۹۸۷ جهت تولید گیاهان مقاوم به علفکش مورد استفاده قرار گرفته است (De Block et al., 1987). استفاده از این ژن علاوه بر افزایش ضریب اطمینان در گزینش گیاهان تراریخت سبب می‌شود تا گیاهان تراریخت تولید شده علاوه بر دریافت ژن هدف در برابر یک علف کش نیز مقاوم شوند.

وکتور pCaBGi به دلیل دریافت توالی پایه خود از وکتور pCAMBIA3301 نقاط قوت این وکتور را نیز دریافت نموده است. از جمله این نقاط قوت می‌توان به تکثیر آن در تعداد نسخه بسیار بالا در باکتری اشرشیاکلی اشاره نمود که ناشی از حضور منشاء تکثیر مربوط به وکتور pBR322 در این وکتور است. این ویژگی سبب می‌شود کار با این وکتور در مراحل کلونینگ برخلاف وکتورهایی کم نسخه مانند pGPTV و pBI121 تسهیل گردد. از سوی دیگر به دلیل وجود منشاء تکثیر مربوط به وکتور pVS1 ای وکتور در سلول اگروباکتریوم با تعداد نسخه کم تکثیر ولی بطور پایداری در مراحل تکثیر در باکتری حفظ می‌شود و احتمال حذف شدن آن بسیار اندک است. توالی و اجزاء وکتور pCaBGi به شماره بازیابی MG719235 به طور کامل در شکل ۵ نمایش داده شده است.



شکل ۵: توالی کامل منطقه T-DNA مربوط به وکتور pCaBGi

بر اساس مجموعه ویژگی‌های فوق می‌توان وکتور pCaBGi را بعنوان یک وکتور بیانی فاقد توالی پروموتری جهت استفاده در مراحل کلونینگ و ساخت پروموتر مصنوعی مورد استفاده قرار داد و پس از تایید صحت توالی پروموتری بدون دستورزی بیشتر از آن جهت انتقال به سلول اگروباکتریوم و در نهایت بیان موقت در گیاه مورد استفاده قرار داد.

سپاسگزاری

از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکد ه علوم گیاهی د انشگاه فردوسی مشهد به دلیل مهیا نمودن فضای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود. از همکاران پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به جهت در اختیار قرار د ادن سویه‌های باکتری و وکتورهای مورد استفاده تشکر می‌نمائیم. منابع مالی این تحقیق از محل طرح شماره ۱۵۲۸۵ معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شد.

منابع

An, G. Watson, B. Stachel, S. Gordon, M. and Nester, E. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. The EMBO journal 4: 277-284.

Bahrabadi, M. Shokouhifar, F. and Ebrahimi, M.A. (2014) Functional analysis of sp-dd synthetic promoter using agroinjection method in tobacco plant. Crop Biotechnology 6: 11-20.

Blazeck, J. and Hal, S. A. (2013) Promoter Engineering: Recent Advances in Controlling Transcription at the Most Fundamental Level. Biotechnology journal 8: 46-58.

Cazzonelli, C.I. and Velten, J. (2008) In Vivo Characterization of Plant Promoter Element Interaction Using Synthetic Promoters. Transgenic Research 17: 437-457.

Chen, P.Y. Wang, C.K. Soong, S.C. and To, K.Y. (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning t-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding 11: 287-293.

De-Block, M. Botterman, J. Vandewiele, M. Dockx, J. Thoen, C. Gossele, V. Movva, N.R. Thompson, C. Van-Montagu, M. and Leemans, J. (1987) Engineering herbicide

resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. The EMBO journal 6: 2513-2518.

Gurr, S.J. and Rushton, P.J. (2005) Engineering plants with increased disease resistance: How are we going to express it? Trends in Biotechnology 23: 283-290.

Gynheung, A. (1987) Binary ti vectors for plant transformation and promoter analysis. Methods in enzymology 153: 292-305.

Heise, A. Lippok, B. Kirsch, C. and Hahlbrock, K. (2002) Two immediate-early pathogen-responsive members of the atcmpg gene family in arabidopsis thaliana and the w-box-containing elicitor-response element of atcmpg1. Proceedings of the National Academy of Sciences 99: 9049-9054.

Hellens, R.P. Allan, A.C. Friel, E.N. Bolitho, K. Grafton, K. Templeton, M.D. Karunairetnam, S. Gleave, A.P. and Laing, W.A. (2005) Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and rna silencing in plants. Plant Methods 1: 1-14.

Hellens, R.P. Edwards, E.A. Leyland, N.R. Bean, S. and Mullineaux, P.M. (2000) Pgreen: A versatile and flexible binary ti vector for agrobacterium-mediated plant transformation. Plant molecular biology 42: 819-832.

Hoekema, A. Hirsch, P. Hooykaas, P. and Schilperoort, R. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir-and t-region of the Agrobacterium tumefaciens ti-plasmid. Nature 303: 179-180.

Hollon, T. and Yoshimura, F.K. (1989) Variation in enzymatic transient gene expression assays. Analytical biochemistry 182: 411-418.

Kirsch, C. Logemann, E. Lippok, B. Schmelzer, E. and Hahlbrock, K. (2001) A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated cmpg1 gene in petroselinum crispum. The Plant Journal 26: 217-227.

Lee, L.-Y. and Gelvin, S.B. (2008) T-DNA binary vectors and systems. Plant Physiology 146: 325-332.

Liu, W. Mazarei, M. Rudis, M. Fethe, M. and Stewart, C. (2011) Rapid in vivo analysis of synthetic promoters for plant pathogen phytosensing. BMC biotechnology 11: 1-9.

Mazarei, M. Teplova, I. Hajimorad, M.R. and Stewart, C.N. (2008) Pathogen phytosensing: Plants to report plant pathogens. Sensors 8: 2628-2641.

Mehrotra, R. Gupta, G. Sethi, R. Bhalothia, P. Kumar N. and Mehrotra, S. (2011) Designer Promoter: An Artwork of Cis Engineering. Plant molecular biology 75: 527-536.

PCAMBIA. http://www.cambia.org

Rushton, P.J. Reinstadler, A. Lipka, V. Lippok, B. and Somssich, I.E. (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. The Plant Cell Online 14: 749-762.

Sainsbury, F. Thuenemann, E.C. and Lomonossoff, G.P. (2009) Peaq: Versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. Plant Biotechnology Journal 7: 682-693.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (3-volume set).Cold Spring Harbour Lab. Press. -909pp, New York.Shokouhifar, F. (2009) Construction and functional analysis of pathogene inducible promoters in Canola. Biotechnology, National Institute of Genetic engineering and Biotechnology, 204pp.Tehran.

Shokouhifar, F. Zamani, M. Motallebi, M. Mousavi, A. and Malboobi, M. (2011a) Construction and functional analysis of pathogen-inducible synthetic promoters in brassica napus. Biologia Plantarum 55: 689-695.

Shokouhifar, F. Zamani, M.R. and Motallebi, M. (2011b) Expression pattern of the synthetic pathogen-inducible promoter (synp-ff) in the transgenic canola in response to sclerotinia sclerotiorum. Iranian Journal of Biotechnology 9: 1-10.

Sprenger-Haussels, M. and Weisshaar, B. (2001) Transactivation properties of parsley proline-rich bzip transcription factors. The Plant Journal, 22: 1-8.

Thompson, C.J. Movva, N.R. Tizard, R. Crameri, R. Davies, J.E. Lauwereys, M. and Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from streptomyces hygroscopicus. The EMBO journal 6: 2519–2523.

Xiang, C. Han, P. Lutziger, I. Wang, K. and Oliver, D.J. (1999) A mini binary vector series

for plant transformation. Plant molecular biology 40: 711-717.

Yang, Y. Li, R. and Qi, M. (2000) In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. The Plant Journal 22: 543-551.