

Escrutinio de una biblioteca genómica de *Musa acuminata* (AA) con sondas de expresión tejido específicas

Maribel Colmenares Esqueda^{1*}, Carlo Giménez Alvarado¹,
Elizabeth Ortiz Vázquez² y Miguel Gómez Lim^{2,3}

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal (BioVeLUZ), Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526,
Maracaibo, Venezuela. ²Tecnológico de Mérida, Av. Tecnológico S/N C.P., 97118,
Mérida, Yucatán, México. ³Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV,
Unidad Irapuato 629, Gto México

Recibido: 09-11-05 Aceptado: 16-06-06

Resumen

Una de las limitaciones en la aplicación de la biotecnología en *Musa* es la escasez de conocimientos de sus genes y de las complejas interacciones que influyen en la expresión de los rasgos cuantitativos más importantes en la planta. El análisis de bibliotecas genómicas BIBAC permite capturar genes de interés y estudiar su función, mediante la transformación genética directa con grandes fragmentos de ADN y el análisis del fenotipo de los transgénicos obtenidos. En este trabajo se identificaron clones BIBAC utilizando sondas homólogas y heterólogas de expresión tejido específicas: a) Una proteína del fotosistema II, PbsR de 10kDa de expresión específica en hojas de arroz (GenBank CA762808), b) Un gen de arroz inducible "Elicitor Responsive Gen" (ERG GenBank D24373) y c) Un fragmento amplificado por PCR con oligonucleótidos específicos del gen de taumatina (Genbank AF001528), en cv. Gran Enano (AAA). Mediante análisis northern blot se verificó la expresión de cada una de las sondas en diferentes tejidos del cv. Gran Enano (AAA). La sonda de PbsR mostró una expresión específica en hoja, mientras que la ERG no fue detectada en ninguno de los tejidos analizados. Respecto a la sonda de taumatina se encontró expresión en cáscara y fruto. Tres membranas de la biblioteca genómica conteniendo 4.608 fragmentos de ADN clonado, fueron hibridadas utilizando procedimientos estándares para sondas con marcaje radiactivo [α -³²P] dCTP. Las condiciones de hibridación y lavados fueron de alta astringencia. De 13.824 clones BIBAC revisados con cada sonda se identificaron: seis clones con la sonda de hoja (PbsR), un clon con la sonda ERG y veinte clones positivos para la sonda de taumatina. En este trabajo se discuten las posibles aplicaciones de los clones BIBAC identificados. A este respecto se pretende la caracterización de secuencias promotoras tejido específico y secuencias terminadoras que sirvan para el diseño de nuevos vectores aplicables en el mejoramiento genético de *Musa*.

Palabras clave: BIBAC; biblioteca genómica; ERG; Pbs; taumatina; Tuu Gia (AA).

*

Gene library screening of *Musa acuminata* (AA) with tissue specific probes

Abstract

One limitation of biotechnology application in *Musa* is the lack of knowledge of their genes and the complex interactions that influence the expression of the most important quantitative features in the plant. The analysis of BIBAC gene libraries allows to fish genes of interest and to study their function, by means of direct genetic transformation with big DNA fragments and analysis of the phenotype in the transgenic plants. In this work, BIBAC clones were identified using homologous and heterologous probes with tissue specific expression: a) A leaf specific protein of rice which belongs to the photosystem II, PbsR 10kDa (GenBank CA762808), b) A fungal elicitor responsive gene of rice (ERG GenBank D24373) and c) A thaumatin PCR fragment (Genbank AF001528) amplified by specific primers in cv. Grand Nain (AAA). Northern blots of each probe were performed to verify the gene expression at different tissues in cv. Grand Nain (AAA). The PbsR probe showed a specific leaf expression, while the ERG was not detected in none of the analyzed tissue. Regarding thaumatin probe was specific expressed in peel and fruit. Three membranes of the gene library with 4,608 cloned DNA fragments, was hybridized using standard procedures with radioactive labeled probes [α -³²P] dCTP. High stringency hybridization and washing conditions were applied. Out of the 13,824 BIBAC clones screened with each probe, was identified: six clones with PbsR specific leaf probe, one clone with ERG probe and twenty positive clones for thaumatin probe. In this work, the possible applications of the identified BIBAC clones are discussed. To this respect, it is pretended to characterize tissue specific promoters for design new vectors for *Musa* transgenesis and its genetic improvement.

Key words: BIBAC; ERG; gene library; PbsR; thaumatin; Tuu Gia (AA).

Introducción

Los plátanos y bananos (*Musa* sp.) son el cuarto cultivo mas importante comercialmente del mundo después del arroz, trigo y maíz. La identificación, aislamiento y caracterización de genes nuevos que codifican para características de importancia agronómica y su introducción a cultivares a través de una combinación de técnicas de transformación genética y regeneración *in vitro*, ofrecen expectativas para resolver los problemas en musáceas (1).

La transferencia de genes nuevos hacia el genoma de una planta puede resultar en el incremento en la tolerancia al estrés abiótico o protección contra patógenos y plagas o puede mejorar la calidad nutricional y fisiológica o las propiedades de almacenamiento. El uso de estas tecnologías en musáceas está bien justificado dado

que el mejoramiento genético convencional es limitado por la alta esterilidad y niveles de ploidía de los cultivares comerciales (2).

Las bibliotecas genómicas han servido como una herramienta en el aislamiento y caracterización de regiones importantes del genoma. Utilizando vectores de tipo Cromosoma Bacteriano Artificial Binario (BIBAC), se puede incorporar un grupo de genes en un solo inserto de ADN y además pueden ser transferidos directamente a la planta a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (3). La barrera que presentaba el tamaño del ADN para ser transferido a la planta se ha superado, ahora se pueden alterar las características de calidad y rendimiento que son controlados por genes múltiples. Varios rasgos agronómicamente importantes son controlados por características cuantitativas (QTL). Se han encontrado grupos de ge-

nes de resistencia estimados en más de 100 kb (4). Los vectores BIBAC pueden por primera vez facilitar el manejo de tales características complejas en las plantas.

Se han aplicado una serie de metodologías biotecnológicas para el mejoramiento de *Musa*. Entre ellas se encuentran el cultivo de tejidos (5, 6) y han sido desarrollados varios métodos de transformación para plátanos y bananos (7-10). Sin embargo, a pesar de todos estos avances, hay un área que se no se ha atendido adecuadamente y es la falta de promotores homólogos tejido específico para los programas de transgénesis.

Esta investigación es el primer paso hacia la caracterización estructural y funcional de genes de interés respecto a: regiones promotoras, terminadoras, intrones, exones, regiones no transcritas UTR, entre otras del genoma de *Musa*.

Para la ubicación física de estos genes, se hibridaron en una biblioteca genómica sondas correspondientes a tres fragmentos de genes: a) Un fragmento de un gen de arroz que codifica para una proteína del fotosistema II (PSII) (GenBank D49234). Esta proteína pertenece a una familia de proteínas de bajo peso molecular conocida como PsbR del PSII de 10 kDa. PsbR-PSII tiene un dominio transmembranal para anclarse a la membrana del tilacoide y un dominio N-terminal cargado que forma puentes iónicos con proteínas extrínsecas. Por otra parte, puede actuar como proteína estabilizante a ambos lados de la membrana como donador y aceptor de electrones dependiendo del pH (11). b) Un fragmento de un gen de arroz que es inducido por elicitores liberados por patógenos, particularmente hongos; identificado como un "Elicitor-Responsive Gene" (ERG3, GenBank D24373). El estudio de este tipo de genes podría ser significativo para entender el mecanismo molecular de defensa a patógenos tan importantes como *Fusarium oxysporum*, agente causal del Mal de Panamá, o el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en *Musa*. Este tipo de genes ERG presentan un dominio conservado denominado C2, el cual es parte de una proteína de membrana dependiente de calcio, que interviene en la tra-

ducción de señales (12). c) La tercera sonda utilizada corresponde a un fragmento del gen de taumatina, una proteína de sabor dulce descrita por primera vez en *Thaumatococcus danielli* Benth (13) y que en banano es la proteína más abundante en el fruto maduro (14) (Genbank AF001528). La familia de los genes de la taumatina incluye miembros básicos con localización extracelular y vacuolar que están relacionados también con patogénesis. Varios miembros de esta familia muestran una significativa actividad inhibitoria del crecimiento de hifas o de la germinación de esporas de varios hongos, probablemente por un mecanismo de permeabilización celular (15).

En este trabajo se identificaron clones BIBAC contentivos de secuencias homólogas a las sondas marcadas radiactivamente, de los grupos genéticos descritos anteriormente. Las perspectivas futuras de este trabajo se centran en la caracterización de secuencias promotoras, terminadoras y secuencias UTR que permitan armar vectores para la transgénesis en *Musa*.

Materiales y Métodos

1. Aislamiento y Verificación de las Sondas

Las sondas heterólogas de PsbR-PSII y ERG3 se encuentran clonadas en el vector pBluescriptII SK+ con una longitud de 492 pb y 710 pb, respectivamente (Tabla 1) (16).

Las construcciones de PsbR-PSII y ERG3 fueron usadas para transformar por separado *E. coli*, DH5- α químicamente competentes (17). Se seleccionó una colonia transformada y luego se inoculó para hacerla crecer y extraer el DNA plasmídico, siguiendo el protocolo de extracción por lisis alcalina (18). El plásmido con el inserto clonado, se digirió con diferentes enzimas de restricción para comprobar la presencia de la sonda:

a) La sonda de PsbR-PSII, de 492 pb flanqueada por los sitios de corte *SalI* y *NotI*, tiene un corte interno con *SalI* a 287 nucleótidos, originando 2 bandas, una de 287 y otra de 205, por lo que se observan 2 bandas al digerir con *SalI* y *NotI* (Figura 1).

Tabla 1
Sondas utilizadas para la revisión de la biblioteca genómica BIBAC de *Musa acuminata* (AA)
cv. Tuu Gia

Nombre proteína	Longitud del Inserto	Vector	Sitio de clonaje	Número de entrada GenBank
PsbR 10 k	492 pb	pBluescriptII SK+	Sall (5') Not I(3')	D49234
ERG3	710 pb	pBluescriptII SK+	Sall (5') Not I(3')	AF090698
Taumatina	537 pb	Amplificada por PCR		AF001528

b) La sonda de ERG3, corresponde a un inserto 710 pb flanqueado por los sitios de corte *Sall* y *NotI* (Figura 1).

c) La sonda de taumatina se obtuvo por PCR específica, mediante el diseño de oligonucleótidos en regiones conservadas de la proteína (13) (Genbank AF001528).

Directo (3071) 5' ACA/GTG/TGG/GCC/GCG/GCC/GTG/CCT 3'

Reverso (3072) 5' GAA/GAA/CCG/GGA/GTA/GTC/GGT 3'

Se realizó una PCR con gradiente de temperatura, entre 55 y 65°C para identificar la temperatura de acoplamiento de los oligonucleótidos (Figura 2A). Luego, se comprobó la identidad de la banda amplificada mediante patrones de restricción, con *Sall* y *NotI* (Figura 2 B).

Posteriormente a las digestiones confirmatorias y para extraer el inserto del plásmido, se purificaron las bandas con GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), para usarlas como sondas y proceder al marcaje radioactivo.

2. Marcaje e Hibridación de sondas

La sonda se preparó a 0,5 ng/μL siguiendo las instrucciones del sistema "Rediprime II Random" (Amersham Biosciences), utilizando [α -³²P] dCTP (Amersham). Se añadió en un tubo de hibridación (Pyrex) 0,1 mL x cm² de solución de hibridación (solución de fosfato de sodio 0,25

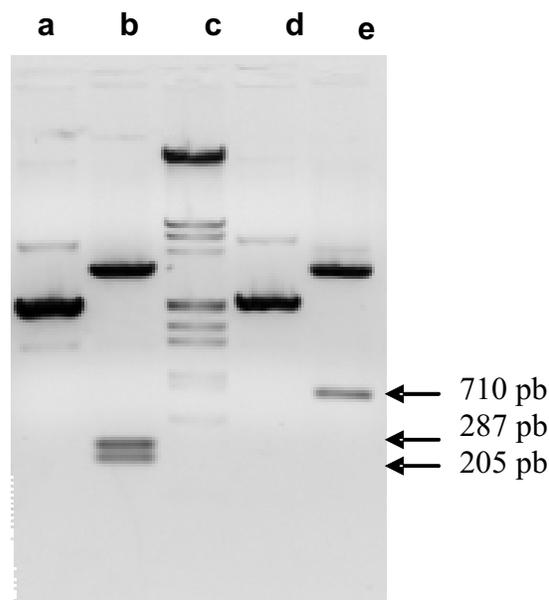


Figura 1. Digestión de los plásmidos pBluescriptII SK+. a) Control plásmido sin cortar del clon PsbR, b) Plásmido del clon PsbR digerido con *NotI* y *Sall*, presenta un sitio de corte interno con *Sall*, generando dos bandas, una de 287 pb y otra de 205 pb. c) Marcador de peso molecular: DNA fago Lambda digerido con *Hind III* y *EcoRI* d) Control plásmido sin cortar del clon ERG3, e) Plásmido del clon

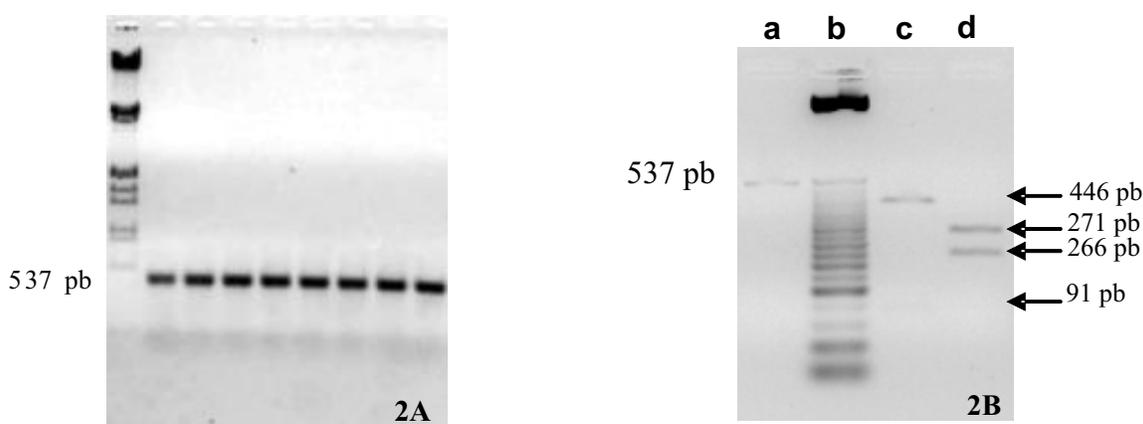


Figura 2. **2A)** Amplificación por PCR de taumatina, utilizando diferentes temperaturas de acoplamiento, mostrando un fragmento de 537 pb. Marcador de peso molecular, λ digerido con *Hind III* y *EcoRI*, **2B)** Patrones de restricción del fragmento obtenido por PCR, correspondiente a taumatina. a. Fragmento de taumatina 537 pb. b. Marcador de peso molecular, escalera de 25 pb. c. Digestión con *NotI* (bandas de 446 y 91 pb). d.

M pH 7.2; 7% SDS; 1% BSA, 2,5 mM EDTA pH 8) y se precalentó a 65°C, por 30 min. Luego se prehibridó la membrana a la temperatura de hibridación 65°C, por al menos 30 min.

Posterior a la prehibridación, se agregó la sonda marcada al buffer de hibridación. Se dejó hibridar a 65°C unas 14 horas. Para el lavado de las membranas se siguió un protocolo ya reportado (17); primer lavado en 2X SSC, 0,1% SDS a TA por 30 min, segundo lavado con 1X SSC, 0,1% SDS a 65°C por 25 min y un tercer lavado en 0,1X SSC, 0,1% SDS a 65°C por 25 min. La localización de las moléculas hibridadas fue determinada por autoradiografía.

3. Análisis Northern Blot

Se extrajo RNA total (19) de hoja, raíz, pulpa y cáscara de *Musa acuminata* (AAA) cv. Gran enano. Fue utilizado tejido de pulpa y cáscara del fruto correspondiente al estado de maduración 4 (PCI 4), de acuerdo a la escala de la maduración de frutos de banana indicado por el índice colorimétrico de la cáscara (PCI); la escala va desde el 1 (fruto muy verde) hasta 7 (fruto amarillo con manchas marrones) (Customer Services Department, Chiquita Brands, Inc., Cincinnati, OH).

Además el PCI puede relacionarse con otros parámetros bioquímicos y fisiológicos asociados con el estado de maduración, como la biosíntesis de etileno y la tasa respiratoria, mostrando picos en PCI 2 y PCI 4 respectivamente, en frutos tratados con etileno (20).

Para comprobar la calidad del RNA extraído, se evaluaron 12 mg RNA por electroforesis en gel desnaturizante con amortiguador MOPS (1x), 17,5% formaldehído y 1% agarosa. Las muestras fueron preparadas con 50% formamida y 17,5% formaldehído (17). Se transfirió el gel a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham Biotech.) mediante capilaridad, utilizando 10X SSC, durante toda la noche. Luego se fijó el RNA a la membrana en un horno de luz ultravioleta. La membrana fue hibridada por separado con las tres sondas marcadas con [α -³²P] dCTP (Amersham). La hibridación fue realizada durante 14 h a 65°C bajo las condiciones ya descritas (sección 2).

4. Biblioteca genómica de *Musa acuminata* (AA)

Se utilizó una biblioteca genómica de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia obtenida por Ortiz et

al., (21). Con cada sonda se realizó el escrutinio de tres membranas, conteniendo cada membrana 4.608 clones BIBAC, lo que corresponde a 13.824 clones revisados por sonda.

Resultados y Discusión

1. Aislamiento y Verificación de las Sondas

Las sondas de PsbR-PSII y ERG3 que fueron extraídas del plásmido pBluescriptII SK+ rindieron los fragmentos del tamaño esperado 492 pb (287 + 205) y 710 pb, respectivamente (Figura 1).

La sonda de taumatina que fue obtenida por amplificación de un fragmento de 537 pb (Figura 2A) confirmó su identidad de acuerdo a patrones de restricción (Figura 2B).

2. Análisis Northern-Blot

Para demostrar la expresión tejido específica de los tres genes evaluados, se realizó un análisis northern con las tres sondas por separado en los RNA totales extraídos de cáscara, pulpa del fruto, hojas y raíces de *Musa acuminata* (α) cv. Gran Enano.

La sonda PsbR-PSII hibridó sólo con los RNAs totales de hoja (Figura 3). Como es de esperarse, estos transcritos sólo se encuentran en tejido fotosintéticamente activos debido a que forma parte del centro activo del fotosistema II.

Con la sonda ERG3, no se detectó señal con ninguno de los RNAs totales de los diferentes tejidos analizados. Esto confirma que la expresión de este gen es inducida. Era de esperar no encontrar ningún transcrito de ERG3, pues este gen se activa o es inducido cuando el patógeno penetra al tejido vegetal. El patógeno libera componentes como oligosacáridos, proteínas o glicoproteínas que activan la expresión de genes de defensa en una cascada de señalización celular (22, 23).

Usando la sonda de taumatina se confirmó la presencia de abundantes transcritos de taumatina solo en cáscara y pulpa del fruto con un índice de maduración 4 (PCI 4) (Figura 3). Estos transcritos no fueron detectados en los otros tejidos anali-

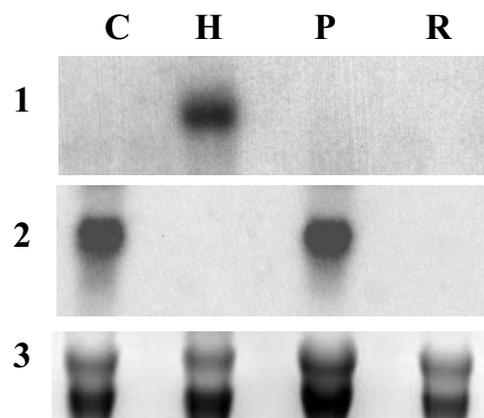


Figura 3. Análisis northern blot con RNA total de varios tejidos de *Musa acuminata* (AAA) cv. Gran Enano. **C** cáscara, **H** hoja, **P** pulpa, **R** raíz, con las sondas de 1) PsbR-PSII y 2) Taumatina. 3) rRNAs ribosomales en gel desna-

zados, como hoja y raíz. Cabe destacar que otro tipo de taumatinas TLP (Thaumatococcus-like proteins) su expresión no están confinadas a frutos, también han sido identificadas en tejidos vegetativos y en raíz, donde se incrementa su expresión por tratamiento con metil jasmonato (15).

3. Escrutinio de la biblioteca genómica

El ensayo de hibridación de un juego de tres membranas de la biblioteca de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia, con las tres sondas marcadas con [α - 32 P]dCTP, correspondió a 13.824 clones BIBAC y esto representó el análisis de 2,2 veces el genoma haploide del cv. Tuu Gia (Figura 4), considerando que el genoma haploide de *Musa acuminata* está estimado en unas 600 Mb.

De esta manera, del análisis de 13.824 clones BIBAC con cada sonda, se identificaron seis clones con la sonda de PsbR-PSII, un clon con la sonda de ERG3 y veinte clones positivos con la sonda de taumatina. El número de clones BIBAC revisados permite identificar por lo menos un clon BIBAC con cualquier gen buscado, si ese gen existe en el genoma estudiado con una secuencia con al menos 70% de homología a la son-

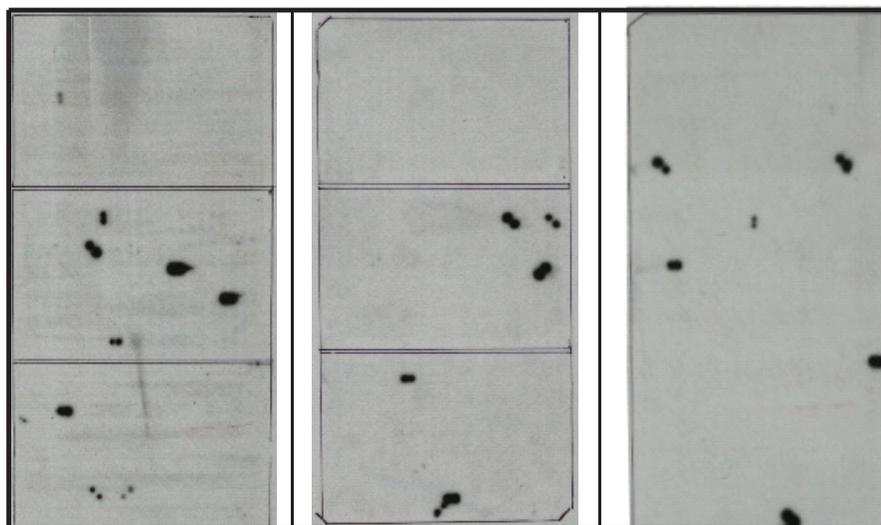


Figura 4. Revisión de la biblioteca genómica BIBAC de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia con la sonda taumatocina marcada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP. Temperatura de hibridación y lavados

da utilizada. En el escrutinio también se pudo haber pescado el mismo gen más de una vez (2,2 veces).

Los clones BIBAC identificados con la sonda PsbR-PSII, podrían corresponder a varias copias del mismo gen. El complejo del fotosistema II localizado en la membrana del tilacoide, dirige el proceso de oxidación de agua durante la fotosíntesis. El núcleo del PSII contiene 12-14 proteínas de bajo peso molecular (<10kDa) con λ -helices transmembranales, aunque a la fecha se han identificado unas 18 subunidades asociadas con el complejo PSII. La mayoría de ellas contienen una región transmembranal y una secuencia de aminoácidos conservada entre los organismos fotosintéticos (24).

La obtención de un solo clon BIBAC con la sonda ERG es de gran interés para el estudio de las interacciones planta-patógeno. En arroz se han aislado dos clones (OsERG1a, OsERG1b) que codifican para dos proteínas pequeñas de 156 y 159 aminoácidos, respectivamente, a partir de una biblioteca de expresión tratada con inductores fungales. Los niveles de los transcritos del gen OsERG1 aumentan considerablemente por elicitores fungales preparados a partir de *Magnaporthe grisea* o por iones de Ca^{2+} (12).

Además, se cree que estas dos proteínas se originan de un mismo gen y están implicadas en vías de señalización celular a través un dominio de unión a la membrana dependiente de Ca^{2+} , llamado C2. Esta proteína OsERG1 contiene un dominio C2 que interviene en el sistema de señalización de defensa de la planta (25)

El estudio del clon BIBAC identificado con la sonda ERG3, nos permitiría ensayar cómo las señales de un estrés (biótico o abiótico) activan la rápida expresión de una respuesta de defensa sostenida por el metabolismo primario. La infección de plantas por microorganismos patógenos y el subsiguiente establecimiento de enfermedades implican cambios sustanciales en los patrones bioquímicos y fisiológicos. El análisis de los genes que se expresan durante estas interacciones representa una poderosa estrategia para obtener una visión de los eventos moleculares que ocurren en estos cambios. Es importante destacar que *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia, además de ser resistente a *Mycosphaerella fijiensis*, también es resistente a algunas razas de *Fusarium spp*, hongo causante de el Mal de Panamá en banana (21); por lo que sería de gran interés en un futuro analizar en este clon BIBAC la expresión inducida por los hongos *Mycosphaerella fi-*

jiensis, *Fusarium oxysporum* u otros patógenos como nematodos.

El elevado número de clones BIBAC identificados con la sonda de taumatina se puede deber a que esta sonda corresponde a una región conservada que pertenece a una familia de multigenes. Muchas plantas expresan proteínas que son estructural y evolutivamente relacionadas a la taumatina pero no poseen propiedades de sabor dulce como la descrita originalmente y a su vez son inducidas por una variedad de fitopatógenos, a este tipo de proteínas se las denomina TLPs (Thaumatin-like proteins). Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) están divididas en varios grupos: La familia PR-5 incluye proteínas con cierto grado de homología en su secuencia de aminoácidos con taumatina, como osmotinas (26, 27) y permeatinas (28). Además existen varias formas protéicas de la taumatina (I, II, III, a, b, c) todas con una masa molecular aproximada a 22 KDa (29, 30).

Las TLPs se diferencian por deleciones cortas de secuencias de aminoácidos. Los análisis a nivel de secuencias han revelado una homología sustancial entre TLP y taumatina, por lo que los clones BIBAC obtenidos con la sonda de taumatina podrían corresponder a diferentes grupos de proteínas TLPs o taumatinas.

El análisis de los clones BIBAC identificados con las diferentes sondas utilizadas podría revelar miembros de familias de genes asociados con resistencia a estrés biótico o abiótico. Además, permitiría el estudio estructural y funcional de genes tejido-específicos, en subsiguientes investigaciones.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ Proyecto No. 289-04) y al Convenio de Cooperación Internacional FONACIT-CO-NACYT No PI-2004000372, por el cofinanciamiento otorgado para la realización de esta in-

vestigación. Al Lic. Luis Jorge Saucedo por su asistencia técnica.

Referencias Bibliográficas

1. HIEI Y., OHTA S., KOMARI T., KUMASHIRO T. *Plant J* 6(2): 271-82, 1994.
2. VUYLSTEKE A., HARTMAN B., TENKOVANO E. *Infomusa* La Revista Internacional sobre banano y plátano 8(1):1-15, 1999.
3. HAMILTON C.M., FRARY A., LEWIS C., TANKSLEY S.D. *Pro Natl Acad Sci USA* 93: 9975-9979, 1996.
4. HULBERT S., WEBB C.A., SMITH S.M., SUN Q. *Annu Rev Phytopathol* 39: 285-312, 2001.
5. ARIAS O. Commercial micropropagation of banana, *INIBAP* Publication, Montpellier Cedex 5, France, p. 139-142, 1993.
6. SWENNEN R., ROSALES F.E. BANANAS In: *Encyclopedia of Agricultural Sciences*, Vol. I, ARNTZEN C.J. (Ed.) Academic Press, Inc. New Cork, p. 215-232, 1994.
7. MAY G., AFZA R., MASON H., WIECKO A., NOVAK F., ARNTZEN C. *BIO/TECHNOL* 13:486-492. 1995.
8. SAGI L., PANIS B., REMY S., SCHOOF H., DE SMET K., SWENNEN R., CAMMUE B. *Bio/Technol* 13:481-485, 1995.
9. BECKER D.K., DUGDALE B., SMITH M.K., HARDING R.M., DALE J.L. *Plant Cell Rep* 19:229-234, 2000.
10. CHAKRABARTI A., GANAPATHI T.R., MUKHERJEE P.K., BAPAT V.A. *PLANTA* 216: 587-596, 2003.
11. STOCKHAUS J., HOFER M., RENGER G., WESTHOFF P., WYDRZYNSKI T., WILLMITZER L. *EMBO J* 9(9):3013-21, 1990.
12. KIM C.Y., KOO Y.D., JIN J.B., MOON B.C., KANG C.H., KIM S.T., PARK B.O., LEE S.Y., KIM M.L., HWANG I., KANG K.Y., BAHK

- J.D., LEE S.Y., CHO M.J. **Biochemistry** 14(42):11625-1633, 2003.
13. MOST B.M., SUMMERFIELD R.J., BOXALL M. **Econ Bot** 32: 321-355, 1978.
 14. CLENDENNEN S.K., MAY G.D. **Plant Physiol** 115(2):463-469, 1997.
 15. BARRE A., PEUMANS W.J., BOUAOUICHE L.M., ELS J.M., VAN DAMME, MAY G.D., FERNANDEZ HERRERA A., VAN LEUVEN F., ROUGÉ P. **Planta** 211(6) 791-799, 2000.
 16. SASAKI T., MATSUMOTO T., YAMAMOTO K., SAKATA K., BABA T., KATAYOSE Y., WU J., NIIMURA Y., CHENG Z., NAGAMURA Y., ANTONIO B.A., KANAMORI H., HOSOKAWA S., MASUKAWA M., ARIKAWA K., CHIDEN Y., HAYASHI M., OKAMOTO M., ANDO T., AOKI H., ARITA K., HAMADA M., HARADA C., HIJISHITA S., HONDA M., ICHIKAWA Y., IDONUMA A., IJIMA M., IKEDA M., IKENO M., ITO S., ITO T., ITO Y., ITO Y., IWABUCHI A., KAMIYA K., KARASAWA W., KAATAGIRI S., KIKUTA A., KOBAYASHI N., KONO I., MACHITA K., MAEHARA T., MIZUNO H., MIZUBAYASHI T., MUKAI Y., NAGASAKI H., NAKASHIMA M., NAKAMA Y., NAKAMICHI Y., NAKAMURA M., NAMIKI N., NEGISHI M., OHTA I., ONO N., SAJI S., SAKAI K., SHIBATA M., SHIMOKAWA T., SHOMURA A., SONG J., TAKAZAKI Y., TERASAWA K., TSUJI K., WAKI K., YAMAGATA H., YAMANE H., YOSHIKI S., YOSHIHARA R., YUKAWA K., ZHANG H., IWAMA H., ENDO T., ITO H., NAHN J.H., KIM H.I., EUN M.Y., YANO M., JIANG J. & GOJOBORI, T. **Nature** 420: 312-316, 2002.
 17. SAMBROOCK J., RUSSELL D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition. Cold Springs Harbor Press, Cold Springs Harbor, New York, USA. 2001.
 18. BIRBOIM H.C. AND DOLY J. **Nucleic Acids Res** 6:1513-1523, 1979.
 19. CHANG, PURYEAR, CAIRNEY. **Plant Mol Biol Rep** 11(2): 113-116, 1993.
 20. AGRAVANTE J.U., MATSUI T., KITAGAWA H. **J Jpn Soc Food Sci** 38: 527-532, 1991.
 21. ORTIZ-VÁZQUEZ E.D., KAEMMER H-B. ZHANG J. MUTH M. RODRÍGUEZ-MENDIOLA C. ARIAS-CASTRO ANDREW JAMES. **Theor Appl Genet** 110:706-13, 2005.
 22. DIXON R.A., LAMB C.J. **Annu Rev Plant Phys** 41:339-367, 1990.
 23. RYAN C.A., FARMER E.E. **Annu Rev Plant Phys** 42: 651-674, 1991.
 24. SHI L.X., SCHRODER W.P. **Biochem Bioph Act** 1608(2-3):75-96, 2004.
 25. SINGH N.K., BRACKER C.A., HASEGAWA P.M., HANDA A.K., BUCKEL S., HERMODSON M.A., PFANKOCH E., REGNIER F.E., BRESSAN R. A. **Plant Physiol** 85, 529-536, 1987.
 26. SINGH N.K., NELSON D.E., KUHN D., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. **Plant Physiol** 90, 1096-1101, 1989.
 27. VIGERS A., WIEDERMANN S., ROBERTS W., LEGRAND M., SELITRENNIKOFF C., FRITIG B. **Plant Sci** 83:155-161, 1992.
 28. MACKENZIE A., PRIDHAM J.B., SAUNDERS N.A. **Phytochemistry** 24(11) 2503-2506, 1985.
 29. VAN DER WEL H., LOEVE K. **Eur J Biochem** 31: 221-225, 1972.
 30. LEDEVOER A. M., VERRIPS C.T., DEKKER B.M. **Gene** 30: 23-32, 1984.