

Comparación de dos kits de RT-PCR en la detección de ARNm de dos genes endógenos de papa (*Solanum tuberosum* spp. *Andígena*)

Comparison of two kits of RT-PCR in RNAm Detection of two endogenous genes of potato (*Solanum tuberosum* spp. *Andígena*)

Milet Zabaleta Vanegas¹, Mary Luz Yaya-Lancheros², Alejandro Chaparro-Giraldo³

Resumen

RT-PCR es una técnica en la que usando ARN mensajero como molde, se obtiene complementario o cADN por transcripción inversa, y luego se amplifica uno de los cADN por PCR, mediante el uso de primers específicos. Esta técnica permite realizar estudios de expresión, a nivel de ARN mensajero. Con el propósito de implementar la técnica en papa (*Solanum tuberosum* spp. *Andígena*), se utilizaron plántulas cultivadas *in vitro* de la variedad Pastusa Suprema. Inicialmente se establecieron las condiciones para la extracción de ARN total usando el kit TRizol® Reagent de Invitrogen™, con el que se obtuvieron excelentes resultados. Este ARN se usó como molde para evaluar dos kits: “ONE Step superScript™” y “SuperScript™ First Strand Syntesis For RT-PCR SS™ II RT”, de Invitrogen™. Se usaron primers específicos para dos genes endógenos: *cox* y *actina*. El primero es un gen mitocondrial y el segundo es un gen nuclear. Se observaron señales claras y diferenciables de amplificación para *cox*, utilizando el kit “ONE Step superScript™”, con un tamaño esperado de 96 pb. Para *actina*, se observó una señal clara de amplificación de 300 pb, con el kit “SuperScript™ First Strand Syntesis For RT-PCR SS™ II RT”.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, *cox*, *actina*, RT-PCR, papa.

Abstract

RT-PCR is a technique which using a RNAm like template is obtained a cDNA (complementary DNA) for reverse transcription, then is amplified one of them by PCR using specifics primers. This technique allows make expression studies to mRNA level. In order to implement this technique in potato (*Solanum tuberosum* spp. *Andígena*), was used *in vitro* grow plants Pastusa Suprema variety. Initially was established the total RNA extraction conditions using the Invitrogen™ TRizol® Reagent kit., with this the results were successful. Extracted RNA was used as a template to probe two Invitrogen™ kits: “ONE Step superScript™” and “SuperScript™ First Strand Syntesis For RT-PCR SS™ II RT”. The specifics primers were designed for endogenous genes: *cox*

1 Biólogo, Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

2 Bióloga, M.Sc., Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

3 Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D., Profesor Asociado, Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. achaparro@unal.edu.co

and *actin*. The first one is a mitochondrial gene and the second one is a nuclear gene. Defined amplification signals for *cox*, using “ONE Step superScript™” kit, with a expected 96 bp size. In *actin*, a clear amplification signal was observed (size 300 bp) with the “SuperScript™ First Strand Syntesis For RT-PCR SS™ II RT” kit.

Key words: *Solanum tuberosum*, *cox*, *actin*, RT-PCR, potato.

Recibido: noviembre 5 de 2007

Aprobado: noviembre 24 de 2008

Introducción

La papa es considerado el cuarto cultivo de importancia en el mundo, con producción anual de 300 millones de toneladas (Banerjee et ál., 2006). Es el primer cultivo en producción de proteínas y energía por unidad de tiempo y superficie (Estrada, 2000). El desarrollo de las técnicas de ingeniería genética ha permitido transferir genes foráneos al genoma de especies vegetales, produciendo plantas transgénicas. Estos protocolos se han desarrollado por modificaciones al propuesto por Horsch en 1985 para transformar discos foliares de tabaco *Nicotina tabacum* (Ariel et ál., 2003).

El seguimiento de las plantas transgénicas requiere de técnicas que permitan el análisis molecular para comprobar la integración y expresión del gen foráneo en el genoma de la planta. Para ello es necesario un exhaustivo estudio, mediante técnicas moleculares tales como Northern Blot, Southern Blot, Western Blot (Ariel et ál., 2003; Berendzen et ál., 2005; Toplak et ál., 2004). Alternativas, más económicas y menos complejas están basadas en la reacción en cadena de la polimerasa. La PCR es una técnica enzimática altamente sensible que se fundamenta en la amplificación *in vitro* de segmentos de ADN determinados, usando secuencias específicas o primers. Una de las modificaciones de esta técnica es el uso de la transcriptasa reversa, que es una enzima capaz de sintetizar cADN partiendo de un molde de ARN (Sharman et ál., 2002), seguida de una PCR sencilla. De esta manera es posible evidenciar la presencia de un ARN mensajero específico en la mezcla de ARN. Se implementó

la técnica de RT-PCR sobre material no transformado de papa, para lo cual se utilizaron los genes endógenos *cox* y *actina*. Estos genes son de expresión constitutiva, puesto que son transcripcional y traducionalmente activos en todas las células vegetales, independientemente del tejido, órgano, edad u otra condición de la planta. El gen *actina* codifica para una proteína altamente conservada en eucariotas, que juega un papel crucial en el mantenimiento del citoesqueleto (Zhang et ál., 2005), y tiene un rol importante en la célula vegetal, que involucra la morfogénesis, mitogénesis y otros procesos celulares (Yu et ál., 1998). El gen *cox* es de origen mitocondrial (He et ál., 2006), cataliza la transferencia de electrones de la unidad citocromo c oxidasa a las molécula de oxígeno (Quiñones et ál., 1995), y es clave en el proceso de respiración celular. La naturaleza de los genes constitutivos *actina* y *cox*, permite hacer estandarizaciones de técnicas moleculares PCR y RT-PCR, ya que se va a encontrar por lo menos una copia del gen *actina* por genoma en cada célula vegetal, y mínimo una copia del gen *cox* por genoma mitocondrial, es decir, varias copias en una célula, a partir de una extracción de ADN total de tejido foliar. Una vez estandarizados los métodos para la detección de los genes *actina* y *cox*, estos se usan como controles internos o endógenos para dichas técnicas a fin de garantizar que la detección en las plantas transgénicas de un gen foráneo particular y de interés, corresponde en efecto a la verificación del evento de transformación y no a un artefacto de las reacciones moleculares, producto de la calidad y cantidad del ADN extraído (López, 2006). La importancia de la presencia de controles internos o

endógenos en los procesos de caracterización molecular de plantas transgénicas es importante, sobre todo cuando la transformación genética se ha logrado mediante *Agrobacterium tumefaciens*, caso en el que se ha reportado inserción de 1 a 5 copias de los genes de interés en los genomas transformados (Gelvin, 2003).

Materiales y métodos

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Material vegetal

El material que se utilizó para estos ensayos fueron plántulas de *S. tuberosum* L. ssp. *andigena* variedad Pastusa Suprema. Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones de temperatura de 18 °C +/- 3, fotoperíodo 16 horas luz/8 horas oscuridad, y humedad relativa del 60% en un cuarto de crecimiento controlado (Jiménez, 2005). Este material fue micropropagado en un medio básico compuesto de sales de Murashige y Skoog (1962), y suplementado con 0,4 mg/l Tiamina, 2 mg/l ácido D-pantoténico, 0,2 mg/l ácido giberélico, 20 g/l sacarosa, 2,5 mg/l fita-gel a pH 5,7, realizando cambio de medio cada cuatro semanas (López, 2006).

Extracción de ARN vegetal

La extracción de ARN se realizó con el kit TRizol® Reagent de Invitrogen™, siguiendo las recomendaciones del fabricante y tomando 100 mg de tejido por muestra, usando plántulas completas de 4 semanas de cultivo. El análisis de la calidad de extracción del ARN se hizo en geles de agarosa 1%. Los buffers y reactivos fueron preparados con agua tratada con DEPC al 0,01%. Como buffer de carga se usó "Blue Juice", y como buffer de corrido TBE 1X. La electroforesis se realizó a 90 voltios por 45 minutos. Se documentó el patrón electroforético logrado, en una unidad fotográfica Uvisave.

RT-PCR

Kit "ONE Step superScript™": este kit es de un solo paso, porque se agregan todos los reactivos para la obtención de cADN a partir de ARN y la subsiguiente PCR. Está compuesto por SuperScript™ III RT/ Platinum® taq Mix, mezcla de reacción 2X, que contiene dNTP con una concentración de 0,4 mM de cada uno, MgSO₄ 3,2 mM, MgSO₄ 5 mM. La mezcla para la reacción fue: 25 µL de la mezcla de reacción 2X, 0,5 µL de los primers forward (F) y reverse (R), 1 µL de RT/Platinum Taq, 18 µL de agua DEPC 0,01%, 5 µL de ARN muestra, para un volumen final de 50µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador ICYCLER (BIO-RAD) usando la siguiente programación: 1 ciclo (72 °C por 15 segundos), 40 ciclos (94 °C por 30 segundos; 55 °C por 30 segundos; 72 °C por 30 segundos), 1 ciclo (72 °C por 5 min), 1 ciclo (10 °C tiempo indeterminado).

Kit "SuperScript™ First Strand Synthesis for RT-PCR SS™ II RT": con este kit de dos pasos se ejecuta primero la síntesis de cADN a partir del ARN y luego se realiza la PCR. El kit está compuesto por los siguientes elementos: Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 0,5 µg/µL, hexámeros al azar 50 ng/µL, MgCl₂ de 25 mM, DTT de 0,1 M, mezcla de dNTP 10mM de cada uno, SuperScript II RT 50 unidades/µL, agua tratada con DEPC, RNase H de *E. coli* 2 unidades/µL, buffer RT 10X (Tris HCl) 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM, RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor 40 unidades/µL, ARN control 50 ng/µL, Primer A control 10 µM, Primer B control 10 µL.

Se prepara la mezcla ARN/primers en microtubos estériles de 0,5 mL. Esta mezcla contiene: 1 µL de la mezcla de dNTP, 1 µL de los Oligo dt, 3 µL del agua DEPC 0,01%, y 5 µL de ARN de la muestra. Otros dos tubos fueron preparados de la misma manera, sin el ARN problema, pero con presencia y sin presencia de ARN control, para tener el control positivo y el control negativo del ensayo. Se utilizaron los oligo dt, puesto que la transcripción reversa va a usar ARNm como molde. Cada muestra se

incuba a 65 °C por 5 min y luego se deja sobre hielo.

Para la segunda mezcla se procedió así: 2 µL de buffer RT, 4 µL de MgCl₂, 2 µL de DTT 0,1, 1 µL de RNaseOUT™. Se adicionan a la mezcla de reacción ARN/primers. A continuación, los microtubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 1 min, y se incubaron a 25 °C por 2 min. Se adiciona 1 µL de la SuperScript II RT a todos los microtubos, y se incuban a 25 °C por 10 min. Luego, se incuban a 42 °C por 50 min, y se incuban de nuevo a 70 °C por 15 min para tener como producto los cADN. Se colecta el producto de la reacción por una centrifugación breve, se adiciona 1 µL de RNasa H a cada microtubo, y se incuban por 20 minutos a 37 °C.

Se realizó una PCR sobre los cADN obtenidos. A partir de los componentes del kit “Taq ADN Polymerase Recombinant” de Invitrogen™, se construyó la siguiente mezcla de reacción: 2,5 µL de buffer - Mg 10x, 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de taq ADN polimerasa 5 unidades/µL, 0,25 µL de primer forward (F) y 0,25 µL de primer reverse (R), 12,3 µL de agua destilada esteril, 5 µL de cADN para un volumen final de 25 µL. La programación en el termociclador fue: 1 ciclo (95 °C por 4 min) , 35 ciclos (95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos), 1 ciclo (72 °C por 5 min) y un ciclo final de 20 °C por 5 min. Por exposición del gel a radiación UV fueron observadas las bandas de los productos de PCR, que fueron fotografiadas con una unidad Uvisave.

En los ensayos de los kit se amplificaron los genes *cox* y *actina*. Para el *cox* se usaron los primers forward (F: 5`CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3`) y reverse (R: 5`CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG 3`) que amplifican un producto de 96 pb (Séller et ál., 2000). Estos primers fueron sintetizados por Invitrogen. Para el gene *actina* se usaron los primers Actina 1:forward (F:5` GAT GGC AGA AGG CGA AGA TA-3`) y reverse (R:5-GAG CTG GTC TTT GAA GTC TCG-3) (Mei-

yalaghan, 2005), y los primers Actina 2:forward (F:5- ATC GTC AGG GAT GTG AAA GA-3) y reverse (R:5-ATA CCG GGG AAC ATG GTA GT-3), sintetizados por Corpogen. Los primers actina 2 fueron diseñados por los autores del presente trabajo. El gen *actina* es nuclear, en tanto que el gen *cox* es mitocondrial, ambos son considerados constitutivos.

Los resultados de la amplificación específica por PCR, fueron analizados en geles de agarosa 1% con bromuro de etidio 0,01 mg/µL, usando como buffer de carga “Blue Juice”, y como buffer de corrido TBE 1X, en condiciones de 90 voltios por 45 min. Se observaron las bandas de ADN correspondientes por exposición del gel a radiación UV. La señal de los amplicones fue fotografiada con un documentador de geles Uvisave. Los análisis semicuantitativo de estos resultados son basados en la intensidad de la banda amplificada (Nebenführ y Lomax, 1998).

Resultados y discusión

Una extracción de ARN de alta calidad es esencial para el buen desarrollo de la RT-PCR (Tattersall et ál., 2005). Los productos de la extracción con TRizol® Reagent de Invitrogen™ fueron analizados en un gel de agarosa al 1%, en las condiciones reportadas atrás. Al observar los resultados la estimación se hace por la intensidad de la banda presente en el gel (Sharma et ál., 1988). La extracción de ARN es complicada cuando se utiliza tejido vegetal por ser estos ricos en polifenoles y polisacáridos (Almarza et ál., 2006). En este caso (figura 1) se logró una buena extracción de ARN total usando el protocolo de TRizol® Reagent siguiendo las condiciones de uso del fabricante Invitrogen™, indicando que es un excelente procedimiento para la extracción de ARN en papa.

RT-PCR es una técnica de alto grado de precisión y sensibilidad para identificación y análisis de expresión de genes constitutivos y genes foráneos transferidos al genoma vegetal (Sharman et ál., 2002). En este trabajo se es-

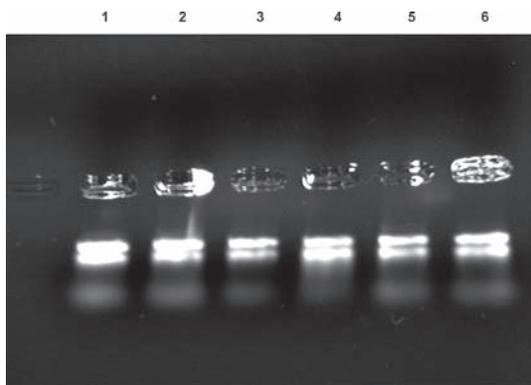


Figura 1. Gel de agarosa al 1% corrido por 45 min a 90 V, donde se observa el ARN (pozos 1 a 6), extracción realizada con TRizol® Reagent de Invitrogen™.

tudió el uso de dos kits de Invitrogen™ en la detección de ARN mensajero de los genes endógenos *cox* y *actina*. Para el gen *cox* se espera la amplificación de un segmento de 96 pb (Séller et ál., 2000), mientras para el gen *actina* se espera la amplificación de un fragmento de 1096 pb usando los primers Actina1. (Meiyalaghan, 2005). Se diseñó otro set de primers, denominados Actina 2, con los que se espera una amplificación de un fragmento de 300 pb.

Son varios los factores que afectan la eficiencia de la RT-PCR: eficiencia de la transcripción reversa, integridad del ARN, diseño de los primers y longitud del fragmento amplificado (Sharma et ál., 1998). Como se observa en las figuras 2 y 3, fue posible amplificar la secuencia *cox* usando tanto el kit de un paso como el kit de dos pasos y con los protocolos propuestos inicialmente. Se ha reportado el uso del gen *cox* como control interno: en detección de virus en papa (He et ál., 2006), en RT-PCR semicuantitativas y para el análisis de expresión de genes en plantas (He et ál., 2006; Khun y Binder, 2002; Lopez et ál., 2006; Welcher et ál., 2002; Raczynska et ál., 2006). Para valorar el tamaño de amplificación se utilizó un marcador de peso molecular que permite estimar el tamaño de la banda amplificada (Sharman et ál., 2002), en este caso un marcador de 100 pb de Invitrogen™, demostrando que el amplificado

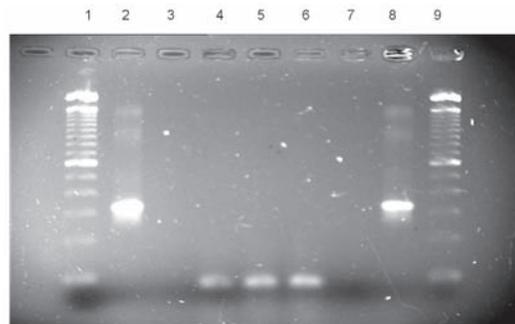


Figura 2. RT-PCR un paso. Gel de agarosa al 2% corrido por 45 min; pozos 1 y 9, marcadores de peso molecular (100 bp DNA Ladder de Invitrogen); pozos 2 y 8, control interno del kit de RT-PCR de un paso; pozos 3 y 7, control absoluto agua estéril; pozos 4, 5 y 6, amplificación de Cox.

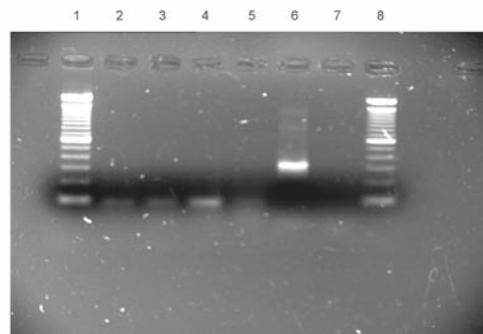


Figura 3. RT-PCR dos pasos. Gel de agarosa al 2% corrido por 45 min; pozos 1 y 8, marcadores de peso molecular (100 bp DNA Ladder de Invitrogen); pozos 2, 3 y 4, amplificación de Cox, control interno del kit de RT-PCR de dos pasos; pozos 5 y 7, control absoluto agua estéril; pozo 6, control interno del kit.

obtenido corresponde al tamaño predicho de 96 pb.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el par de primers denominado actina 1, con los cuales no se logró amplificar el fragmento del gen actina a partir de cADN, se decidió hacer un alineamiento de dichos primers con la secuencia del gen, usando el programa Clustal W, y teniendo como referencia una secuencia reportada en la base de datos de acceso público GenBank (Accesión X55749). En la secuencia se describe la presencia de 4 exones,

y de acuerdo con el alineamiento, el primer forward se une a la posición 270 de la secuencia dentro del primer exon, región que resulta estar muy próxima al extremo 5' del ARN mensajero para el gen. Por lo anterior, y debido a que el primer forward podría encontrar su sitio de unión al ADN tanto en ADN genómico como en ADN complementario al estar ubicado en un exon, se piensa que la proximidad al extremo 5' es el factor que puede incidir en la no amplificación del fragmento del gen, puesto que al degradarse el ARN mensajero por este extremo, la retrotranscripción daría lugar a un cADN incompleto donde el primer forward no va a encontrar su sitio blanco para la amplificación (Sharma et ál., 1998).

Una vez reconocido el posible problema, se diseñó un nuevo set de primers denominado Actina 2, que tuvieran como sitio de unión regiones dentro de un mismo exón, y que estuvieran más cerca del extremo 3' del gen. De acuerdo con lo anterior, se seleccionó el exon 3 ubicado aproximadamente a unos 1000 nucleótidos del inicio de la secuencia codificante del gen, y que permite obtener un fragmento de 286 pares de bases en la amplificación a partir de ADN tanto genómico como complementario. Este cambio metodológico fue efectivo, en tanto que se obtuvo la amplificación del fragmento del gen *actina* tras la retrotranscripción del ARN extraído y con el kit de dos pasos (figura 4).

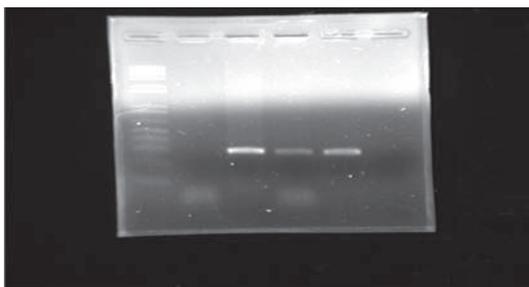


Figura 4. (RT-PCR de dos pasos) Gel de agarosa al 2% corrido por 45 min, pozo 1 marcador molecular (1 kb Plus ADN Ladder de Invitrogen); pozo 2, control absoluto agua estéril; pozo 3, control de la PCR con DNA genómico; pozos 4 y 5, actina 2 amplificada de cADN.

Con el kit de un paso no se obtuvo ninguna amplificación para el caso del gen *actina*. Este resultado negativo pudo deberse a las inespecificidades de los primers que inhiben competitivamente la formación del producto (Abd-Elsalam, 2003). En este caso no se obtuvo banda alguna, los resultados obtenidos son fundamentales para el desarrollo de nuevos procesos para la selección de materiales transformados.

De otra parte, se obtuvo amplificación con el gen *cox*, tanto para el kit de un paso (figura 2), como para el kit de dos pasos (figura 3). Este resultado se explica porque el gen está localizado en el genoma de la mitocondria, por lo que se obtienen varias copias de este gen por célula, lo que asegura un molde suficiente para la RT-PCR.

Conclusiones

Como resultado de este trabajo se logró la detección de ARNm de dos genes endógenos (*cox* y *actina*) en condiciones diferentes. Se probaron dos kits para RT-PCR de Invitrogen™, obteniéndose resultados positivos para ambos. Sin embargo, los mejores resultados fueron logrados con el kit de un solo paso, probablemente por la disminución de los riesgos de contaminación como producto de menor manipulación de las muestras.

Agradecimientos

Al grupo de Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia (IGP-UN), a la Dirección de Investigación de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación. M. Zabaleta agradece a la Universidad de Sucre y al profesor Santiago Ruiz Pérez por la formación académica obtenida.

Referencias bibliográficas

Abd-Elsalam, K. A. 2003. Bioinformatic Tools And Guideline For PCR Primers Design. African Journal Of Biotechnology 2 (5), 91-95.

- Ariel, D.; Lascano, J. 2003. Producción e identificación de cultivos transgénicos. Cátedra de Biología, Universidad Nacional de Santiago del Estero. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Disponible en <http://faa.unse.edu.ar/alumnos/document/biologia/idtransg.pdf>
- Almarza, J.; Morales, S.; Rincón, L.; Brito, F. 2006. Urea as the only inactivator of RNase for extraction of total RNA from plant and animal tissues. *Analytical Biochemistry* 358, 143-145.
- Banerjee, K.; Prat, S.; Hannapel, D. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated. *Plant Science* 170, 732-738.
- Berendzen, K.; Searle, I.; Ravenscroft, D.; Koncz, C.; Batschauer, A.; Coupland, G.; Somssich, E.; Ülker, B. 2005. A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg *erecta*. *Plant Methods* 2005; 1: 4 doi: 10.1186/1746-4811-1
- Estrada, N. (2000). La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. CIP, IPGRIL, IBTA, PRIONPA, COSUDE, CID. La Paz, Bolivia. pp. 127-136.
- Gelvin, S. 2003. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (1), 16-37.
- He, C.; Molena, A.; Xiong, X.; Boit, G.; Nie, X. 2006. Cytochrome c oxidase mRNA as an internal control for detection of Potato virus Y and Potato leafroll virus from single aphids by a co-amplification RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 138, 152-159.
- Kuhn J.; Binder S. 2002. Analysis of 5' to 3' -end-ligated mRNAs identifies the extremities of Cox 2 transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Research* 30, 439-446.
- López, A. 2006. Transformación genética mediada por *Agrobacterium Tumefaciens* y recuperación de plantas transgénicas de papa (*Solanum Tuberosum* Sp *Andigena* Var. Pastusa Suprema). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias, Microbiología, Bogotá.
- Lopez, L.; Picardi, E.; Quagliariello, C. 2006. RNA editing has been lost in the mitochondrial *cox3* and *rps13* mRNAs in Asparagales. *Biochimie* 89 (2007), 159-162.
- Meiyalaghan, S.; Davison, M.; Takla, G. F.; Wratten, S.; Conner, A. J. 2005. Effectiveness Of Four Cry Genes In Transgenic Potato For Conferring Resistance To Potato Tuber Moth. *Plant Molecular Biology Report* 3, 1-3.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 (3), 473-497.
- Nebenführ, A.; Lomax, T. (1998). Multiplex Titration RT-PCR: Rapid Determination Of Gene Expression Patterns For A Large Number Of Genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 16, 323-339.
- Quiñones, V.; Zanlungo, S.; Holuigue, L.; Litvak, S.; Jordana, X. 1995. The Cox1 Initiation Codon is by RNA Editing in Potato Mitochondria. *Plant Physiol* 108, 1327-1328.
- Sharma, V.; Xu, M.; Vail, J.; Campbel, R. 1998. Comparative analysis of multiple techniques for semi-quantitation of RT-PCR amplicons. *Biotechnology Techniques* 12, 521-524.
- Sharman, R.; Singh, M.; Sharma, A. 2002. Polymerase Chain Reaction: An Emerging tool for Research in Pharmacology. *Indian Journal of Pharmacology* 34, 229-239.
- Toplak, N.; Okršlar, V.; Stani, Racman, D.; Gruden, K.; Zel, J. 2004. A High-Throughput Method for Quantifying Transgene Expression In Transformed Plants With Real-Time PCR Analysis. *Plant Molecular Biology* 22, 237-250.
- Yu, L.; Xi, N.; June, V.; Parthasarathy, M. V. 1998. Molecular cloning and mRNA localization of tomato pollen profiling. *Plant Molecular Biology* 36, 699-707.
- Zhang, W. M.; Zhang, Y.; Zhang, L. H.; Wang, S. G.; Zhu, T. Y.; Lin, D.; Ma, G. Z. 2005. Nucleotide sequence and mRNA expression analysis of *b*-actin gene in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* Fish. *Physiology and Biochemistry* 31, 373-383