

**Selection of Arabidopsis transformants containing AtZAT12****Cham T. T. Le\*, & Ngoc T. Pham**

Faculty of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture, Ha Noi, Vietnam

**ARTICLE INFO****Research Paper**

Received: February 19, 2023

Revised: July 11, 2023

Accepted: July 13, 2023

**Keywords**

AtZAT12 gene  
Hygromycin B  
Long hypocotyls  
pMDC107  
Transformed *Arabidopsis*

**Corresponding author**

Le Thi Tuyet Cham  
Email: lttcham@vnua.edu.vn

**ABSTRACT**

This study aimed to select *Arabidopsis* seeds after transformation with the AtZAT12 gene via *Agrobacterium tumerfaciens*. ZAT12 is a transcription factor that inhibits other transcription factors FIT through the EAR motif. FIT itself is a central transcription factor that controls Fe uptake under Fe-deficient conditions. However, if Fe is absorbed excessively, it will produce reactive oxygen species that could damage cells. That is the reason why AtZAT12 transcription is elevated and FIT transcription is inhibited under Fe deficiency for 10 days. To investigate the function, the AtZAT12 gene was inserted into the pMDC107 vector for transformation into *Arabidopsis*. The T0 *Arabidopsis* seeds obtained after floral dip transformation were placed on 1% MS agar supplemented with 15 µg/mL Hygromycin B. Beforehand, the T0 seeds were sterilized and kept in the dark for stratification. Subsequently, the seed plates were subjected to a regime of 6 h of light, 48 h of dark and 24 h of light (3.25 d). The hygromycin B-resistant seedlings had long hypocotyls (~ 1.0 cm), while the non-resistant seedlings had short (~ 0.3 cm) hypocotyls. This method took only 3.25 days to identify transgenic *Arabidopsis* seedlings. After that, positive transgene lines were examined by PCR method for AtZAT12, and the expression of AtZAT12 was observed under microscope.

**Cited as:** Le, C. T. T., & Pham, N. T. (2023). Selection of Arabidopsis transformants containing AtZAT12. *The Journal of Agriculture and Development* 22(4), 32-39.

**Chọn lọc sau biến nạp gen *AtZAT12* trên cây *Arabidopsis***

Lê Thị Tuyết Châm &amp; Phạm Thị Ngọc

Khoa Nông Học, Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam, Hà Nội

**THÔNG TIN BÀI BÁO****Bài báo khoa học**

Ngày nhận: 19/02/2023

Ngày chỉnh sửa: 11/07/2023

Ngày chấp nhận: 13/07/2023

**Từ khóa***Arabidopsis* chuyển genGen *AtZAT12*

Hygromycin B

pMDC107

Trụ dưới lá mầm dài

**Tác giả liên hệ**

Lê Thị Tuyết Châm

Email: lttcham@vnua.edu.vn

**TÓM TẮT**

Nghiên cứu này nhằm chọn lọc các hạt *Arabidopsis* sau chuyển gen *AtZAT12* gián tiếp qua *Agrobacterium tumerfaciens*. *ZAT12* là một yếu tố phiên mã có chức năng ức chế yếu tố phiên mã khác là FIT thông qua motif EAR. Bản thân FIT cũng là một yếu tố phiên mã trung tâm điều khiển quá trình hấp thụ Fe trong điều kiện môi trường thiếu Fe. Tuy nhiên, khi Fe được hấp thụ quá nhiều sẽ sản sinh các gốc tự do gây tổn hại tế bào. Có lẽ đó là lý do phiên mã *AtZAT12* được tăng cao còn phiên mã của FIT bị ức chế trong điều kiện thiếu Fe kéo dài 10 ngày. Để nghiên cứu chức năng, gen *AtZAT12* đã được gắn vào vector pMDC107 để chuyển vào cây *Arabidopsis*. Hạt *Arabidopsis* T0 thu được sau quá trình biến nạp bằng phương pháp nhúng hoa được đặt trên môi trường thạch MS 1% Agar bổ sung Hygromycin B 15 µg/mL. Cây *Arabidopsis* con kháng hygromycin B có các lá mầm dài (~ 1,0 cm), trong khi các cây con không kháng kháng sinh có các lá mầm ngắn (~ 0,3 cm). Phương pháp chọn lọc cải tiến rút ngắn thời gian xác định cây *Arabidopsis* con biến đổi gen nhanh hơn chỉ trong 3,25 ngày. Sau đó, các cây được chọn sẽ được kiểm tra sự có mặt của gen bằng PCR cũng như sự hoạt động của gen chuyển *AtZAT12* dưới kính hiển vi.

**1. Đặt Vấn Đề**

Hiện tại, phương pháp chọn lọc các hạt sau chuyển gen khá tốn khá nhiều thời gian và tùy thuộc vào sự có mặt của gen chỉ thị. Gen chỉ thị thường được sử dụng trong chuyển gen ở thực vật là gen kháng kháng sinh (như Kanamycin, Hygromycin...) hoặc kháng thuốc diệt cỏ (như BASTA). Chọn lọc kháng kháng sinh như kanamycin thường mất 7 - 10 ngày sau khi nảy mầm để chọn được dòng chuyển gen dương tính (Bechtold & ctv., 1993; Clough & Bent., 1998). Quá trình chọn lọc cũng có thể gặp các trở ngại như khi nảy mầm, các lá mầm mới mọc thường có màu xanh đậm khiến cho các cây con chuyển gen không thể phân biệt với cây không chuyển gen. Khi chờ khoảng 7 - 10 ngày, cây không chuyển gen sẽ chuyển màu trắng và chỉ có cây chuyển gen là vẫn có màu xanh. Tuy nhiên, trong thời gian này, đĩa hạt chọn lọc có thể bị nhiễm nấm giống như các nghiên cứu vi ghép cây

(Altan & ctv., 2010). Nguyên nhân nhiễm nấm có thể có trong hạt thu được từ quá trình nhúng hoa bởi vì dung dịch môi trường nhúng hoa có đường sucrose và giai đoạn đầu sau khi nhúng hoa, cây sẽ được đặt bằng chụp nhựa trong suốt để giữ trong môi trường ẩm và ấm nhưng đây lại là điều kiện lý tưởng cho nấm phát triển (Clough & Bent, 1998; Hadi & ctv., 2002). Trong quá trình chọn lọc, đĩa hạt bị nhiễm nấm có thể làm ngăn cản hiệu quả chọn lọc của chất kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ có trong môi trường chọn lọc, do đó lá các cây không chuyển gen nhưng vẫn có màu xanh. Thêm nữa, cây con nảy mầm trên đĩa thạch có mật độ cao có thể làm cho rễ phát triển bên trên môi trường và do đó dẫn đến quá trình chuyển màu nhạt trên cây không chuyển gen sẽ diễn ra chậm do nồng độ chất bổ sung cho chọn lọc giảm như trong nghiên cứu của Ee & ctv. (2014) đã gieo 100 hạt trên đĩa có đường kính 10 cm.

Để giải quyết vấn đề trên trong nghiên cứu này cây *Arabidopsis* con đã được sàng lọc nhanh chóng dễ dàng theo quy trình chọn lọc cây *Arabidopsis* chuyển gen kháng Hygromycin B của Harrison & ctv. (2006). Hygromycin B là kháng sinh được tạo ra bởi vi khuẩn phân lập từ đất *Streptomyces hygroscopicus*. Thời gian đầu kháng sinh này được sử dụng như chất tẩy giun khi bổ sung vào thức ăn của gà và lợn. Gen kháng kháng sinh này được phát hiện năm 1980 là một kinase ức chế Hygromycin thông qua quá trình phosphoryl hóa (Davies & Gritz., 1983; Kaster & ctv., 1983; Rao & ctv., 1983). Gen kháng này được sử dụng làm gen chỉ thị trong những nghiên cứu thực vật, đặc biệt là chọn lọc cây sau chuyển gen. Khi sử dụng Hygromycin 50 mg/L sẽ gây độc cho các callus không biến nạp (Kauffman, 2009). Harrison & ctv. (2006) đã chọn lọc thành công các dòng *Arabidopsis* chuyển gen với Hygromycin B ở nồng độ 15 µg/mL.

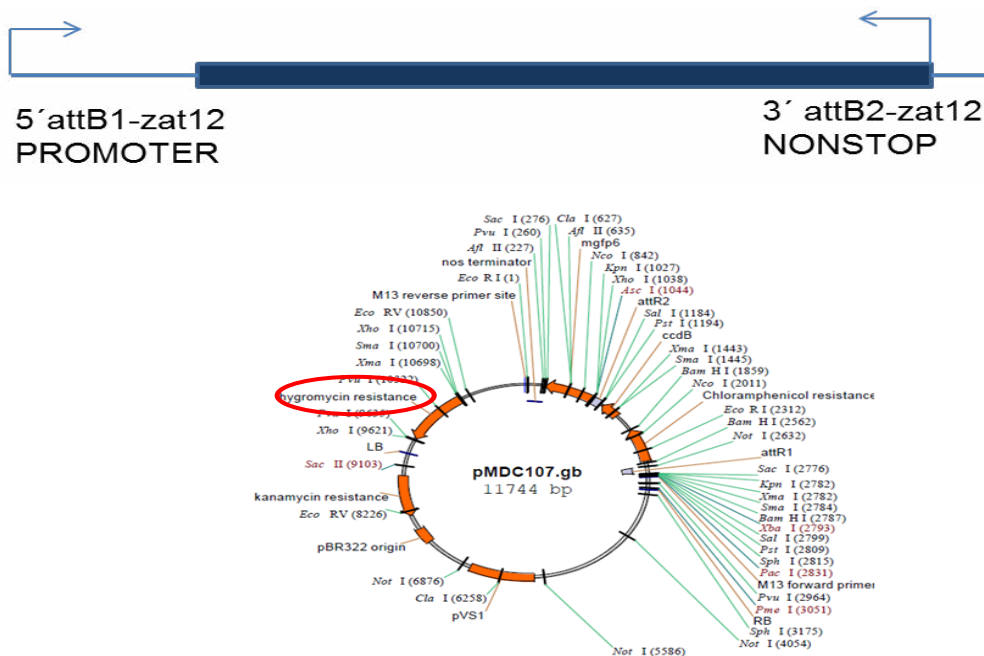
Trong nghiên cứu này, cây *Arabidopsis* đã được chuyển gen *AtZAT12* nhờ *Agrobacterium tumerfaciens* bằng phương pháp nhúng hoa (Clough & Bent, 1998). *AtZAT12* được gắn vào vector pMDC107 có mang gen chọn lọc là gen kháng kháng sinh Hygromycin B. Cấu trúc của vector được tóm tắt như

sau pMDC107:*ZAT12-GFP*, trong đó gen *AtZAT12* đã loại bỏ đi mã di truyền dừng dịch mã để nối với gen huỳnh quang GFP phía sau. Với việc gắn GFP vào gen mục tiêu sẽ giúp sàng lọc hoạt động của gen mục tiêu bằng huỳnh quang GFP dưới kính hiển vi. Vector pMDC107 là vector nhị phân có chỉ thị chọn lọc ở vi khuẩn là gen kháng kanamycin và chỉ thị chọn lọc ở thực vật là gen kháng kháng sinh Hygromycin B (Le & ctv., 2016). Nghiên cứu này nhằm chọn lọc được các cây chuyển gen thành công bằng cách đặt các hạt của những cây chuyển gen trên môi trường bổ sung kháng sinh Hygromycin B nhanh và hiệu quả.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt cây *Arabidopsis* chuyển gen thu được sau khi nhúng hoa trong dung dịch *Agrobacterium tumerfaciens* đã được biến nạp cấu trúc pMDC107:*ZAT12-GFP* được cung cấp từ nghiên cứu của Le & ctv. (2016). Cấu trúc gen chuyển (Hình 1 bên trên) và cấu trúc vector pMDC107 (Hình 1 bên dưới, Invitrogen, Đức) được trình bày trong Hình 1 (Le & ctv., 2016).

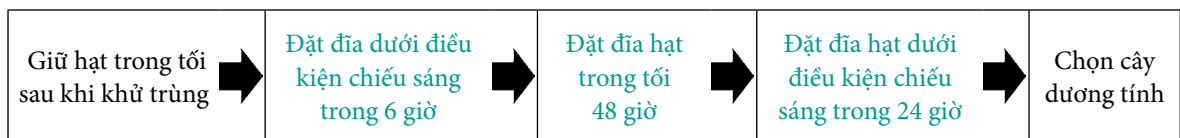


**Hình 1.** Cấu trúc gen chuyển *AtZAT12* (A) được chèn vào giữa vị trí attR1 và attR2 trên cấu trúc của vector pMDC107 (Invitrogen) (B) để biến nạp vào *Agrobacterium tumerfaciens*, sau đó là chuyển vào cây *Arabidopsis*.

**2.2. Phương pháp chọn lọc các dòng *Arabidopsis* chuyển gen *AtZAT12***

Quá trình chọn lọc hạt của các dòng *Arabidopsis* chuyển gen được tiến hành theo phương pháp của Harrison & ctv. (2006). Hạt *Arabidopsis* chuyển gen thu được sau khi biến nạp được khử trùng trong dung dịch 50% hypochlorite trong 7 phút, được rửa sạch ba lần bằng nước cất khử trùng. Hạt sau khử trùng được đặt trên môi trường thạch Murashige và Skoog (MS) 1% Agar có bổ sung Hygromycin B với nồng độ 15 µg/mL (Invitrogen, Đức). Mỗi đĩa môi trường được đặt khoảng 500 hạt. Hạt được đặt trong bóng tối 2 ngày ở 4°C. Sau đó hạt được chuyển sang tủ sinh

trưởng (CLF Plant Climatics, Đức) và ủ trong 6 giờ ở 22°C trong điều kiện chiếu sáng liên tục để kích thích nảy mầm. Các đĩa hạt này sau đó được bọc trong giấy nhôm trong 2 ngày ở 22°C để giữ đĩa trong tối, ngăn cản ánh sáng. Sau đó, đĩa hạt được lấy ra và giữ trong 24 giờ ở 22°C trong điều kiện chiếu sáng liên tục. Quá trình chiếu sáng trong 24 giờ cuối cùng không cần phải liên tục; quá trình chọn lọc hoạt động tốt khi cây con được đặt trong chế độ sáng 16 giờ, tối 8 giờ mặc dù cần có tổng ánh sáng 24 giờ để chọn lọc tối ưu. Dưới đây là tiến trình chọn lọc hạt *Arabidopsis* chuyển gen trên môi trường MS 1% có bổ sung kháng sinh Hygromycin B.



**2.3. Kiểm tra các dòng *Arabidopsis* chuyển gen dương tính sau chọn lọc**

Các dòng *Arabidopsis* chuyển gen thành công sau khi được chọn trên môi trường chứa kháng sinh hygromycin B sẽ được chuyển vào đất để thu hạt thế hệ T1 và thu lá tách ADN để kiểm tra cấu trúc gen chuyển *AtZAT12-GFP* bằng PCR.

Lá của các dòng được chọn được tách chiết ADN theo phương pháp của Clarke (2009). Phản ứng PCR kiểm tra các dòng *Arabidopsis* chuyển gen (*ZAT12-GFP*) sẽ sử dụng 2 mỗi là một mỗi tại vùng gen *GFP* được ký hiệu là GFP rev (trình tự là: 5'-AAT TGG GAC AAC TCC AGT GAA A-3') và một mỗi nằm ở vùng gen *AtZAT12* được ký hiệu là 5' genotyping *ZAT12* (trình tự là: 5'-TCG CAT CCT TGT CCC ATA TGT-3'). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, Đức) 12,5 µL, Mỗi: GFP rev 1 µL, 5' genotyping *ZAT12* 1 µL và H<sub>2</sub>O: 9,5 µL và 1 µL ADN của các mẫu chọn lọc dương tính. Chu trình nhiệt được áp dụng như sau: 95°C: 3 phút, 30 chu kỳ (95°C: 30 giây, 59°C: 45 giây, 72°C : 60 giây), 72°C: 5 phút và giữ mẫu phản ứng ở 4°C. Các sản phẩm PCR thu được sau đó được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Cuối cùng, các dòng *Arabidopsis* chuyển

gen được chọn có thể sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo như nghiên cứu sự biểu hiện và vị trí biểu hiện của gen đã được biến nạp thành công.

**2.4. Kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển *AtZAT12* dưới kính hiển vi huỳnh quang**

Hạt của dòng *Arabidopsis* không chuyển gen và hạt *Arabidopsis* chuyển gen thế hệ T3 được chọn theo quy trình trên đã được đặt trên môi trường thạch MS trong 5 ngày. Sau đó thu rễ của những cây này để quan sát dưới kính hiển vi LSM510. Do gen *AtZAT12* được gắn với GFP nên khi cấu trúc gen biểu hiện sẽ phát hiện huỳnh quang GFP (bước sóng 520 - 530 nm). Kính hiển vi được đặt ở bước sóng kích thích: 488 nm, kính lọc phát hiện là: 500 - 530 nm.

**3. Kết Quả và Thảo Luận**

**3.1. Chọn lọc các dòng *Arabidopsis* chuyển gen bằng kháng sinh Hygromycin B**

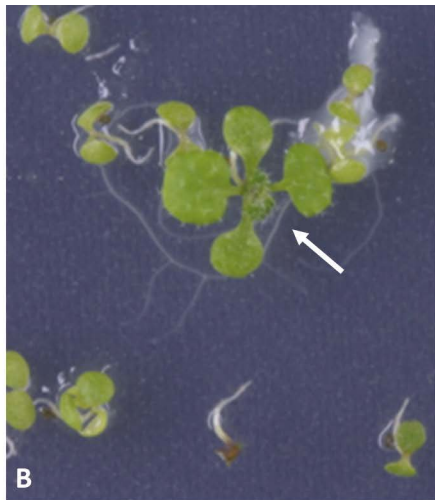
Kết quả thu được cho thấy kháng sinh Hygromycin bổ sung trong môi trường MS không làm ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt *Arabidopsis*. Tuy nhiên, cây con chuyển gen được đặt trên MS chứa

Hygromycin B 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  có đặc điểm phát triển khác biệt giúp phân biệt những cây không chuyển gen và cây chuyển gen không thành công. Do cây chuyển gen thành công có mang gen chỉ thị là gen kháng kháng sinh Hygromycin B. Hygromycin B là kháng sinh có khả năng ức chế quá trình tổng hợp protein do đó ức chế quá trình kéo dài rễ ở cây không chuyển gen. Trong nghiên cứu này, sau 2 ngày giữ trong tối trên môi trường chứa Hygromycin B (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), số rễ của các cây tham gia chọn lọc đều giống nhau (1 rễ) nhưng các dòng *Arabidopsis* chuyển gen kháng Hygromycin B có trụ dưới lá mầm dài khoảng  $1,0 \pm \text{cm}$ , trong khi các dòng không chuyển gen có trụ dưới lá mầm ngắn ( $\sim 0,3 \text{ cm}$ ) (Hình 2A, C, D). Lá của các cây tham gia chọn lọc không có sự khác biệt giữa chuyển gen thành công và không thành công. Ngoài ra, trái ngược với cây con được đặt trên môi trường bổ

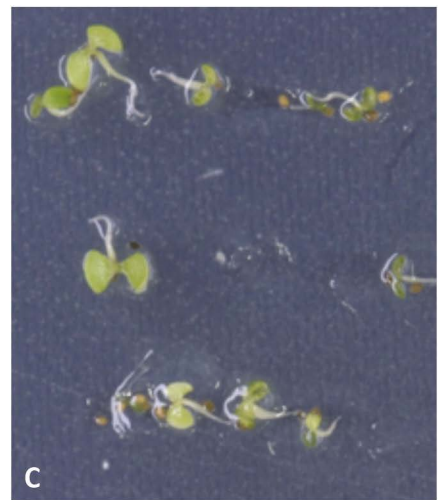
sung kháng sinh Kanamycin hoặc phosphinothricin, tất cả cây con mọc trên môi trường chứa Hygromycin B đều có màu xanh sau 24 giờ chiếu sáng. Kết quả này tương đồng với kết quả quan sát sự phát triển của cây *Arabidopsis* chuyển gen trên môi trường MS có bổ sung Hygromycin B của Harrison & ctv. (2006) và Ee & ctv. (2014). Thậm chí khi tiếp tục để cây *Arabidopsis* chọn lọc sinh trưởng trên môi trường MS có chứa Hygromycin B, tính kháng này càng thể hiện rõ ưu thế sinh trưởng hơn cây chuyển gen không thành công như trong Hình 2B. Cây con *Arabidopsis* chuyển gen có gen kháng Hygromycin B đã sinh trưởng tốt với lá màu xanh đậm. Kết quả của thí nghiệm này sau khi chọn lọc bằng Hygromycin B đã chọn được 8 dòng dương tính. Các dòng này sau đó được chuyển ra đất và thu mẫu lá để kiểm tra tiếp tục sự có mặt gen chuyển bằng kỹ thuật PCR.



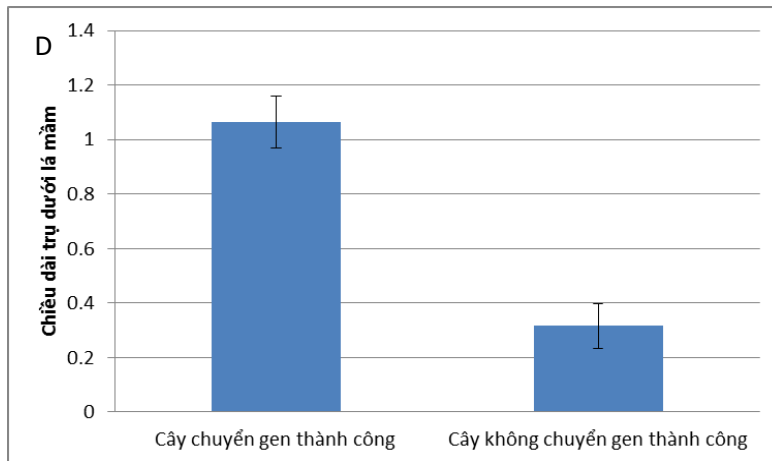
Dòng chuyển gen thành công (3,25 ngày tuổi, mũi tên trắng)



Dòng chuyển gen thành công (25 ngày tuổi, mũi tên trắng)



Dòng chuyển gen không thành công (âm tính)

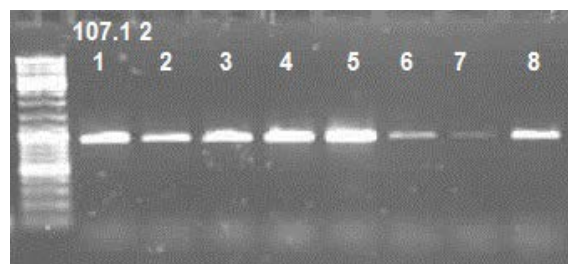


**Hình 2.** Kết quả chọn lọc dòng *Arabidopsis* chuyển gen *AtZAT12* trên môi trường MS bổ sung thêm kháng sinh Hygromycin B. Hình 2A: cây con *Arabidopsis* chuyển gen thành công có trụ dưới lá mầm kéo dài (mũi tên). Hình 2B: dòng *Arabidopsis* chuyển gen thành công kháng Hygromycin B (hình tròn trắng) sau 25 ngày chọn lọc. Hình 2C: dòng *Arabidopsis* chuyển gen không thành công (âm tính) có trụ dưới lá mầm ngắn hơn. Hình 2D: chiều dài trụ dưới lá mầm của cây chuyển gen thành công và không thành công. Đơn vị tính: cm.

**3.2. Kiểm tra sự có mặt của gen *AtZAT12* trên các dòng *Arabidopsis* chuyển gen đã được chọn.**

Các cây con *Arabidopsis* kháng Hygromycin B đã được xác định từ thí nghiệm chọn lọc trên là những cây *Arabidopsis* chuyển gen thành công thế hệ T1 sẽ được thu mẫu lá để tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng kỹ thuật PCR. Trong thí nghiệm

chọn lọc ở trên, kết quả thu được 8 dòng dương tính với Hygromycin B và 8 dòng này được thực hiện phản ứng kiểm tra gen với hai mỗi 5' genotyping *ZAT12* và GFP rev. Kết quả cho thấy cả 8 dòng được chọn đều phát hiện bằng ADN có kích thước khoảng 1092 bp như mong đợi là cấu trúc gen *AtZAT12-GFP* (Hình 3). Kết quả như vậy đã khẳng định việc áp dụng thành công phương pháp chọn lọc nhanh sau biến nạp.



**Hình 3.** Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong các dòng *Arabidopsis* chuyển gen kháng Hygromycin B sau khi chọn lọc. Giếng 1-8: 8 dòng chuyển gen được chọn sau khi chọn lọc bằng Hygromycin B.

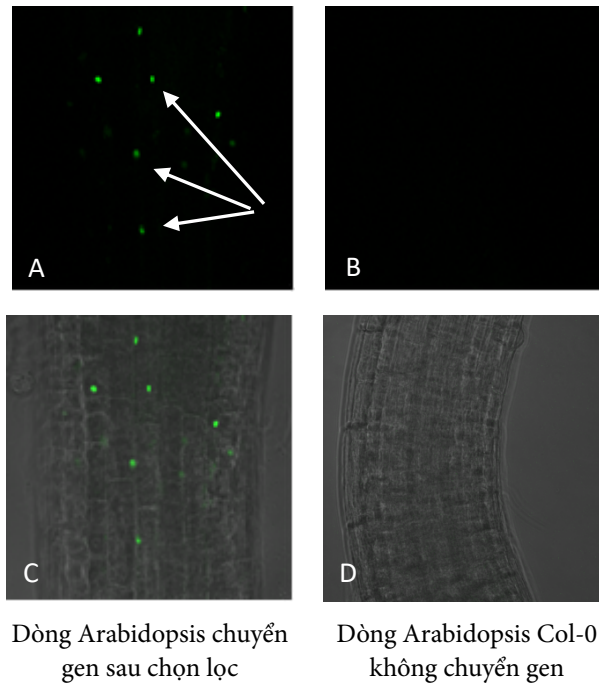
**3.3. Kiểm tra hoạt động của gen chuyển *AtZAT12* trên cây *Arabidopsis* sau khi chọn lọc bằng Hygromycin B**

Sau 2 thế hệ T1 và T2 có tỷ lệ chọn lọc được xác định là 100% bằng kỹ thuật PCR như vậy dòng chuyển gen chúng tôi chọn lọc được ở trạng thái đồng hợp

từ. Hạt *Arabidopsis* chuyển gen thế hệ T3 thu được từ bằng cách để các dòng dương tính thế hệ T1, T2 tự thụ phấn sẽ được đặt trên môi trường MS trong 5 ngày với điều kiện chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối. Sau đó, rễ của những cây này được quan sát dưới kính hiển vi để phát hiện huỳnh quang GFP (bước sóng 520 - 530 nm). Kết quả được thể hiện trong Hình 4

cho thấy cấu trúc ZAT12-GFP đã được biểu hiện ở trong nhân của tế bào rễ. Kết quả này cũng tương ứng với kết quả của Le & ctv. (2016) khi quan sát thấy vị trí biểu hiện của gen *AtZAT12* trong tế bào rễ cây

*Arabidopsis* là tại nhân của tế bào. Kết quả này một lần nữa khẳng định qui trình chuyển gen và chọn lọc đã được thành công rút ngắn hơn và hiệu quả giúp tiết kiệm thời gian.



**Hình 4.** Hình ảnh biểu hiện dưới kính hiển vi của gen *AtZAT12* trong nhân tế bào rễ cây *Arabidopsis* chuyển gen thành công (Hình A và C, hiện màu xanh lá như được chỉ bởi các mũi tên trắng) và dòng *Arabidopsis* không chuyển gen (Hình B và D, không hiện màu xanh lá) sau khi chọn lọc bằng Hygromycin B. Hình A và B là hình ảnh huỳnh quang. Hình C và D là hình kết hợp giữa huỳnh quang và hình ảnh DIC (differential interference contrast microscopy).

#### 4. Kết Luận

Nghiên cứu này đã áp dụng thành công quy trình chọn lọc cây *Arabidopsis* chuyển gen kháng Hygromycin B hiệu quả. Tất cả các dòng thể hệ T0 được chọn đều đã được xác định lại là dương tính trong phản ứng kiểm tra bằng kỹ thuật PCR và cả thí nghiệm kiểm tra biểu hiện gen chuyển dưới kính hiển vi huỳnh quang. Quy trình này cũng đã được rút ngắn với thời gian chọn lọc (3,25 ngày) nên tránh được hiện tượng đĩa chọn lọc có thể bị nhiễm nấm do sự kéo dài của quá trình chọn lọc dẫn đến kết quả dương tính hoặc âm tính giả và tốn thời gian.

#### Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

#### Lời Cảm Ơn

Để thực hiện được nghiên cứu này, chúng tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TS. Petra Bauer và các thành viên của Phòng thí nghiệm Thực vật, Trường Đại học Tổng hợp Saarland, Cộng hòa Liên bang Đức đã tạo điều kiện giúp đỡ hoàn thành nghiên cứu chọn lọc này.

**Tài Liệu Tham Khảo (References)**

- Altan, F., Bürün, B., & Şahin, N. (2010). Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. *African Journal of Biotechnology* 9(7), 991-995. <https://doi.org/10.5897/AJB08.090>.
- Bechtold, N., Ellis, J., & Pelletier, G. (1993). In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus De l'Académie Des Sciences* 316, 1194-1199.
- Clarke, J. D. (2009). Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols* (3), 5177. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5177>.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(6), 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>.
- Davies, J., & Gritz, L. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25(2-3), 179-188. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90223-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90223-8).
- Ee, S. F., Khairunnisa, M. B., Azura, Z. M. H., Azmi, N., & Zamri, Z. (2014). Effective hygromycin concentration for selection of *Agrobacterium*-mediated transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Malaysian Applied Biology* 43, 119-123.
- Hadi, M., Kemper, E., Wendeler, E., & Reiss, B. (2002). Simple and versatile selection of *Arabidopsis* transformants. *Plant Cell Reports* 21(2), 130-135. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0473-9>.
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2, 19. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19>.
- Kaster, K. R., Burgett, S. G., Rao, R. N., & Ingolia, T. D. (1983). Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nucleic Acids Research* 11(19), 6895-6911. <https://doi.org/10.1093/nar/11.19.6895>.
- Kauffman, J. S. (2009). Analytical Strategies for monitoring residual impurities best methods to monitor product-related impurities throughout the production process. *BioPharm International* 23, 1-3.
- Le, C. T. T., Brumbarova, T., Ivanov, R., Stoof, C., Weber, E., Mohrbacher, J., Straube, C. F., & Bauer, P. (2016). Zinc finger of *Arabidopsis thaliana* ZAT12 interacts with fer-like iron deficiency induced transcription factor (FIT) linking iron deficiency and oxidative stress responses. *Plant Physiology* 170, 540-557. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01589>.
- Rao, R. N., Allen, N. E., Hobbs, J. N., Alborn, W. E., Kirst, H. A., & Paschal, J. W. (1983). Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24 (5), 689-695. <https://doi.org/10.1128/aac.24.5.689>.