

## بررسی ساختار جایگاه تراژن *cryIAb* در برنج تاریخته طارم مولایی

Study of *cryIAb* transgene locus structure in transgenic rice  
(*Oryza sativa* L., cultivar Tarom Molaii)

هاجر یحیائی پور<sup>۱</sup>، بهزاد قره یاضی<sup>۲\*</sup>، سید احمد سادات نوری<sup>۳</sup>، علی ایزدی دربندی<sup>۴</sup> و قربانعلی<sup>۵</sup>  
نعمت‌زاده<sup>۰</sup>

Hajar Yahyaiipoor<sup>1</sup>, Behzad Ghareyazie<sup>2\*</sup>, S.Ahmad Sadatnoori<sup>3</sup>, Ali Izadi Darbandi<sup>4</sup> and  
Ghorban Ali Nemat Zade<sup>5</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران  
۲- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،  
کرج، ایران  
۳- استاد گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران  
۴- دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران  
۵- استاد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع  
طبیعی ساری

- 1- M.Sc, plant breeding, College of Aburaihan, University of Tehran.  
2- Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran(ABRII),Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.  
3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran.  
4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran.  
5- Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ghareyazie@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

### چکیده

### واژه‌های کلیدی

رديف مجاور تراژن  
اينمني زيسطي  
برنج تاریخته  
*cryIAb*

میزان بیان تراژن و پایداری آن تحت تأثیر عواملی مثل ساختار کاست بیانی، الگوی تلفیق و ساختار جایگاه تراژن قرار می‌گیرد. ساختار جایگاه تراژن در سازوکارهای بیان آن اهمیت دارد. در این بررسی سعی شده است با جداسازی ردیف مجاور محل تلفیق تراژن *cryIAb* در برنج تاریخته طارم مولایی، ساختار جایگاه آن مشخص شود. برنج تاریخته طارم مولایی که از تواریزش همزمان دو پلاسمید pChitIHgII و pCIB4421 تولید شده دارای الگوی تلفیق ساده با بیان پایدار طی چندین نسل است. جهت بررسی ساختار جایگاه تراژن، ابتدا با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از انتهای<sup>۱</sup> و<sup>۲</sup> ژن مقاومت به امپیسیلین، انتهای<sup>۳</sup> ژن<sup>۴</sup> *cryIAb* و انتهای<sup>۵</sup> پیشبر PEPC بر روی پلاسمید pCIB4421 و انجام پی.سی.آر، حدود محل شکست پلاسمید تعیین شد. سپس با توجه به محل احتمالی شکست برای جداسازی نواحی مجاور آن از دو راهبرد پی.سی.آر یکطرفه شامل PCR و TAIL-PCR و Splinkerette PCR استفاده شد. ردیف یابی قطعات تکثیر شده و بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که محل شکست در نسخه‌ی کامل ۱۴۸ نوکلئوتید بعد از انتهای<sup>۳</sup> ژن مقاومت به امپیسیلین است و ۱۴۹۶ نوکلئوتید از نواحی پایین دست محل شکست و ۳۱۱ نوکلئوتید از نواحی بالا دست جداسازی شد. نتایج هم‌ردیف سازی این توالی‌ها با توالی پلاسمیدهای pChitIHgII و pCIB4421 و ژنوم برنج در پایگاه NCBI نشان داد که توالی پایین دست مخلوطی از قطعات پلاسمید و ژنوم برنج و توالی بالا دست نیز قطعات ناپیوسته‌ای از توالی پلاسمیدهای منتقل شده است.

## مقدمه

پیچیدگی متفاوت هستند. ساختار جایگاه بهویژه در انتقال مستقیم از یک نسخه کامل تا الگوهای پیچیده‌ای شامل چندین نسخه کامل، تکرارهای پشت سر هم و یا معکوس، توالی‌های کوتاه شده و یا بازآرایی شده و قطعات ژنومی میزبان پراکنده، متغیر است (Pawlowski *et al.* 1998). مشاهده شده است به طور معمول جایگاه‌هایی با ساختار ساده بیان پایداری دارند، هر چه سازماندهی ساختار جایگاه پیچیده‌تر باشد احتمال بیان مطلوب آن طی نسل‌های آینده کاهش می‌یابد (Svitashov *et al.* 2002).

ساختار جایگاه تراژن ممکن است از طرق مختلف مانند خاموشی وابسته به همولوژی، تحریک متیلاسیون خود بخودی و تولید آر.ان.ای همسو و غیرهمسوی ناقص (Aberrant RNA) منجر به خاموشی تراژن شود. تجزیه ساختار جایگاه در لاین‌های آراییدوپسیس و برج تاریخته تولید شده به روش زیست پرتابی به وضوح نشان داد که مکان‌هایی شامل ساختارهای داخلی پیچیده مستعد خاموشی مبتنی بر متیلاسیون در اثر وجود توالی‌های تکراری مشابه هستند (Assaad *et al.* 1993; Kumpatla *et al.* 2003) و درک ساز و کارهای تلفیق تراژن کمک خواهد کرد (Kohli *et al.* 2003) و درک کامل این ساز و کارها، دانش لازم جهت مدیریت ساختار جایگاه تراژن برای تولید مکان‌های تراژن ساده و کامل و سرانجام تلفیق مستقیم تراژن در مکان مورد نظر را فراهم می‌آورد (Svitashov *et al.* 2004; Somers and Makarevitch 2004).

در این بررسی سعی شده است تا با جداسازی ردیف مجاور محل تلفیق تراژن *cryIAb* در برج تاریخته طارم مولایی، ساختار جایگاه آن به عنوان یک جایگاه دارای الگوی تلفیق ساده با بیان پایدار و عملکرد عالی طی چندین نسل مشخص شود. این برج تاریخته به روش زیست پرتابی و با انتقال همزمان دو پلاسمید pChitIIHygII و pCIB4421 ناقل ژن *cryIAb* در نسل T1 و T2 توارث ژن *cryIAb* را نشانگر هیگرومایسین فسفوتانسفراز تولید شد.

تجزیه سادرن این گیاه نشان دهنده الگوی تلفیق ساده و بررسی نحوه توارث ژن *cryIAb* در نسل T1 و T2 بیانگر وجود تنها یک جایگاه از این ژن در آن است (Ghareyazie *et al.* 1997). همچنین اثرهای تلفیق تراژن بر روی ژن‌های میزبان نیز یکی از ملاحظه‌های مطرح شده در مورد گیاهان تاریخته است.

بیان پایدار تراژن لازمه کاربرد موفق مهندسی ژنتیک در اصلاح گیاهان زراعی است. پژوهش‌ها نشان داده است که میزان و پایداری بیان تراژن تحت تأثیر عواملی مثل ساختار (configuration) کاست بیانی، تعداد نسخه تلفیق شده از تراژن، موقعیت و الگوی تلفیق تراژن قرار می‌گیرد (Day *et al.* 2000; Zhong 2001; Kohli *et al.* 2003; Li *et al.* 2008). اختلاف سطوح بیان تراژن در یک جمعیت از گیاهان تاریخته حاصل از یک آزمایش مشابه در هر دو سیستم متبادل انتقال ژن (بمبانان ذره‌ای و انتقال به کمک اگروباکتریوم) رخدادی معمول است (Day *et al.* 2000). پژوهشگران باید جمعیت بزرگی از گیاهان تاریخته را به دقت غربال کنند تا یک یا تعداد کمی گیاه که تنها صفت مورد نظر را در سطحی قابل قبول بیان می‌کند انتخاب کنند. همچنین تراژن ممکن است طی نسل‌های بعدی و یا تحت تأثیر شرایط محیطی خاموش شود (Zhong 2001). بنابراین شناسایی و حذف تاریخته‌هایی با بیان ناپایدار مرحله‌ای ضروری در پروژه انتقال ژن است (Kohli *et al.* 2003) خصوصیات دی.ان.ای ژنومی مجاور تراژن می‌تواند روى بیان آن اثر بگذارد. بررسی‌ها بر روی پتونیا و توتون تاریخته نشان داد وجود توالی‌های پروکاریوئی، ریزماهواره‌های غنی از GA، بقایای رتروالمنت و توالی‌های تکراری پشت سر هم (tandem repeat array) در توالی ژنومی Pröls and Meyer (1997) در مقابل حضور MAR (Matrix attachment regions) در مجاورت جایگاه تراژن (Iglesias 1992; Iglesias 1997) با برخی تلفیق‌های دارای بیان پایدار مرتبط بود (locus). تجزیه مولکولی ساختار محل تلفیق در برج‌های تاریخته تولید شده به روش زیست پرتابی (بیولیستیک biolistic) نشان داد که توالی‌های غنی از AT و تکرارهای تلومریک در مجاورت جایگاه‌های دارای بیان پایدار وجود دارد (Takano *et al.* 1997). علاوه بر توالی‌های ژنومی مجاور محل تلفیق، ساختار جایگاه تراژن و الگوی تلفیق آن نیز در کمیت و پایداری بیان آن مؤثر هستند (Kohli *et al.* 2003). هم در انتقال مستقیم ژن و هم انتقال به کمک اگروباکتریوم، جایگاه‌های تراژن تولید شده در تاریخته‌های حاصل از یک آزمایش مشابه، از نظر اندازه و

شکست پلاسمید از پی.سی.آر استاندارد با الگوی دی.ان.ا.ی پلاسمید pCIB4421 و گیاه تراریخته و مقایسه الگوهای باندی به دست آمده استفاده شد. برای انجام پی.سی.آر آغازگرهایی از انتهای ۳' ژن (*Bt*) *cryIAb*, انتهای ۳' و ۵' ژن مقاومت به امپی سیلین (*amp*) و انتهای ۵' پیشبر PEPC طراحی شد (شکل ۱). توالي آغازگرها در جدول یک آورده شده است.

برنامه پی.سی.آر شامل واسرتته سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه (یک چرخه) و ۳۵ چرخه شامل واسرتته سازی به مدت یک دقیقه در ۹۴ درجه، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای مناسب بسته به دمای ذوب دو آغازگر مورد استفاده و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه بازی هر یک کیلو جفت باز از اندازه محصول مورد نظر و در ادامه بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه (یک چرخه) بود.

تراژن وارد شده نباید روی بیان ژن‌های میزبان اثر منفی داشته باشد، چون جایگاه تلفیق تراژن در روش‌های رایج امروزی نمی‌تواند از قبل تعیین شود و از آنجا که تلفیق‌های پایدار و مطلوب در نواحی غنی از ژن رخ می‌دهند این ملاحظه ابراز شده که ممکن است در نتیجه ورود تراژن برخی ژن‌های داخلی میزبان تخریب شده باشند. بنابراین تعیین جایگاه دقیق تلفیق، امکان شناسایی اثرهای ناشی از ورود تراژن بر روی ژن‌های میزبان را نیز فراهم می‌آورد.

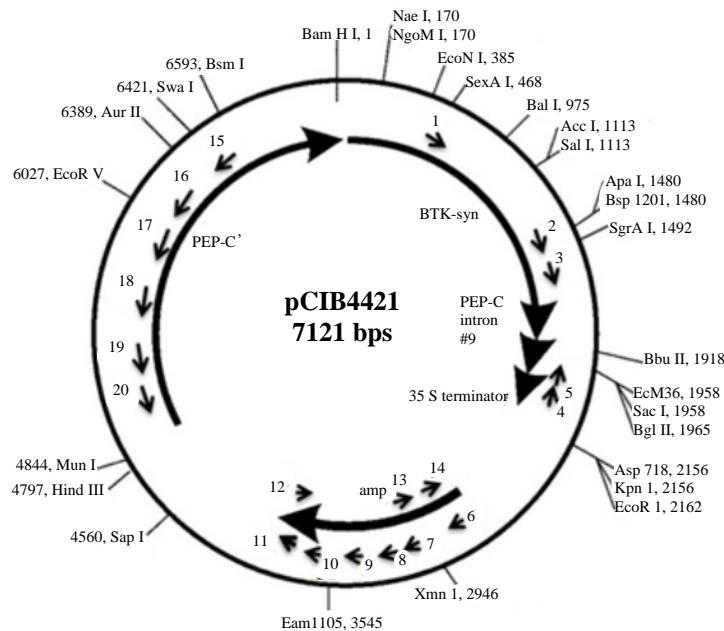
## مواد و روش‌ها

استخراج دی.ان.ا. و تعیین حدود محل وقوع نوترکیبی بین پلاسمید pCIB4421 با ژنوم بونج دی.ان.ای ژنومی از بافت برگ گیاهان تراریخته و شاهد به روش دلپورتا و همکاران (۱۹۸۳) استخراج شد و به منظور تعیین محل

جدول ۱- توالي آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 1- sequences of primers used in this study

شماره آغازگر در شکل ۱ Primer number in figure 1	توالی Sequence	شماره آغازگر در شکل ۱ Primer number in figure 1	توالی sequence
GGCGGCGAGAGGATCGAGAC Forward	CCGCTGTTGAGATCCAGTTC Reverse	13	GGCGGCGAGAGGATCGAGAC Forward
ACCCCCTTCAACTTCAGCAAC Forward	CACCCAACGTGATCTTCAGCA Reverse	14	ACCCCCTTCAACTTCAGCAAC Forward
GCAACGAGGTGTACATCGAC Forward	GAAGAGAGAGGTGGATTGG Reverse	15	GCAACGAGGTGTACATCGAC Forward
AAACCAGCAACTCACTGCAC Reverse	CCTATCCACTCTGCTATGTGTT Reverse	16	AAACCAGCAACTCACTGCAC Reverse
TGGTTCCCTGATCGATGACTG Reverse	GTTCTTGAGTTGATCTATTCCAG Reverse	17	TGGTTCCCTGATCGATGACTG Reverse
GCCTTCCTGTTTTGCTCAC Forward	GGTCTGTTGTTCTGTTTCTG Reverse	18	GCCTTCCTGTTTTGCTCAC Forward
GCTTTTTGCACAAACATGGGG Forward	GTTTACAGTGGATAACTCACAAACAG Reverse	19	GCTTTTTGCACAAACATGGGG Forward
TGAATGAAGCCATACCAAACGAC Forward	CTCACAAACAGTTGAACTAACGAC Reverse	20	TGAATGAAGCCATACCAAACGAC Forward
CAATTAATAGACTGGATGGAGGC Forward	(A/T/ C/G)TCGA(C/G)T(A/T)T(C/G)G(A/T)GTT AD1	-	CAATTAATAGACTGGATGGAGGC Forward
GATAAAATCTGGAGCCGGTGAG Forward	(A/T/C/G)GTCGA(C/G)(A/T)GA(A/T/C/G)A(A/T)GAA AD2	-	GATAAAATCTGGAGCCGGTGAG Forward
ATGGTAAGGCCCTCCCGTATC Forward	(A/T)GTG(A/T/C/G)AG(A/T)A(A/T/C/G)CA(A/T/C/G)GA AD3	-	ATGGTAAGGCCCTCCCGTATC Forward
ATACGGGAGGGCTTACCATC Reverse			ATACGGGAGGGCTTACCATC Reverse
			12



شکل ۱- موقعیت تقریبی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر بر روی پلاسمید pCIB4421

Figure 1- relative position of primers used in this study on plasmid pCIB4421

مرحله اول بود به جز آغازگر اختصاصی و الگوی واکنش، که از آغازگرهای داخلی (۷ و ۸) یا (۱۷ و ۱۸) در شکل ۱ به ترتیب در مرحله دو و سه استفاده شد و محصول مرحله اول پس از این که برابر رقيق شد به عنوان الگو در واکنش مرحله دوم مورد استفاده قرار گرفت و به همین ترتیب محصول مرحله دو به عنوان الگو در واکنش مرحله سه استفاده شد. برنامه زمانی مورد استفاده در هر سه مرحله براساس مقاله لیو و همکاران (Liu et al. 1995) بود. برای تفکیک محصول پی.سی.آر از ژل آگارز ۱/۵ در صد استفاده شد و محصول مرحله دوم و سوم در کتار هم بارگذاری شد.

#### روش انجام Splinkerette PCR

مراحل انجام این روش شامل اتصال الیگونوکلئوتیدهای سازگار ساز، هضم آنزیمی، اتصال سازگارساز به قطعات دی.ان.ای ژنومی، واکنش تکثیر مرحله اول و واکنش تکثیر مرحله دوم بود. تمامی این مراحل براساس دستورالعمل مقاله پاتر و لو (Potter and Lou 2010) انجام شد. توالی رشته‌های سازگار ساز و آغازگرهای ویژه سازگار ساز نیز از همین منبع انتخاب شد (شکل دو). آنزیمهای برشی مورد استفاده شامل *Bgl II*, *Hind III* و *EcoR I* بود که هر یک از این آنزیمهای دارای یک جایگاه شناسایی

#### تکثیر نواحی مجاور محل تلفیق

برای جداسازی ردیف مجاور محل تلفیق از دو روش پی.سی.آر یک طرفه شامل TAIL-PCR (پی.سی.آر ترکیبی نامتقارن دمایی Splinkerette) و Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR) استفاده شد.

#### روش انجام TAIL-PCR

برای انجام TAIL-PCR از دو طرف ناحیه احتمالی محل ادغام پلاسمید سه آغازگر اختصاصی به صورت داخلی طراحی شد، این آغازگرهای بر روی شکل یک با شماره‌های (۷ و ۹) و (۱۶، ۱۷ و ۱۸) نشان داده شده است. آغازگرهای تصادفی اختیاری Liu et al. (1995) براساس مقاله لیو و همکاران (AD3, AD2 and AD1) انتخاب شد و توالی آنها در جدول یک آورده شده است. واکنش TAIL-PCR طی سه مرحله انجام شد. مخلوط واکنش مرحله اول شامل بافر پی.سی.آر با غلظت نهایی  $1 \times$ ,  $0.2 \mu\text{M}$  میکرومولار  $\text{MgCl}_2$ ,  $0.2 \mu\text{M}$  میکرومولار مخلوط dNTP,  $2.5 \mu\text{M}$  میکرومولار آغازگر اختصاصی خارجی (۷ یا ۱۹ در شکل ۱)،  $1 \mu\text{l}$  میکرومولار از یکی از آغازگرهای AD، یک واحد آنزیم دی.ان.ای پلیمراز Taq (سیناژن) و  $20 \text{ ng}$  نانوگرم دی.ان.ای ژنومی در حجم نهایی  $20 \mu\text{l}$  میکرولیتر بود. اجزای واکنش مرحله دوم و سوم مانند

۱۴) در هضم با آنزیم *Bgl II*, آغازگرهای (۱۹ و ۲۰) در هضم با آنزیم *Hind III* و آغازگرهای (۲ و ۳) و (۱۳ و ۱۴) در هضم با آنزیم *EcoR I* به عنوان کنترل داخلی جهت اطمینان از صحت انجام واکنش استفاده شد. فاصله این آغازگرهای تراژن شناسایی آنزیمهای برشی مورد استفاده مشخص بود.

بر روی پلاسمید pCIB4421 بودند (شکل ۱). دو آغازگر اختصاصی به صورت داخلی از دو سمت ناحیه احتمالی ادغام پلاسمید طراحی شد. از آغازگرهای (۱۰ و ۱۱) در جدا سازی توالی مجاور<sup>۳</sup> و از آغازگرهای (۱۹ و ۲۰) در تکثیر ناحیه مجاور<sup>۵</sup> کاست ژنی *cryIAb* استفاده شد. از آغازگرهای (۱۳ و

رشته بالایی سازگار

5-GATCCCACTAGTGTGACACCAAGTC

3-GGTGATCACAGCTGTGGTCAGAGTAAGTCGGTGCAGAGGATCGTTGCCAATGAGAACG-5

رشته پایینی سازگارساز

3-CAGCTGTGGTCAGAGTAAGTCGGT-5

آغازگر ۲

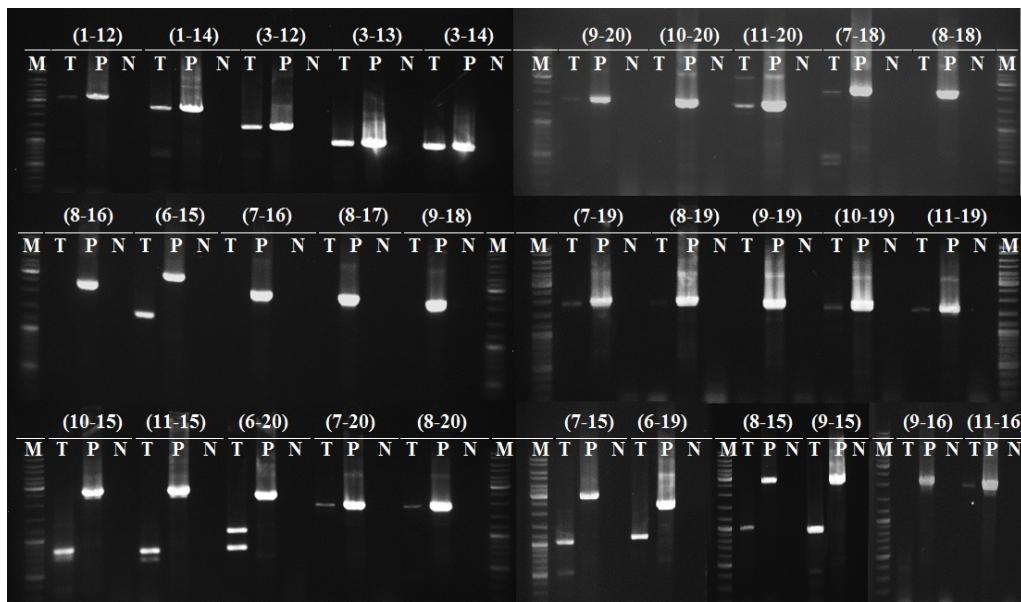
TAATTTTTTTTC  
64444444

3-CCAGAGAGGATCGTTGCCAATGAGAACG-5

آغازگر ۱

شکل ۲- ساختار و توالی واحد Splinkerette و آغازگرهای ویژه آن (Potter and Lou 2010)

Figure 2- structure and sequence of Splinkerette unit and sequenese of its specific primes



شکل ۳- الگوی تکثیر ناحیه بین ژنهای *cryIAb* و مقاومت به امپیسیلین و ناحیه بین ژن مقاومت به امپیسیلین و پیشبر PEPC (T) گیاه تراریخته، (P) پلاسمید pCIB4421 گیاه غیر تراریخته، (M) لadder mix (Fermentas)، اعداد داخل پرانتز ترکیب آغازگری مورد استفاده را نشان می‌دهد. شماره آغازگرها مطابق شکل ۱ است.

Figure 3- amplification pattern of the region between the *cryIAb* and ampR genes and between the ampR and PEPC , (T) transgenic plant, (P) pCIB4421 plasmid, (N) non-transgenic plant, (M) ladder mix (Fermentas). Numbers. in parentheses indicate the primer combinations. primers are numbered according to Figure 1.

توالی‌ها با توالی پلاسمیدهای pCIB4421، pChitHygII و توالی NCBI ژنوم برنج با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) انجام شد.

### نتایج و بحث

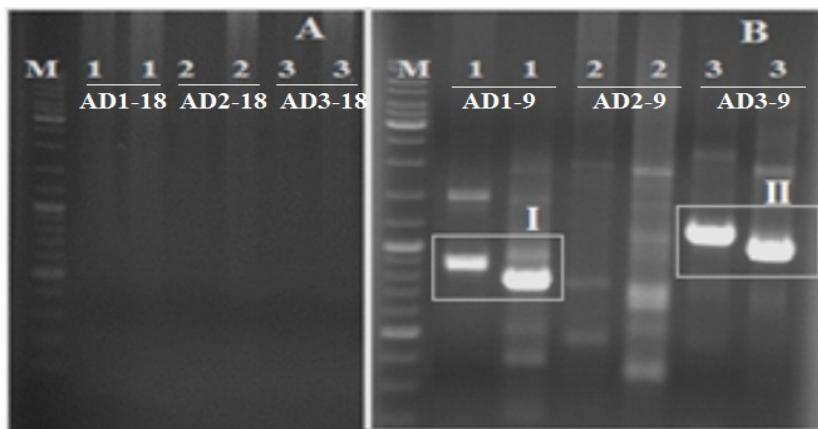
تکثیر ناحیه بین ژن‌های *cryIAb* و امپی‌سیلین روی پلاسمید و گیاه تاریخته با استفاده از پنج ترکیب آغازگری انجام شد و در همه موارد اندازه قطعات تکثیر شده روی پلاسمید و گیاه تاریخته به طور کامل یکسان و مطابق با فاصله بین دو آغازگر پیشرو و برگشتی مورد استفاده بر روی پلاسمید بود (شکل ۳). این مشاهده بیانگر آن بود که حداقل یک نسخه سالم از این قسمت از پلاسمید به گیاه منتقل شده است. تکثیر ناحیه بین ژن مقاومت به امپی‌سیلین و پیشبر PEPC با استفاده از ۲۶ ترکیب آغازگری انجام شد. در ده مورد طول قطعه تکثیر شده روی پلاسمید و گیاه یکسان بود، در هشت مورد اندازه قطعات تکثیر شده روی گیاه تاریخته کوچک‌تر از اندازه مورد نظر بود و در هشت مورد دیگر این ناحیه بر روی گیاه تاریخته تکثیر نشد (شکل ۳). براساس تفاوت الگوی تکثیر بر روی پلاسمید و گیاه در ناحیه اخیر، نتیجه‌گیری شد که محل وقوع نوترکیبی بین پلاسمید و گیاه نقطه‌ای در این ناحیه یعنی بین ناحیه رمز کننده ژن مقاومت به امپی‌سیلین و پیشبر PEPC باشد.

در جدا سازی توالی‌های مجاور<sup>۳</sup> محل شکست پلاسمید دو تکثیر صحیح حاصل از آغازگرهای (AD1-9) و (AD3-9) با اندازه‌های ۷۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز (به ترتیب شماره I و II در شکل چهار) به دست آمد. این قعات ردیف‌یابی شد و هم ردیف سازی آن‌ها با توالی پلاسمیدهای منتقل شده و ژنوم برنج انجام شد. با طراحی آغازگر از انتهای توالی حاصل از (AD3-9) و (AD1-9) تکثیر مجدد ردیف‌های کناری با روش TAIL-PCR<sup>۹۰۰</sup> انجام شد.

نوکلئوتید در ادامه توالی قبلی ردیف‌یابی شد. در جدا سازی نواحی مجاور<sup>۵</sup> کاست ژنی *cryIAb* از ترکیب آغازگز ۱۸ با آغازگرهای AD تکثیری حاصل نشد که علت آن می‌تواند این باشد که هیچ یک از آغازگرهای AD مورد استفاده در فاصله قابل تکثیر با آغازگر اختصاصی قرار نگرفتند.

**(I-PCR (Inverse PCR))** آنزیم *Bgl* II برای این قسمت انتخاب شد و با توجه به جایگاه شناسایی این آنزیم بر روی پلاسمید (شکل ۱) و ناحیه احتمالی ادغام پلاسمید از آغازگرهای (۴ و ۵)، (۱۰ و ۱۱)، (۲ و ۳) و (۱۹ و ۲۰)، در واکنش‌های تکثیر اول و دوم استفاده شد. مقدار ۵ میکروگرم از دی‌ان‌ای ژنومی با ۳۰ واحد آنزیم بر شی در حجم ۳۷ نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس برای اتصال درون مولکولی مقدار ۵۰ نانوگرم از دی‌ان‌ای هضم شده با ۵ واحد آنزیم T4 دی‌ان‌ای لیگاز (Fermentas) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط شده و به مدت ده دقیقه در ۲۲ درجه نگهداری شد و واکنش در ۷۰ درجه به مدت پنج دقیقه متوقف شد. در بی‌سی‌آر مرحله اول از ترکیب آغازگرهای خارجی (۴-۱۰) برای تکثیر نواحی مجاور انتهای ۳ و (۲-۱۹) برای تکثیر نواحی مجاور انتهای ۵ استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر بی‌سی‌آر با غلظت نهایی ۱x، ۱/۵ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار مخلوط dNTP<sup>۰/۲</sup> میکرومولار از هر یک از آغازگرهای ۱، واحد آنزیم دی‌ان‌ای پلیمراز Taq (سینتاژن) و ۲۰ نانوگرم از دی‌ان‌ای حلقوی شده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. بی‌سی‌آر طبق برنامه پنج دقیقه در ۹۴ درجه (یک چرخه) و در ادامه ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه (برای هر دو ترکیب آغازگرهای) و چهار دقیقه در ۷۲ درجه و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه (یک چرخه) بود. یک میکرولیتر از محصول مرحله اول به عنوان الگو در واکنش مرحله دوم استفاده شد. برنامه‌ی زمانی بی‌سی‌آر و اجزای واکنش در این مرحله به جز آغازگرهای مانند مرحله اول بود. ترکیب آغازگرهای داخلی (۳-۲۰) و (۵-۱۱) در این مرحله به ترتیب جایگزین ترکیبات (۲-۱۹) و (۴-۱۰) مورد استفاده در مرحله اول شدند.

جدا سازی و خالص سازی قطعات انتخاب شده از روی ژل با استفاده از کیت خالص‌سازی high pure PCR product purification (Roche Applied Science, Germany) دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و پس از همسانه سازی در ناقل (Promega) pGEM-T Easy Vector (Promega) برای توالی‌یابی به شرکت sequetech کالیفرنیا فرستاده شدند و بررسی مشابهت این



شکل ۴- نتایج حاصل از TAIL-PCR. (A) تکثیر ناحیه مجاور انتهای<sup>۱</sup>، (B) تکثیر ناحیه مجاور انتهای<sup>۳</sup>، دو شماره مشابه در کنار هم نشان دهنده محصول مرحله دوم و سوم است. (M) ladder mix (Fermentas)

**Figure 4-** The results of TAIL-PCR. (A) amplification of 5'flanking sequence, (B) amplification of 3'flanking sequence, tow similar numbers indicate products of secondary and tertiary reactions. (M) ladder mix (Fermentas)

شکست کاست ثالثی *cryIAb*، با ژنوم برنج همولوژی نشان دادند. قطعه ۲۲۱ نوکلئوتیدی با دو قسمت مجزا از ژنوم میتوکندری برنج (موقعیت‌های: 341813- 1422900-423121: NC\_011033; 342034) دارای ۹۸ درصد تطابق (Identity) است همچنین این قطعه دارای ۹۷ درصد تطابق با بخشی از کروموزوم شماره ۹ (موقعیت: 5271486-5271707: NC\_008402.2) است. قطعه ۹۹ دارای ۹۷ درصد تطابق با ژنوم میتوکندری (موقعیت: 181) دارای ۹۹ درصد تطابق با ژنوم میتوکندری (NC\_011033.1: 336174-335993) است، همچنین ۷۶ نوکلئوتید ابتدای همین قطعه دارای ۹۶ درصد تطابق با بخشی از کروموزوم شماره چهار (موقعیت: 34148722-34148799: NC\_008397.2: 34148722-34148799) است. قطعه ۴۰ نوکلئوتیدی نیز مشابه توالی ژنوم میتوکندری است. با توجه به این که ژن *cryIAb* با نسبت ۳:۱ (۳۱kb) حضور ژن به ۱: عدم حضور آن) به ارث می‌رسد (Ghareyazie *et al.* 1997) جایگاه تلفیق آن باید روی کروموزوم هسته‌ای باشد نه میتوکندری. مشخص شده است که حدود ۱۳۱kb توالي‌های میتوکندریایی هسته‌ای (NUclear MiTochondrial (NUMTs (sequences(NUMTs) خوانده می‌شوند، پژوهش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که انتقال دی‌ان‌ای اندامک‌های سیتوپلاسمی به هسته فرآیندی مداوم است و هنوز ادامه دارد (Huang *et al.* 2004; Kleine *et al.* 2009). اغلب درج‌های پایدار توالي‌های اندامک در نواحی کروماتینی باز (Open

اما با روش Splinkerette PCR ۱۰۳۲ نوکلئوتید بعد از انتهای<sup>۵</sup> آغازگر شماره ۲۰ جداسازی شد (شکل ۵). نتایج همردیف سازی توالی‌های مجاور<sup>۳</sup> و<sup>۵</sup> با پلاس‌میدهای pCIB4421 و pChitIHygII و ژنوم برنج در شکل شش آورده شده است. برای اثبات این که آیا توالی‌های به دست آمده ردیف‌های مجاور نسخه کامل است یا مربوط به بخشی دیگر از جایگاه تراژن است از روش I-PCR استفاده شده است.

اگر این توالی‌ها بلافصله در مجاورت نسخه کامل قرار گرفته باشند پس از هضم با آنزیم برشی Bgl II و انجام پی‌سی‌آر معکوس، اندازه محصول حاصل از بسط آغازگرهای ۳ و ۲۰ باید ۱۲۶۷ جفت باز و اندازه محصول حاصل از آغازگرهای ۵ و ۱۱ باید بزرگتر از ۱۷۰۰ جفت باز باشد. نتایج I-PCR این فرضیات را تایید کرد (شکل ۷). همردیف سازی این توالی‌ها با توالي‌های حاصل از TAIL-PCR (قطعه حاصل از ترکیب آغازگرهای AD3-9 و Splinkerette PCR نشان دهنده انتظام کامل آن‌ها با یکدیگر بوده است و منجر به ردیف‌یابی ۹۷ جفت باز دیگر از انتهای<sup>۳</sup> کاست بیانی *cryIAb* شد. بنابراین قطعه حاصل از آغازگرهای (AD1-9) مربوط به بخشی دیگر از ساختار جایگاه تراژن است. با توجه به نتایج پی‌سی‌آرهای یک طرفه مشخص شد که محل شکست پلاس‌مید در نسخه کامل ۱۴۸ نوکلئوتید بعد از انتهای<sup>۵</sup> ژن مقاومت به امپی‌سیلین است (شکل ۶). سه قطعه با اندازه‌های ۲۲۱، ۱۸۱ و ۴۰ نوکلئوتید از توالي مجاور<sup>۳</sup> نقطه

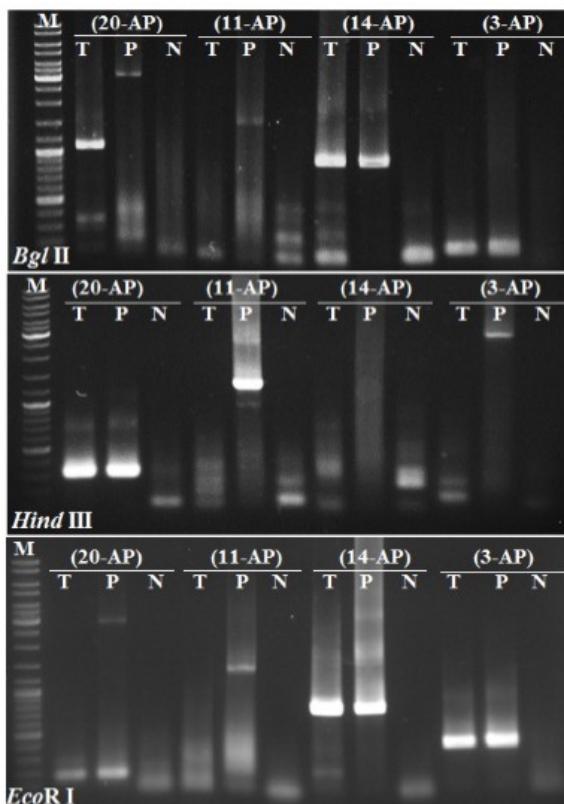
از ژنوم برنج در توالی های مجاور جداسازی شده مشاهده شد که شامل ۱۰ اتصال بین دو قطعه از تراژن (T/T) و پنج اتصال بین دی.ان.ای میزبان و تراژن (T/C) است (شکل شش). بررسی های زیادی نشان می دهد که سازوکار اولیه در شکل گیری جایگاه تراژن اتصال دو انتهای آزاد به واسطه میکروهمولوژی یا نوترکیبی های غیر معمول ((IR)(Illegitimate recombination synthesis-dependent strand) SDSA بهویژه از طریق مسیر ترمیمی annealing Gorbunova and Levy 1999; Svitashov *et al.* 2002). در توالی های مجاور کاست ژنی cry1Ab، از ده اتصال T/T، سه مورد و از پنج اتصال C/T، نیز چهار مورد شامل میکروهمولوژی بودند و در محل اتصال قطعات ۴۰ و ۱۴۸ II-وایزو مراز (شكل ۶) توالی مورد تفافق توپ-وایزو مراز (5'-GTNWAYATTNATNNG-3'، Sander and Hsieh 1985) وجود دارد. با توجه به این که توالی های مجاور ۳' جدا سازی شده مخلوطی از قطعات ناپیوسته ای از تراژن و دی.ان.ای میزبان است که از طریق IR به هم متصل شده اند، به نظر می رسد که این قسمت از جایگاه cry1Ab نتیجه مسیر ترمیمی SDSA باشد.

در تولید برنج تاریخته طارم مولایی پلاسمید pChitIHygII حامل ژن‌های هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hpt*), تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر tml و ژن کیتیناز جو تحت پیشبر اکتین و پایانبر nos، همزمان با پلاسمید pCIB4421 به گیاه منتقل شد. قطعه‌ای به طول ۸۰ نوکلئوتید در توالی مجاور<sup>۵</sup> کاست ژنی cry1Ab مطابق با توالی پایانبر tml است، این مشاهده می‌تواند یانگ تر کیم قسمت‌هایی از این دو پلاسمید را یکدیگر باشد.

بررسی توارث دو ژن *hpt* و *cryIAb* نشان داد که این دو ژن با هم به ارث می‌رسند و در نتیجه بر روی یک کروموزوم تلفیق شده‌اند (Ghareyazie *et al.* 1997). دو پلاسمید pChitIHgII و pCJB4421 دارای چند دنباله که مشتمل بر *cryIAb*، *hpt* و *lacZ* هستند.

توالی بین ژن مقاومت به امپیسیلین و پیشبر PEPC از پلاسمید pCIB4421 که در نواحی مجاور<sup>۵</sup> مشاهده شده است به طور کامل مشابه توالی های مجاور پایانبر tml در پلاسمید pChitIHvqII است.

(chromatin region) که نواحی فعال ژنوم هستند اتفاق می‌افتد، مشاهده شده است که جایگاه تلفیق تراژن‌هایی که دارای بیان بالا و پایداری هستند نیز اغلب در نواحی غنی از ژن است. بنابراین به احتمال زیاد منشا قطعه ۲۲۱ کروموزوم شماره نه است و قطعه ۱۸۱ نیز ممکن است حاصل ترکیب قطعات غیر پیوسته‌ای از یک کروموزوم و یا کروموزوم‌های مختلف همراه با بازآرایی‌های متعدد باشد. البته تفسیر این گونه مشاهدات با توجه به حضور تعداد زیاد توالی‌های میتوکندریایی هسته‌ای و بازآرایی‌هایی که طی فرآیند تلفیق رخ می‌دهد و همچنین آرایش فضایی کروماتین درون هسته در لحظه تراریزش که ممکن است بخش‌های دور از هم یک کروموزوم و یا بخش‌هایی از کروموزوم‌های مختلف در کنار هم قرار گیرند (Morikawa *et al.* 2002)، مشکل است. به عنوان مثال در یک لاین تراریخته گندم با مقایسه سیگنال‌های FISH و fiber-FISH مشاهده شد که سیگنال‌های متافاز در مرحله ایترفاراز به یکدیگر نزدیک و حتی گاهی به یک سیگنال تبدیل می‌شوند (Abranches *et al.* 2000). حضور توالی اندامک درون چایگاه تراژن در برخی گیاهان تراریخته تجاری مانند ذرت تراریخته Mon863 و خربزه درختی تراریخته واریته SUNUP نیز گزارش شده است. در ذرت تراریخته Mon863 توالی میتوکندریایی در هر دو انتهای ۵' و ۳' چایگاه تراژن وجود دارد و مشخص نشده که آیا این توالی‌ها از قبل در محل تلفیق وجود داشته و یا این که حضور آن نتیجه تراریزش است (European Food Safety Authority 2010). در خربزه درختی واریته SUNUP نیز از شش توالی مجاور (مربوط به ۳ چایگاه تراژن) پنج مورد حاوی قطعاتی از دی.ان.ای کلروپلاست هسته‌ای (Ming *et al.* 2008) بودند (NUclear Plastid DNA (NUPTs)). حضور توالی میتوکندری و کلروپلاست به ترتیب در لاین‌های تراریخته برنج (Takano *et al.* 1997) و آراییدوپسیس (Morikawa *et al.* 2002) نیز گزارش شده است. بنابراین حضور توالی اندامک درون چایگاه تراژن یک پدیده معمول است و مشکلی در ارزیابی‌های ایمنی زیستی ایجاد نمی‌کند (Council of the European communities 2004).



شکل ۵- نتایج PCR Splinkerette (T) گیاه تراریخته، (P) پلاسمید pCIB4421، (N) گیاه غیر تراریخته، (M) ladder mix از شرکت Fermentas اعداد داخل پرانتز ترکیب آغازگرهای مورد استفاده است: (AP) آغازگر ویژه سازگارساز، شماره‌های (۳، ۱۱، ۱۴ و ۲۰) مربوط به آغازگرهای اختصاصی هستند (شماره‌ها مطابق شکل ۱).

**Figure 5-** The results of Splinkerette-PCR. (T) transgenic plant, (P) pCIB4421 plasmid, (N) non transgenic plant, (M) ladder mix (Fermentas), Numbers. in parentheses indicate primers used in PCR. (AP) adaptor specific primer, numbers (3, 11, 14 and 20) are gene specific primers (numbering. according to figure 1).

پلاسمید pChitHygII باشند که به عنوان فیلتر دی.ان.ا در محل شکستگی درج شده‌اند. البته تفسیر و درک بهتر رخدادهای مشاهده شده تنها پس از توالی یابی کامل جایگاه امکان پذیر خواهد بود. (Ghareyazie 1996) ساز و کار تلفیق تراژن را در چهار لاین تراریخته برنج حاصل از تراریزش همزمان دو پلاسمید pCaII1GC و pTRA132 مورد بررسی قرار داد و با استفاده از تجزیه‌های سادرن بلات، پی.سی.آر و توالی یابی نشان داد که دو پلاسمید قبل از تلفیق با یکدیگر ترکیب می‌شوند. بررسی جایگاه تراژن در یک لاین تراریخته یولاف حاصل از تراریزش همزمان دو پلاسمید نیز نشان داد که دو پلاسمید در یک مکان تلفیق شده‌اند (Makarevitch *et al.* 2003). به طورکلی تعداد نسخه‌ی تراژن، دست نخورده‌گی (Intactness) و بازآرایی‌های مربوط به آن‌ها و چگونگی جهت‌گیری آن‌ها نسبت به هم از مهمترین

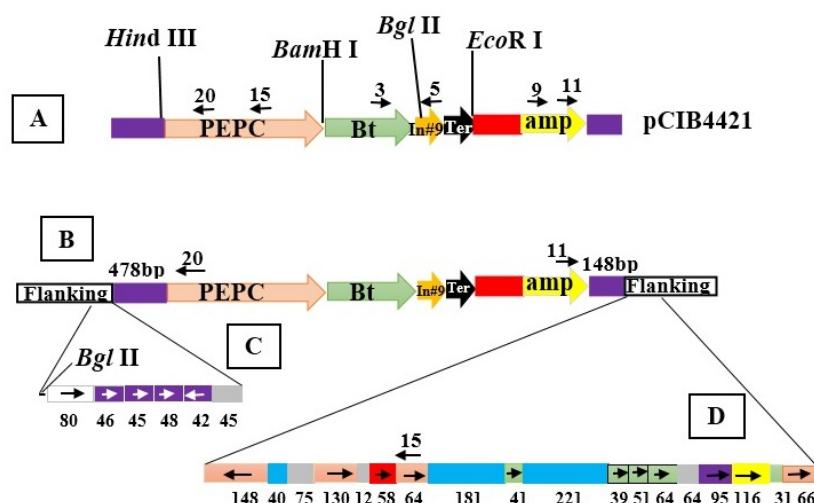
بررسی توالی مجاور<sup>۵</sup> نشان داد که از ۷۲۰ نوکلئوتیدی که بعد از انتهای<sup>۶</sup> ۳۰ آغازگر شماره ۲۰ دست نخورده باقی مانده است، ۸۷۸ نوکلئوتید متعلق به ناحیه بین ژن مقاومت به امپی‌سیلین و پیشبر PEPC است (شکل ۶) قطعه ۴۸ نوکلئوتیدی نشان داده شده در شکل شش بر روی پلاسمید pCIB4421 تنها دارای چهار نوکلئوتید فاصله با قطعه ۴۷۸ است و قطعه ۴۶ جفت بازی در شکل ۶ بر روی پلاسمید pCIB4421 به طور کامل مشابه بخشی از توالی قطعه ۴۷۸ جفت بازی است.

این نتایج را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که بین قطعات ۴۷۸ و ۴۲ بر روی پلاسمید pCIB4421 یک شکست رخ داده و دی.ان.ای تک رشته‌ای حاصل از تجزیه انتهایی به توالی همولوگوس خود در پلاسمید pChitHygII متصل شده و ترمیم شکستگی انجام شده است. بر این اساس احتمال دارد قطعات ۴۲ و ۴۵ مربوط به

باشد. بدون شک در کمپینت این سازوکارها و مسیرهای درگیر در تلفیق دی.ان.ای بیگانه می‌تواند کمک کند تا پیچیدگی ساختار جایگاه را بتوان کنترل کرد و بر نقش اثرهای محل و ساختار جایگاه بر پایداری بیان چیره شد (Huang et al.2004). بهترین روش برای شناسایی این سازوکارها و اثرهای مقایسه ساختار و محل تلفیق جایگاه‌های تراژن در گیاهان مختلف دارای بیان بالا و پایدار تراژن در نسل‌های پیشرفته با جایگاه‌های تراژن در گیاهانی که بیان مطلوب ژن را در نسل‌های اولیه از دست داده‌اند، است و در این راستا برنج تاریخته طارم مولایی می‌تواند منبع ارزشمندی برای پژوهش در زمینه درک دقیق‌تر عوامل پایداری بیان تراژن باشد.

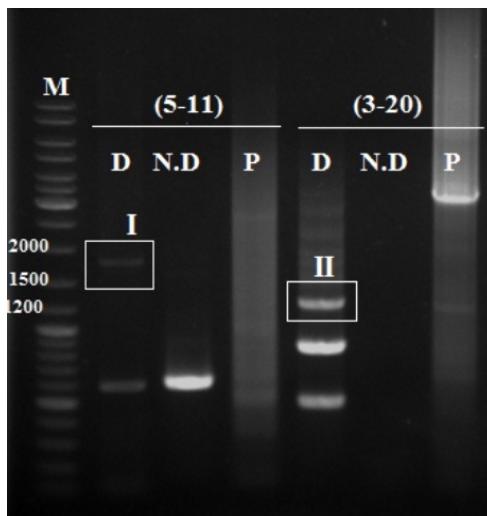
جنبهای ساختار جایگاه تراژن هستند که می‌توانند سطح بیان و پایداری آن را تحت تأثیر قرار دهند (Pecinka et al.2005; Yang et al.2005; Kohli et al.2006).

برنج تاریخته طارم مولایی در تجزیه سادرن بلات الگوی تلفیق ساده‌ای را نشان داد که شامل سه نسخه از ژن *cryIAb* بود (Ghareyazie et al.1997). حفظ بیان بالای تراژن در طی بیش از ۱۰ نسل نیز احتمال دارد در نتیجه ساختار ساده جایگاه آن باشد. بررسی بخشی از توالی‌های مجاور این جایگاه نشان می‌دهد که دارای خصوصیات مشترکی مانند حضور توالی‌های میتوکندریایی هسته‌ای با جایگاه‌های تراژن در برخی گیاهان تاریخته تجاری است و این می‌تواند تایید کننده حضور یک ساز و کار محافظت شده در سلول گیاه برای تلفیق پایدار دی.ان.ای بیگانه درون ژنوم



شکل ۶- تصویر شماتیک ساختار توالی‌های مجاور ۳' و ۵' کاست ژنی *cryIAb* pCIB4421 رنگ بنفش مربوط به ناحیه بین ژن امپیسیلین و پیشبر PEPC است. پیکان‌ها نشان دهنده آغازگرها هستند و شماره آن‌ها مطابق شکل ۱ است. (B) ساختار جایگاه *cryIAb* کامل و توالی‌های مجاور آن. (C) توالی مجاور ۵'، این قسمت به روش Splinkerette PCR ایزووله شده است. قسمت‌های مشابه با پلاسمید با رنگ‌های مشابه نشان داده شده‌اند و قسمت‌های خاکستری بخشی از توالی را نشان می‌دهند که با پلاسمیدهای pChitIHgII و ژنوم برنج همولوژی نداشته است. قطعه ۸۰ نوكلئوتیدی بخشی از پلاسمید pChitIHgII است. پیکان‌های رسم شده در داخل مستطیل‌ها نشان دهنده جهت درج توالی (مستقیم یا معکوس) و اعداد زیر هر مستطیل بیانگر تعداد نوكلئوتیدهای آن قطعه است. (D) ساختار توالی مجاور ۳'، این قسمت به روش TAIL-PCR ایزووله شده است. رنگ آبی نشان دهنده توالی ژنوم برنج است، سایر علامت‌گذاری‌ها مانند شکل C است.

**Figure 6-** Schematic of the structure of 3' and 5' flanking sequences of *cryIAb* locus. (A) Linear map of pCIB4421 plasmid, the violet color indicates region between ampR and PEPC, arrows represent primers (numbering, according to figure 1). (B) Structure of *cryIAb* locus includes intact copy and its flanking regions. (C) 5'flanking sequence, this section is isolated by splinkerette PCR; parts which are similar to plasmid are shown with same colors. The gray boxes indicated unknown sequence. 80 nucleotides fragment is a part of pChitIHgII plasmid. Arrows inside the boxes indicate orientation of transgene insertion. Numbers below each box indicate the numbers of nucleotides that fragment. (D) 3'flanking sequence, this section is isolated by TAIL-PCR, the blue color represents genomic DNA of rice, and other marks are similar to figure c.



شکل ۷- نتایج I-PCR (D) دی.ان.ای ژنومی هضم شده، (N.D) دی.ان.ای ژنومی هضم نشده، (P) پلاسمید pCIB4421 اعداد داخل پرانتز شماره آغازگرهای مورد استفاده و مطابق با شکل ۱ است. (I) تکثیر توالی مجاور ۳ کاست ژنی *cryIAb*. (II) تکثیر توالی مجاور ۵ کاست ژنی *cryIAb*

**Figure 7-** The results of I-PCR. (D) digested genomic DNA, (N.D) undigested genomic DNA, (P) pCIB4421 plasmid, Numbers in parentheses indicate the primers used in PCR. Primers are numbered according to figure 1. (I) amplification of 3' flanking sequences of *cryIAb* cassette, (II) amplification of 5' flanking sequences of *cryIAb* cassette.

#### منابع

- Abrances R, Santos AP, Wegel E; Williams S, Castilho A, Christou P, Shaw P, Stoger E. 2000.** Widely separated multiple transgene integration sites in wheat chromosomes are brought together at interphase. Plant Journal 24: 713-723.
- Assaad FF, Tucker KL, Signer ER. 1993.** Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis* Plant Molecular Biology 22: 1067-1085.
- Council of the European communities. 2004.** Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing directive. Official Journal of the European Communities 106: 1-38.
- Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H, Ow DW. 2000.** Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. Genes and Development 14: 2869-2880.
- European Food Safety Authority. 2010.** Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-RX-MON863) for renewal of the authorization for continued marketing of existing feed materials, feed additives and food additives produced from maize MON863 under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. EFSA Journal 2010 8 (03): 1562.
- Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, Palma JM, Liwanag EA, Cohen MB, Khosh GS, Bennett J. 1997.** Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cryIA*

(b) gene. Molecular Breeding 3: 401-414.

**Ghareyazie B. 1996.** Transformation of indica and other rices (*Oryza sativa* L.): genetic integration, expression, inheritance and enhanced insect resistance. Ph.D. thesis. University of the Philippines at Los Banos, Los Banos, Laguna, Philippines.

**Gorbunova V, Levy AA. 1997.** How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. Trends in Plant Science 4: 263-269.

**Huang CY, Ayliffe MA, Timmis JN. 2004.** Simple and complex nuclear loci created by newly transferred chloroplast DNA in tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101: 9710-9715.

**Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Flant T, Matzke AJ. 1997.** Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. The Plant cell 9(8): 1251-1264.

**Kleine T, Maier UG, Leister D. 2009.** DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. Annual Review of Plant Biology 60:115-138.

**Kohli A, Melendi PG, Abrances R, Capell T, Stoger E, Christou P. 2006.** The Quest to Understand the Basis and Mechanisms that Control Expression of Introduced Transgenes in Crop Plants. Plant Signaling & Behavior 1(4):185-195.

**Kohli A, Twyman RM, Abrances R, Wegel E, Stoger E, Christou P. 2003.** Transgene integration, organization and interaction in plants. Plant Molecular

- Biology 52: 274-258.
- Kumpatla SP, Hall TC.** 1999. Organization complexity of a rice transgene locus susceptible to methylation-based silencing. *Life* 48: 459-467.
- Li J, Brunner AM, Meilan R, Strauss SH.** 2008. Stability of transgenes in trees: expression of two reporter genes in poplar over three field seasons. *Tree Physiology* 29: 299-312.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF.** 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8(3): 457-463.
- Makarevitch I, Svitashov SK, Somers DA.** 2003. Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant molecular Biology* 52: 421-432.
- Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH, Senin P, Wang W, Ly BV, Lewis K, Salzberg SL, Feng L, Jones MR, Skelton RL, Murray JE, Chen C, Qian W, Shen J, Du P, Eustice M, Tong E, Tang H, Lyons E, Paull RE, Michael TP, Wall K, Rice DW, Albert H, Wang M, Zhu YJ, Schatz M, Nagarajan N, Acob RA, Guan P, Blas A, Wai CM, Ackerman CM, Ren Y, Liu C, Wang J, Wang J, Na J, Shakirov EV, Haas B, Thimmapuram J, Nelson D, Wang X, Bowers JE, Gschwend AR, Delcher AL, Singh R, Suzuki JY, Tripathi S, Neupane K, Wei H, Irikura B, Paidi M, Jiang N, Zhang W, Presting G, Windsor A, Navajas-Perez R, Torres MJ, Feltus FA, Porter B, Li Y, Burroughs AM, Luo M, Liu L, Christopher DA, Mount SM, Moore PH, Sugimura T, Jiang J, Schuler MA, Friedman V, Mitchell-Olds T, Shippen DE, Pamphilis CW, Palmer JD, Freeling M, Paterson AH, Gonsalves D, Wang L, Alam M.** 2008. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya Linnaeus*). *Nature* 452(7190):991-996.
- Morikawa H, Sakamoto A, Hokazono H, Irifune K, Takahashi M.** 2002. Mechanism of transgene integration into host genome by particle bombardment. *Plant Biotechnology* 19(4):219-228.
- Pawlowski WP, Torbert KA, Rines HW, Somers DA.** 1998. Irregular patterns of transgene silencing in allohexaploid oat. *Plant Molecular Biology* 38: 597-607.
- Pecinka A, Kato N, Meister A, Probst AV, Shubert I, Lam E.** 2005. Tandem repetitive transgenes and fluorescent chromatin tags alter local interphase chromosome arrangement in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* 118:3751-8.
- Potter CJ, Lou L.** 2010. Splinkerette-PCR for mapping transposable elements in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5: e 10168.
- Pröls F, Meyer P.** 1992. The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrid*. *Plant Journal* 2: 465-475.
- Sander M, Hsieh TS.** 1985. *Drosophila* topoisomerase II double-strand DNA cleavage: analysis of DNA sequence homology at the cleavage site. *Nucleic Acid Research* 13:1057-1072.
- Somers DA, Makarevitch I.** 2004. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? *Current Opinion in Biotechnology* 15: 126-131.
- Svitashov SK, Pawolowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA.** 2002. Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *The Plant Journal* 32: 433-445.
- Takano M, Egawa H, Ikeda JE, Wakasa K.** 1997. The structures of integration sites in transgenic rice. *The Plant Journal* 11(3): 353-361.
- Yang G, Lee Y, Jiang Y, Kumpatla SP, Hall TC.** 2005. Organization, not duplication, triggers silencing in a complex transgene locus in rice. *Plant Molecular Biology* 58:351-366.
- Zhong G.** 2001. Genetic issues and pitfalls in transgenic plant breeding. *Euphytica* 118:137-144.