

بررسی ساختار جایگاه تراژن *cry1Ab* در برنج تراریخته طارم مولایی

Study of *cry1Ab* transgene locus structure in transgenic rice (*Oryza sativa* L., cultivar Tarom Molaii)

هاجر یحیائی پور^۱، بهزاد قره یازی^{۲*}، سیداحمد سادات نوری^۳، علی ایزدی دربندی^۴ و قربانعلی نعمت زاده^۵

Hajar Yahyaiipoor¹, Behzad Ghareyazie^{2*}, S.Ahmad Sadatnoori³, Ali Izadi Darbandi⁴ and

Ghorban Ali Nemat Zade⁵

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

ردیف مجاور تراژن
ایمنی زیستی
برنج تراریخته
cry1Ab

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 *cry1Ab* در برنج تراریخته طارم مولایی، ساختار جایگاه آن مشخص شود. برنج تراریخته طارم مولایی که از تراریزش همزمان دو پلاسمید pCIB4421 و pChitIHygII 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 ۳' و ۵' ژن مقاومت به امپی‌سیلین، انتهای ۳' ژن *cry1Ab* و انتهای ۵' 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 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 ۳' 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 pCIB4421 و pChitIHygII 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 ناپوسته‌ای از توالی پلاسمیدهای منتقل شده است.

مقدمه

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 تراریخته حاصل از یک آزمایش مشابه در هر دو سیستم متداول انتقال ژن (بمباران ذره‌ای و انتقال به کمک اگروباکتریوم) رخدادی معمول است (Day et al.2000). پژوهشگران باید جمعیت بزرگی از گیاهان تراریخته 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 تراریخته‌هایی با بیان ناپایدار مرحله‌ای ضروری در پروژه انتقال ژن است (Kohli et al.2003) خصوصیات دی.ان.ای ژنومی مجاور تراژن می‌تواند روی بیان آن اثر بگذارد. بررسی‌ها بر روی پتونی و توتون تراریخته نشان داد وجود توالی‌های پروکاریوتی، ریزوماهواره‌های غنی از GA، بقایای رتروالمنت و توالی‌های تکراری پشت سر هم (tandem repeat array) در توالی ژنومی مجاور، عناصر اولیه در خاموشی تراژن هستند (Pröls and Meyer 1997; Iglesias 1992). در مقابل حضور MARها (Matrix attachment regions) در مجاورت جایگاه تراژن (Transgene locus) با برخی تلفیق‌های دارای بیان پایدار مرتبط بود (Iglesias et al.1997) تجزیه مولکولی ساختار محل تلفیق در برنج‌های تراریخته 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 تراریخته‌های حاصل از یک آزمایش مشابه، از نظر اندازه و

پیچیدگی متفاوت هستند. ساختار جایگاه به‌ویژه در انتقال مستقیم از یک نسخه‌ی 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 به‌طور معمول جایگاه‌هایی با ساختار ساده بیان پایداری دارند، هر چه سازماندهی ساختار جایگاه پیچیده‌تر باشد احتمال بیان مطلوب آن طی نسل‌های آینده کاهش می‌یابد (Svitashev 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 آرابیدوپسیس و برنج تراریخته 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 and Hall 1999). بررسی ساختار جایگاه تراژن و سازماندهی آن به 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 (Svitashev et Somers and Makarevitch 2004). در این بررسی سعی شده است تا با جداسازی ردیف مجاور محل تلفیق تراژن *cry1Ab* در برنج تراریخته طارم مولایی، ساختار جایگاه آن به‌عنوان یک جایگاه دارای الگوی تلفیق ساده با بیان پایدار و عملکرد عالی طی چندین نسل مشخص شود. این برنج تراریخته به روش زیست پرتابی و با انتقال همزمان دو پلاسمید pCIB4421 ناقل ژن *cry1Ab* و پلاسمید pChitIHygII ناقل ژن نشانگر هیگرومایسین فسفوترانسفراز تولید شد. تجزیه سادرین این گیاه نشان دهنده الگوی تلفیق ساده و بررسی نحوه‌ی توارث ژن *cry1Ab* 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 تراریخته است.

تراژن وارد شده نباید روی بیان ژنهای میزبان اثر منفی داشته باشد، چون جایگاه تلفیق تراژن در روشهای رایج امروزی نمی تواند از قبل تعیین شود و از آنجا که تلفیقهای پایدار و مطلوب در نواحی غنی از ژن رخ می دهند 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 می آورد.

مواد و روشها

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

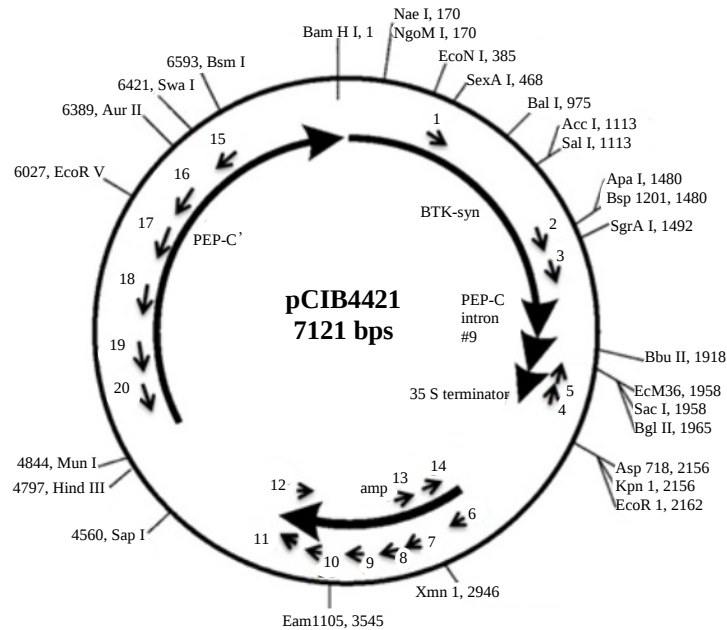
شکست پلاسמיד از پی.سی.آر استاندارد با الگوی دی.ان.ای پلاسמיד pCIB4421 و گیاه تراریخته و مقایسه الگوهای بانندی به دست آمده استفاده شد. برای انجام پی.سی.آر آغازگرهایی از انتهای ۳' ژن *cryIAb* (Bt)، انتهای ۳' و ۵' ژن مقاومت به امپی سیلین (*amp*) و انتهای ۵' پیشبر PEPC طراحی شد (شکل ۱). توالی آغازگرها در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

برنامه پی.سی.آر شامل واسرشته سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه (یک چرخه) و ۳۵ چرخه شامل واسرشته 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 بازای 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.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 1- sequences of primers used in this study

شماره آغازگر در شکل ۱	توالی sequence	شماره آغازگر در شکل ۱	توالی sequence
1	GGCGGCGAGAGGATCGAGAC Forward	13	CCGCTGTTGAGATCCAGTTC Reverse
2	ACCCCTTCAACTTCAGCAAC Forward	14	CACCCAAGTATCTTCAGCA Reverse
3	GCAACGAGGTGTACATCGAC Forward	15	GAAGAGAGAGGTGGATTTGG Reverse
4	AAACCAGCAACTCACTGCAC Reverse	16	CCTATCCACTCTGCTATGTGTTC Reverse
5	TGGTTCCTGATCGATGACTG Reverse	17	GTTCTTGCAAGTGTATCTATCCAG Reverse
6	GCCTTCCTGTTTTGCTCAC Forward	18	GGTCTGTTTGTCTGTTTCTCTG Reverse
7	GCTTTTTTGCACAACATGGGGG Forward	19	GTTTACAGTGGATAAAGTACAACAG Reverse
8	TGAATGAAGCCATACCAAACGAC Forward	20	CTCACAACAGTTTGAAGTAAACGAC Reverse
9	CAATTAATAGACTGGATGGAGGC Forward	-	(A/T/ C/G)TCGA(C/G)T(A/T)T(C/G)G(A/T)GTT AD1
10	GATAAATCTGGAGCCGGTGAG Forward	-	(A/T/C/G)GTCGA(C/G)(A/T)GA(A/T/C/G)A(A/T)GAA AD2
11	ATGGTAAGCCCTCCCGTATC Forward	-	(A/T)GTG(A/T/C/G)AG(A/T)A(A/T/C/G)CA(A/T/C/G)GA AD3
12	ATACGGGAGGGCTTACCATC Reverse		



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 ۵۰ برابر رقیق 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 درصد استفاده شد و محصول مرحله دوم و سوم در کنار هم بارگذاری شد.

روش انجام Splinkerette PCR

مراحل انجام این روش شامل اتصال الیگونوکلوئوتیدهای سازگار ساز، هضم آنزیمی، اتصال سازگار ساز 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 *Hind III* و *EcoR I* بود که هر یک از این آنزیم‌ها 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 Thermal Asymmetric Interlaced PCR) و Splinkerette 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 آغازگرها بر روی شکل یک با شماره‌های (۷، ۸ و ۹) و (۱۶، ۱۷ و ۱۸) نشان داده شده است. آغازگرهای تصادفی اختیاری (AD3، AD2 and AD1) براساس مقاله لیو و همکاران (Liu *et al.* 1995) 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 ۱x، ۱/۵ میلی-مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی-مولار مخلوط dNTP، ۰/۲ میکرومولار آغازگر اختصاصی خارجی (۷ یا ۱۹ در شکل ۱)، ۲/۵ میکرومولار از یکی از آغازگرهای AD، یک واحد آنزیم دی.ان.ای پلیمرز Taq (سیناژن) و ۲۰ نانوگرم دی.ان.ای ژنومی در حجم نهایی ۲۰ 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 *Eco*R I به عنوان کنترل داخلی جهت اطمینان از صحت انجام واکنش استفاده شد. فاصله این آغازگرها تا محل شناسایی آنزیم‌های بررسی 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 ۳ و از آغازگرهای (۱۹ و ۲۰) در تکثیر ناحیه مجاور ۵ کاست ژنی *cry1Ab* استفاده شد. از آغازگرهای (۱۳ و ۱۴)

رشته بالایی سازگار

5-GATCCCACTAGTGTGCGACACCAGTCTC

3-GGTGATCACAGCTGTGGTCAGAGTAAGTCGGTGCCAGAGGATCGTTGCCAATGAGAAGC-5

رشته پایینی سازگار

3-CCAGAGAGGATCGTTGCCAATGAGAAGC-5

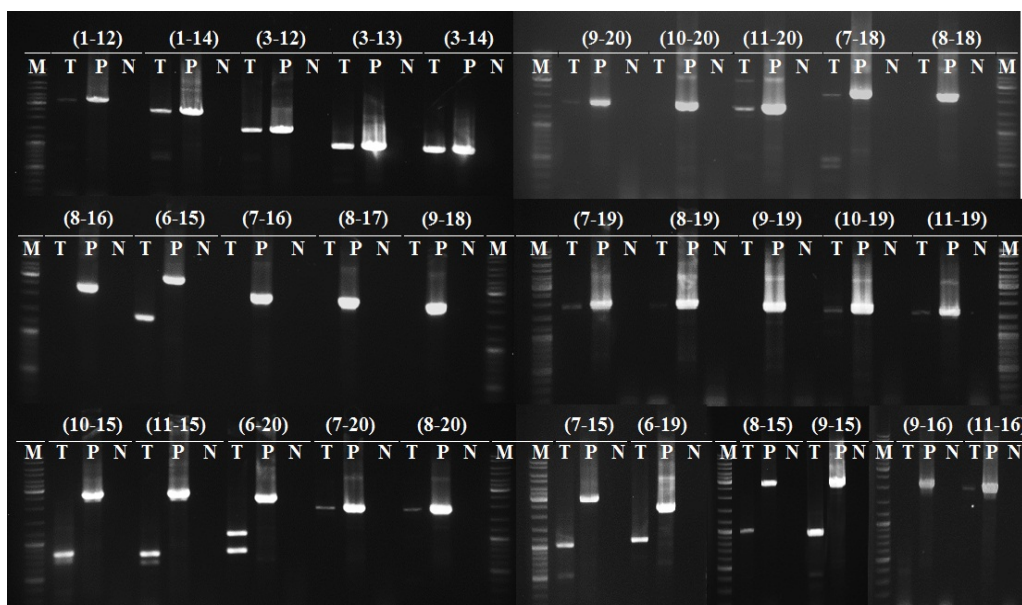
3-CAGCTGTGGTCAGAGTAAGTCGGTG-5

آغازگر ۲

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 sequence of its specific primers



شکل ۳- الگوی تکثیر ناحیه بین ژن‌های *cry1Ab* و مقاومت به امپی سیلین و ناحیه بین ژن مقاومت به امپی سیلین و پیشبر PEPC، (T) گیاه تراریخته، (P) پلاسمید pCIB4421، (N) گیاه غیر تراریخته، (M) ladder mix از شرکت 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 *cry1Ab* 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، pChitIHygII و توالی ژنوم برنج با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) انجام شد.

نتایج و بحث

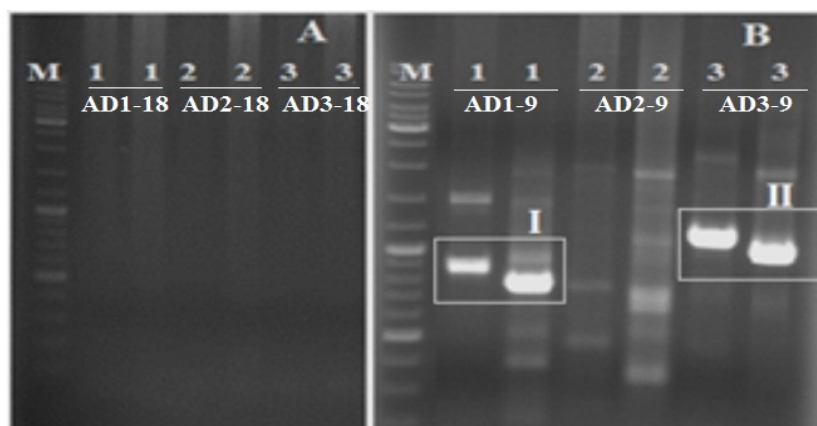
تکثیر ناحیه بین ژن‌های *cry1Ab* و امپی‌سیلین روی پلاسمید و گیاه تراریخته با استفاده از پنج ترکیب آغازگری انجام شد و در همه‌ی موارد اندازه قطعات تکثیر شده روی پلاسمید و گیاه تراریخته به طور کامل یکسان و مطابق با فاصله بین دو آغازگر پیشرو و برگشتی مورد استفاده بر روی پلاسمید بود (شکل ۳). این مشاهده بیانگر 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 تراریخته کوچک‌تر از اندازه مورد نظر بود و در هشت مورد دیگر این ناحیه بر روی گیاه تراریخته 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 ۳ 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 هم‌ردیف سازی آن‌ها با توالی پلاسمیدهای منتقل شده و ژنوم برنج انجام شد. با طراحی آغازگر از انتهای توالی حاصل از (AD3-9) و تکثیر مجدد ردیف‌های کناری با روش TAIL-PCR، ۹۰۰ نوکلئوتید در ادامه توالی قبلی ردیف‌یابی شد.

در جدا سازی نواحی مجاور ۵ کاست ژنی *cry1Ab* از ترکیب آغازگر 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.

روش انجام پی.سی.آر معکوس ((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 دی.ان.ای ژنومی با ۳۰ واحد آنزیم برشی در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس برای اتصال درون مولکولی مقدار ۵۰ نانوگرم از دی.ان.ای هضم شده با ۵ واحد آنزیم T4 دی.ان.ای 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 پی.سی.آر مرحله اول از ترکیب آغازگرهای خارجی (۱۰-۴) برای تکثیر نواحی مجاور انتهای ۳' و (۱۹-۲) برای تکثیر نواحی مجاور انتهای ۵' استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر پی.سی.آر با غلظت نهایی ۱x، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار مخلوط dNTP، ۰/۲ میکرومولار از هر یک از آغازگرها، ۱ واحد آنزیم دی.ان.ای پلیمراز Taq (سیناژن) و ۲۰ نانوگرم از دی.ان.ای حلقوی شده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. پی.سی.آر 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 آغازگرها) 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 پی.سی.آر و اجزای واکنش در این مرحله به جز آغازگرها مانند مرحله اول بود. ترکیب آغازگرهای داخلی (۲۰-۳) و (۱۱-۵) در این مرحله به ترتیب جایگزین ترکیبات (۱۹-۲) و (۱۰-۴) مورد استفاده در مرحله اول شدند.

جدا سازی و خالص سازی قطعات انتخاب شده از روی ژل با استفاده از کیت خالص سازی high pure PCR product purification (Roche Applied Science, Germany) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و پس از همسانه سازی در ناقل 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 ۵'، (B) تکثیر ناحیه مجاور انتهای ۳'، دو شماره مشابه در کنار هم نشان دهنده محصول مرحله دوم و سوم است. (M) ladder mix از شرکت 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 ژنی *cry1Ab*، با ژنوم برنج همولوژی نشان دادند. قطعه ۲۲۱ نوکلئوتیدی با دو قسمت مجزا از ژنوم میتوکندری برنج (موقعیت‌های: 341813-1422900-NC_011033: 1422900-423121, 341813-342034) 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 ۱۸۱ دارای ۹۹ درصد تطابق با ژنوم میتوکندری (موقعیت: 336174-335993-NC_011033.1) است، همچنین ۷۴ نوکلئوتید ابتدای همین قطعه دارای ۹۶ درصد تطابق با بخشی از کروموزوم شماره چهار (موقعیت: 34148722-34148799-NC_008397.2) است. قطعه ۴۰ نوکلئوتیدی نیز مشابه توالی ژنوم میتوکندری است. با توجه به این‌که ژن *cry1Ab* با نسبت ۳:۱ (۳: 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 از دی.ان.ای میتوکندری در ژنوم هسته‌ای برنج پراکنده است که به‌عنوان توالی‌های میتوکندریایی هسته‌ای (NUMTs (sequences (NUMTs)) Nuclear Mitochondrial) خوانده می‌شوند، پژوهش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که انتقال دی.ان.ای اندامک‌های سیتوپلاسمی به هسته فرآیندی مداوم است و هنوز ادامه دارد (Huang et al.2004; Kleine et al.2009). اغلب درج‌های پایدار توالی‌های اندامک در نواحی کروماتینی باز (Open

اما با روش Splinkerette PCR، ۱۰۳۲ نوکلئوتید بعد از انتهای ۵' آغازگر شماره ۲۰ جداسازی شد (شکل ۵). نتایج هم‌ردیف سازی توالی‌های مجاور ۳' و ۵' با پلاسמידهای pCIB4421 و pChitIHygII و ژنوم برنج در شکل شش آورده شده است. برای اثبات این‌که آیا توالی‌های به‌دست 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 بلافاصله در مجاورت نسخه کامل قرار گرفته باشند پس از هضم با آنزیم برشی Bgl II و انجام پی.سی.آر 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 توالی‌های حاصل از TAIL-PCR (قطعه حاصل از ترکیب آغازگرهای AD3-9 و Splinkerette PCR نشان دهنده انطباق کامل آن‌ها با یکدیگر بوده است و منجر به ردیف‌یابی ۹۷ جفت باز دیگر از انتهای ۳' کاست بیانی *cry1Ab* شد. بنابراین قطعه حاصل از آغازگرهای (AD1-9) مربوط به بخشی دیگر از ساختار جایگاه تراژن است. با توجه به نتایج پی.سی.آرهای یک‌طرفه مشخص شد که محل شکست پلاسמיד در نسخه کامل ۱۴۸ نوکلئوتید بعد از انتهای ۵' ژن مقاومت به امپی‌سیلین است (شکل ۶). سه قطعه با اندازه‌های ۲۲۱، ۱۸۱ و ۴۰ نوکلئوتید از توالی مجاور ۳' نقطه

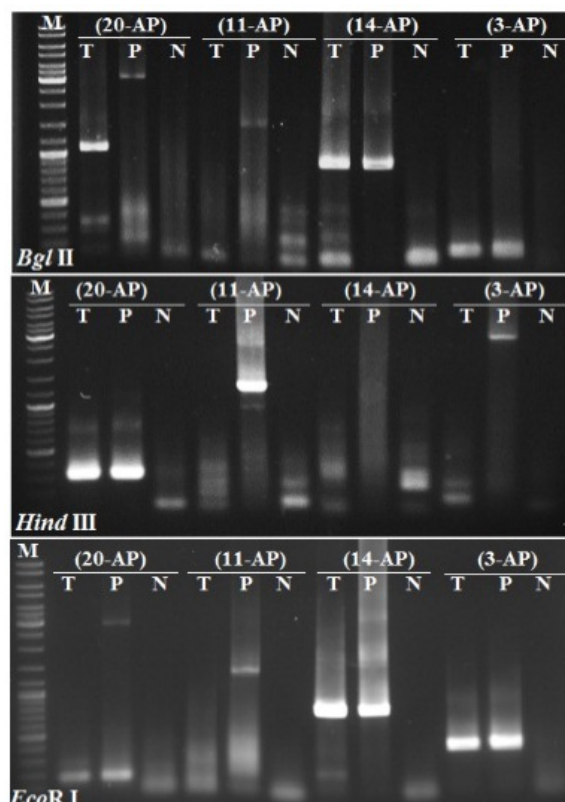
chromatin region) که نواحی فعال ژنوم هستند اتفاق می افتد، مشاهده شده است که جایگاه تلفیق تراژن هایی که دارای بیان بالا و پایداری هستند نیز اغلب در نواحی غنی از ژن است. بنابراین به احتمال زیاد منشا قطعه ۲۲۱ کروموزوم شماره نه است و قطعه ۱۸۱ نیز ممکن است حاصل ترکیب قطعات غیر پیوسته ای از یک کروموزوم و یا کروموزوم های مختلف همراه با بازآرایی های متعدد باشد. البته تفسیر این گونه مشاهدات باتوجه به حضور تعداد زیاد توالی های میتوکندریایی هسته ای و بازآرایی هایی که طی فرآیند تلفیق رخ می دهد و همچنین آرایش فضایی کروماتین درون هسته در لحظه تراریزش که ممکن است بخش های دور از هم یک کروموزوم و یا بخش هایی از کروموزوم های مختلف در کنار هم قرار گیرند (Morikawa et al. 2002)، مشکل است. به عنوان مثال در یک لاین تراریخته گندم با مقایسه سیگنال های FISH و fiber-FISH مشاهده شد که سیگنال های متافاز در مرحله ایتترفاز به یکدیگر نزدیک و حتی گاهی به یک سیگنال تبدیل می شوند (Abranches et al. 2000). حضور توالی اندامک درون جایگاه 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' جایگاه تراژن وجود دارد و مشخص نشده که آیا این توالی ها 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 جایگاه تراژن) پنج مورد حاوی قطعاتی از دی.ان.ای کلروپلاست هسته ای (Nuclear Plastid DNA (NUPTs)) بودند (Ming et al. 2008). حضور توالی میتوکندری و کلروپلاست به ترتیب در لاین های تراریخته برنج (Takano et al. 1997) و آراییدوپسیس (Morikawa et al. 2002) نیز گزارش شده است. بنابراین حضور توالی اندامک درون جایگاه تراژن یک پدیده معمول است و مشکلی در ارزیابی های ایمنی زیستی ایجاد نمی کند (Council of the European communities 2004). در مجموع ۱۷ قطعه از قسمت های مختلف پلاسמיד و سه قطعه

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 نو ترکیبی های غیر معمول ((IR (Illegitimate recombination)، به ویژه از طریق مسیر ترمیمی SDSA (synthesis-dependent strand annealing) است (Gorbunova and Levy 1999; Svtashev et al. 2002). در توالی های مجاور کاست ژنی *cry1Ab*، از ده اتصال T/T، سه مورد و از پنج اتصال T/C، نیز چهار مورد شامل میکروهمولوژی بودند و در محل اتصال قطعات ۴۰ و ۱۴۸ (شکل ۶) توالی مورد توافق توپوایزومراز II (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 تراریخته طارم مولایی پلاسמיד pChitIHygII حامل ژن های هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hpt*)، تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر tml و ژن کیتیناز جو تحت پیشبر اکین و پایانبر nos همزمان با پلاسמיד pCIB4421 به گیاه منتقل شد. قطعه ای به طول ۸۰ نوکلئوتید در توالی مجاور ۵' کاست ژنی *cry1Ab* مطابق با توالی پایانبر tml است، این مشاهده می تواند بیانگر ترکیب قسمت هایی از این دو پلاسמיד با یکدیگر باشد.

بررسی توارث دو ژن *cry1Ab* و *hpt* نشان داد که این دو ژن با هم به ارث می رسند و در نتیجه بر روی یک کروموزوم تلفیق شده اند (Ghareyazie et al. 1997). دو پلاسמיד pChitIHygII و pCIB4421 دارای حدود ۲/۶ kb توالی مشترک هستند.

توالی بین ژن مقاومت به امپی سیلین و پیشبر PEPC از پلاسמיד pCIB4421 که در نواحی مجاور ۵' مشاهده شده است به طور کامل مشابه توالی های مجاور پایانبر tml در پلاسמיד pChitIHygII است.



شکل ۵- نتایج Splinkerette PCR. (T) گیاه تواریخته، (P) پلاسمید pCIB4421، (N) گیاه غیر تواریخته، (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).

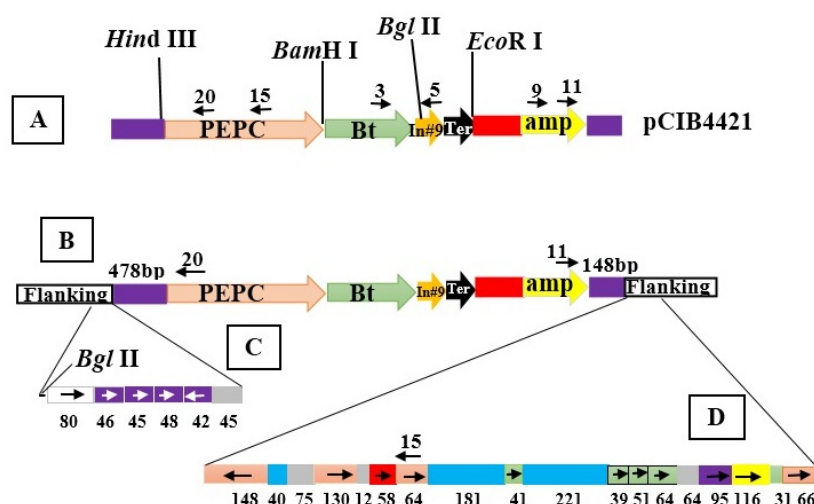
پلاسمید pChitHygII باشند که به‌عنوان فیلر دی.ان.ا در محل شکستگی درج شده‌اند. البته تفسیر و درک بهتر رخدادهای مشاهده شده تنها پس از توالی‌یابی کامل جایگاه امکان پذیر خواهد بود. (Ghareyazie 1996) ساز و کار تلفیق تراژن را در چهار لاین تواریخته برنج حاصل از تراریزش هم‌زمان دو پلاسمید pTRA132 و pCa1GC مورد بررسی قرار داد و با استفاده از تجزیه‌های سادرن بلات، پی.سی.آر و توالی‌یابی نشان داد که دو پلاسمید قبل از تلفیق با یکدیگر ترکیب می‌شوند. بررسی جایگاه تراژن در یک لاین تواریخته یولاف حاصل از تراریزش هم‌زمان دو پلاسمید نیز نشان داد که دو پلاسمید در یک مکان تلفیق شده‌اند (Makarevitch et al. 2003). به‌طورکلی تعداد نسخه‌ی تراژن، دست نخوردگی (Intactness) و بازآرایی‌های مربوط به آن‌ها و چگونگی جهت‌گیری آن‌ها نسبت به هم از مهمترین

بررسی توالی مجاور ۵' نشان داد که از ۷۲۰ نوکلئوتیدی که بعد از انتهای ۳' آغازگر شماره ۲۰ دست نخورده باقی مانده است، ۴۷۸ نوکلئوتید متعلق به ناحیه بین ژن مقاومت به امپی‌سیلین و پیشر 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

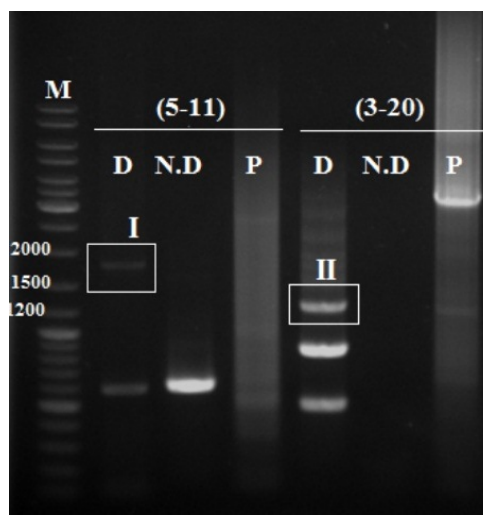
باشد. بدون شک درک بیشتر این سازوکارها و مسیرهای درگیر در تلفیق دی.ان.ای بیگانه می تواند کمک کند تا پیچیدگی ساختار جایگاه را بتوان کنترل کرد و بر نقش اثرهای محل و ساختار جایگاه بر پایداری بیان چیره شد (Huang et al.2004). بهترین روش برای شناسایی این سازوکارها و اثرها، مقایسه ساختار و محل تلفیق جایگاه های تراژن در گیاهان مختلف دارای بیان بالا و پایدار تراژن در نسل های پیشرفته با جایگاه های تراژن در گیاهانی که بیان مطلوب ژن را در نسل های اولیه از دست داده اند، است و در این راستا برنج تراریخته طارم مولایی می تواند منبع ارزشمندی برای پژوهش در زمینه درک دقیق تر عوامل پایداری بیان تراژن باشد.

جنبه های ساختار جایگاه تراژن هستند که می توانند سطح بیان و پایداری آن را تحت تأثیر قرار دهند (Pecinka et al.2005; Yang et al.2006; Kohli et al.2006). برنج تراریخته طارم مولایی در تجزیه سادرن بلات الگوی تلفیق ساده ای را نشان داد که شامل سه نسخه از ژن *cry1Ab* 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 توالی های مجاور این جایگاه نشان می دهد که دارای خصوصیات مشترکی مانند حضور توالی های میتوکندریایی هسته ای با جایگاه های تراژن در برخی گیاهان تراریخته تجاری است و این می تواند 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 توالی های مجاور ۳' و ۵' کاست ژنی *cry1Ab*. (A) ساختار خطی پلاسمید pCIB4421، رنگ بنفش مربوط به ناحیه بین ژن امپی سیلین و پیشبر PEPC است. پیکان ها نشان دهنده آغازگرها هستند و شماره آن ها مطابق شکل ۱ است. (B) ساختار جایگاه *cry1Ab*، شامل نسخه کامل و توالی های مجاور آن. (C) توالی مجاور ۵'، این قسمت به روش Splinkerette PCR ایزوله شده است. قسمت های مشابه با پلاسمید با رنگ های مشابه نشان داده شده اند و قسمت های خاکستری بخشی از توالی را نشان می دهد که با پلاسمیدهای pCIB4421، pChitIHygII و ژنوم برنج همولوژی نداشته است. قطعه ۸۰ نوکلئوتیدی بخشی از پلاسمید pChitIHygII است. پیکان های رسم شده در داخل مستطیل ها نشان دهنده جهت درج توالی (مستقیم یا معکوس) و اعداد زیر هر مستطیل بیانگر تعداد نوکلئوتیدهای آن قطعه است. (D) ساختار توالی مجاور ۳'، این قسمت به روش TAIL-PCR ایزوله شده است. رنگ آبی نشان دهنده توالی ژنوم برنج است، سایر علامت گذاری ها مانند شکل C است.

Figure 6- Schematic of the structure of 3' and 5' flanking sequences of *cry1Ab* 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 *cry1Ab* 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 pChitIHygII 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 *cry1Ab*، (II) تکثیر توالی مجاور ۵' کاست ژنی *cry1Ab*.

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 *cry1Ab* cassette, (II) amplification of 5' flanking sequences of *cry1Ab* cassette.

منابع

Abranches 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, Abranches 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, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P. 2003. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular*

Biology 52: 274-258.

Kumapla 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, Svitashv 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.

Svitashv 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, Kumapla 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.