مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳
صفحه ٦٦-٥٥

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 یحیائی‌پور[۱]، بهزاد قره‌یاضی[۲*]، سیداحمدسادات نوری[۳]، علی ایزدی‌دربندی[٤] و قربانعلی نعمت‌زاده[٥]

Hajar Yahyaiipoor [1], Behzad Ghareyazie [2*], S.Ahmad Sadatnoori [3], Ali Izadi Darbandi [4] and Ghorban Ali Nemat Zade [5]

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

٤- دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

٥- 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: ۹۳/۲/٦ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱٥)

چکیده

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 ´٥ ژن مقاومت به امپی‌سیلین، انتهای ´۳ ژن *cry1Ab* و انتهای ´٥ 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. ردیف‌یابی قطعات تکثیر شده و بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که محل شکست در نسخه‌ی کامل ۱٤۸ نوکلئوتید بعد از انتهای ´۳ ژن مقاومت به امپی‌سیلین است و ۱٤۹٦ 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 ناپیوسته‌ای از توالی پلاسمیدهای منتقل شده است.

واژه‌های کلیدی

ردیف مجاور تراژن
ایمنی زیستی
برنج تراریخته
cry1Ab

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]

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.اِی ژنومی مجاور تراژن می‌تواند روی بیان آن اثر بگذارد. بررسی‌ها بر روی پتونیا و توتون تراریخته نشان داد وجود توالی‌های پروکاریوتی، ریزماهواره‌های 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 1992; Iglesias 1997). 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 تکراهای 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 به‌طورمعمول 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.اِی 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 al*.2002; 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 سادرن 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]

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.اِ و تعیین حدود محل وقوع نوترکیبی بین پلاسمید pCIB4421 با ژنوم برنج

دی.ان.اِی ژنومی از بافت برگ گیاهان تراریخته و شاهد به روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) استخراج شد و به منظور تعیین محل شکست پلاسمید از پی.سی.آر استاندارد با الگوی دی.ان.اِی پلاسمید pCIB4421 و گیاه تراریخته و مقایسه الگوهای باندی به‌دست آمده استفاده شد. برای انجام پی.سی.آر آغازگرهایی از انتهای ´۳ ژن (*Bt*) *cry1Ab*، انتهای ´۳ و ´۵ ژن مقاومت به امپی‌سیلین (*amp*) و انتهای ´۵ پیشبر PEPC طراحی شد (شکل ۱). توالی آغازگرها در جدول یک آورده شده است.

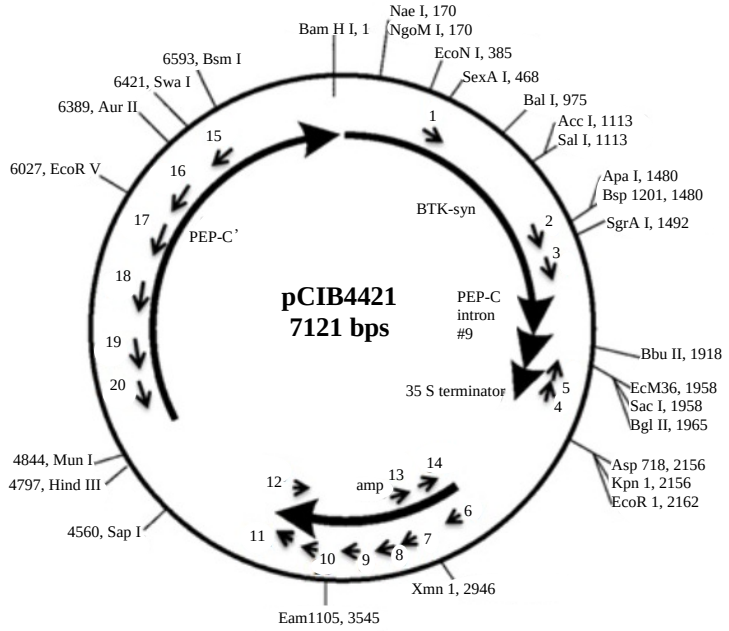
برنامه پی.سی.آر شامل واسرشته سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه (یک چرخه) و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت یک دقیقه در ۹۴ درجه، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای مناسب بسته به دمای ذوب دو آغازگر مورد استفاده و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه بازای هر یک کیلو جفت باز از اندازه محصول مورد نظر و در 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 **Primer number in figure 1**	توالی **sequence**	شماره آغازگر در شکل ۱ **Primer number in figure 1**	توالی **Sequence**
1	GGCGGCGAGAGGATCGAGAC Forward	13	CCGCTGTTGAGATCCAGTTC Reverse
2	ACCCCCTTCAACTTCAGCAAC Forward	14	CACCCAACTGATCTTCAGCA Reverse
3	GCAACGAGGTGTACATCGAC Forward	15	GAAGAGAGAGGTGGATTTGG Reverse
4	AAACCAGCAACTCACTGCAC Reverse	16	CCTATCCACTCTGCTATGTGTTC Reverse
5	TGGTTCCTGATCGATGACTG Reverse	17	GTTCTTGCAGTTGATCTATTCCAG Reverse
6	GCCTTCCTGTTTTTGCTCAC Forward	18	GGTCTGTTTGTTCTGTTTTCCTG Reverse
7	GCTTTTTTGCACAACATGGGGG Forward	19	GTTTACAGTGGATAACTCACAACAG Reverse
8	TGAATGAAGCCATACCAAACGAC Forward	20	CTCACAACAGTTTGAACTAAACGAC 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		

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]



شکل ۱– موقعیت تقریبی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر بر روی پلاسمیدpCIB4421

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

تکثیر نواحی مجاور محل تلفیق

برای جداسازی ردیف مجاور محل تلفیق از دو روش پی.سی.آر یک‌طرفه 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 به‌صورت 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 1x، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار 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.اِ پلیمراز Taq (سیناژن) و ۲۰ نانوگرم دی.ان.اِی ژنومی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. اجزای واکنش مرحله دوم و سوم مانند 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 این‌که ۵۰ برابر رقیق شد به‌عنوان الگو در واکنش مرحله دوم مورد استفاده قرار گرفت و به همین ترتیب محصول مرحله دو به‌عنوان 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.

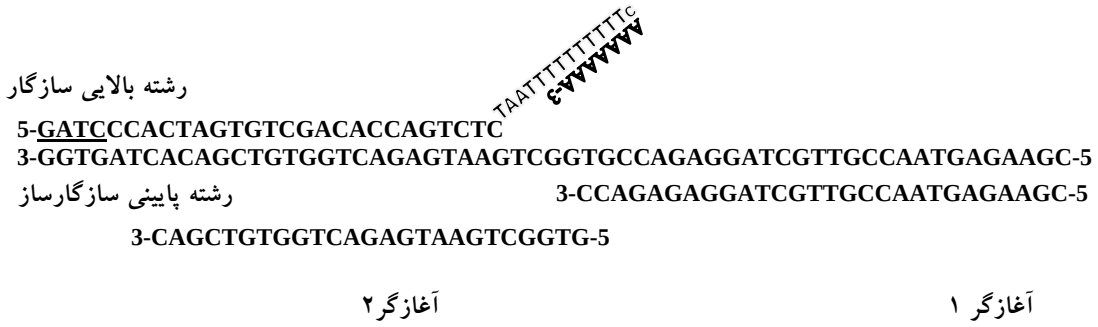
روش انجام Splinkerette PCR

مراحل انجام این روش شامل اتصال الیگونوکلئوتیدهای سازگار ساز، هضم آنزیمی، اتصال سازگارساز به قطعات دی.ان.اِی 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 آنزیم‌ها دارای یک جایگاه شناسایی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

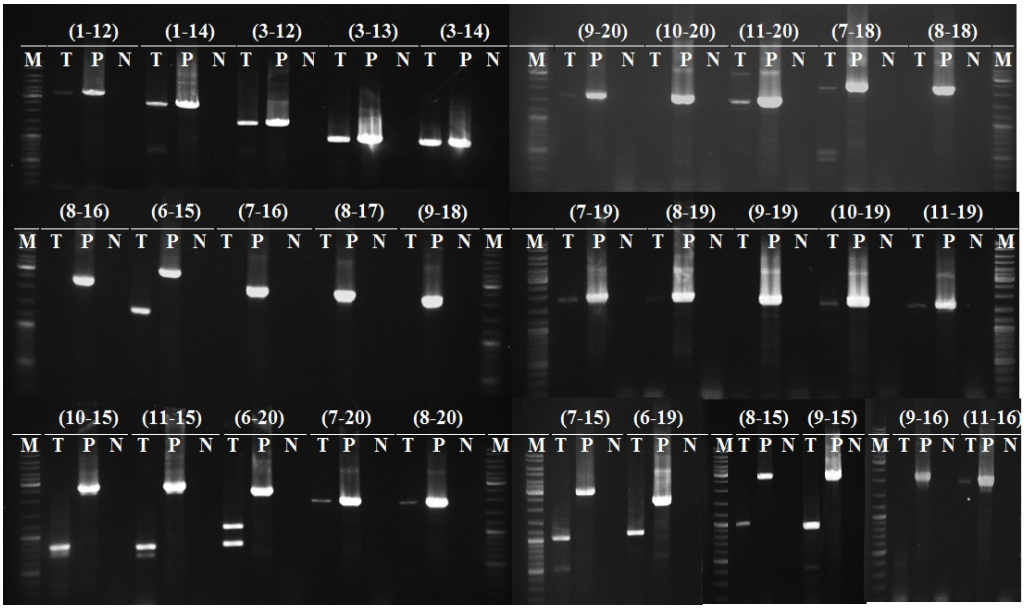
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]

بـر روی پلاسـمید pCIB4421 بودنـد (شـکل ۱). دو آغـازگر اختصاصی به‌صورت داخلی از دو سـمت ناحیـه احتمـالی ادغـام پلاسمید طراحی شد. از آغازگرهـای (۱۰ و ۱۱) در جـدا سـازی تـوالی مجـاور ´۳ و از آغازگرهـای (۱۹ و ۲۰) در تکثیـر ناحیـه مجاور ´۵ کاست ژنی *cry1Ab* استفاده شد. از آغازگرهـای (۱۳ و ۱٤) در هضم با آنزیم *Bgl* II، آغازگرهای (۱۹ و ۲۰) در هضم بـا آنزیم *Hind* III و آغازگرهای (۲ و ۳) و (۱۳ و ۱٤) در هضـم بـا آنزیم *EcoR* I به‌عنوان کنتـرل داخلـی جهـت اطمینـان از صـحت انجام واکنش استفاده شد. فاصله این آغازگرها تا محـل شناسـایی آنزیم‌های برشی مورد استفاده مشخص بود.



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

Figure 2- structure and sequense of Splinkerette unit and sequense of its specific primes



شکل ۳- الگوی تکثیر ناحیه بین ژن‌های *cry1Ab* و مقاوت به امپی‌سیلین و ناحیه بین ژن مقاومت به امپی‌سیلین 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]

روش انجام پی.سی.آر معکوس ((Inverse PCR)I-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 (٤ و ٥)، (١٠ و ١١)، (٢ و ٣) و (١٩ و ٢٠)، در واکنش‌های تکثیر اول و دوم استفاده شد. مقدار ٥ میکروگرم از دی.ان.اِی ژنومی با ٣٠ واحد آنزیم برشی در حجم نهایی ٥٠ میکرولیتر مخلوط شده و به مدت ١٦ ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس برای اتصال درون مولکولی مقدار ٥٠ نانوگرم از دی.ان.اِی هضم شده با ٥ واحد آنزیم T4 دی.ان.اِ لیگاز (Fermentas) در حجم نهایی ٥٠ میکرولیتر مخلوط شده و به مدت ده دقیقه در ٢٢ درجه نگهداری شد و واکنش در ٧٠ درجه به مدت پنج دقیقه متوقف شد. در پی.سی.آر مرحله اول از ترکیب آغازگرهای خارجی (١٠-٤) برای تکثیر نواحی مجاور انتهای ´٣ و (١٩-٢) برای تکثیر نواحی مجاور انتهای ´٥ استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر پی.سی.آر با غلظت نهایی 1x، ١/٥ میلی مولار $MgCl_2$، ٠/٢ میلی‌مولار مخلوط dNTP، ٠/٢ میکرومولار از هر یک از آغازگرها، ١ واحد آنزیم دی.ان.اِ پلیمراز Taq (سیناژن) و ٢٠ نانوگرم از دی.ان.اِی حلقوی شده در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر بود. پی.سی.آر طبق برنامه پنج دقیقه در ٩٤ درجه (یک چرخه) و در ادامه ٣٥ چرخه شامل یک دقیقه در ٩٤ درجه، ٣٠ ثانیه در ٥٦ درجه (برای هر دو ترکیب آغازگرها) و چهار دقیقه در ٧٢ درجه و در نهایت ٥ دقیقه در دمای ٧٢ درجه (یک چرخه) بود. یک میکرولیتر از محصول مرحله اول به‌عنوان الگو در واکنش مرحله دوم استفاده شد. برنامه‌ی زمانی پی.سی.آر و اجزای واکنش در این مرحله به‌جز آغازگرها مانند مرحله اول بود. ترکیب آغازگرهای داخلی (٢٠-٣) و (١١-٥) در این مرحله به ترتیب جایگزین ترکیبات (١٩-٢) و (١٠-٤) 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) 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 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

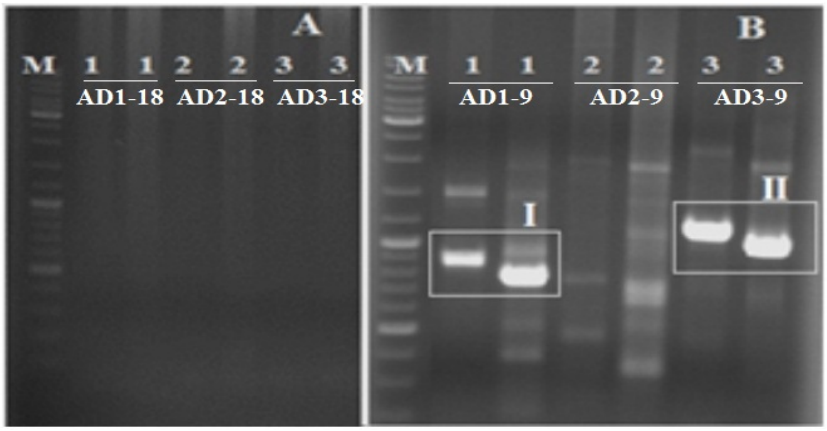
تکثیر ناحیه بین ژن‌های *cry1Ab* و امپی‌سیلین روی پلاسمید و گیاه تراریخته با استفاده از پنج ترکیب آغازگری انجام شد و در همه‌ی موارد اندازه قطعات تکثیر شده روی پلاسمید و گیاه تراریخته به طور کامل یکسان و مطابق با فاصله بین دو آغازگر پیشرو و برگشتی مورد استفاده بر روی پلاسمید بود (شکل ٣). این مشاهده بیانگر 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 ٢٦ 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 (شکل٣). 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 ´٣ محل شکست پلاسمید دو تکثیر صحیح حاصل از آغازگرهای (AD1-9) و (AD3-9) با اندازه‌های ٧٠٠ و ١٠٠٠ جفت باز (به ترتیب شماره I و II در شکل چهار) به‌دست 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، ٩٠٠ نوکلئوتید در ادامه توالی قبلی ردیف‌یابی شد.

در جدا سازی نواحی مجاور ´٥ کاست ژنی *cry1Ab*، از ترکیب آغازگز ١٨ 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]



شکل ٤- نتایج حاصل از TAIL-PCR، (A) تکثیر ناحیه مجاور انتهای '٥، (B) تکثیر ناحیه مجاور انتهای '٣، 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)

اما با روش Splinkerette PCR، ۱۰۳۲ نوکلئوتید بعد از انتهای ´٥ آغازگر شماره ۲۰ جداسازی شد (شکل ٥). نتایج هم‌ردیف سازی توالی‌های مجاور ´٣ و ´٥ با پلاسمیدهای 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 ۱۲٦۷ جفت باز و اندازه محصول حاصل از آغازگرهای ٥ 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 ´٣ 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 پلاسمید در نسخه کامل ۱٤۸ نوکلئوتید بعد از انتهای '٥ ژن مقاومت به امپی‌سیلین است (شکل ٦). سه قطعه با اندازه‌های ۲۲۱، ۱۸۱ و ٤۰ نوکلئوتید از توالی مجاور ´٣ نقطه شکست کاست ژنی *cry1Ab*، با ژنوم برنج همولوژی نشان دادند. قطعه ۲۲۱ نوکلئوتیدی با دو قسمت مجزا از ژنوم میتوکندری برنج (موقعیت‌های: 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: NC_008402.2: 5271486-5271707) است. قطعه ۱۸۱ دارای ۹۹ درصد تطابق با ژنوم میتوکندری (موقعیت: NC_011033.1: 336174-335993) است، همچنین ۷٤ نوکلئوتید ابتدای همین قطعه دارای ۹٦ درصد تطابق با بخشی از کروموزوم شماره چهار (موقعیت: NC_008397.2: 34148722-34148799) است. قطعه ٤۰ 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.اِی میتوکندری در ژنوم هسته‌ای برنج پراکنده است که به‌عنوان توالی‌های میتوکندریایی هسته‌ای ((NUclear MiTochondrial sequences(NUMTs) NUMTs) خوانده می‌شوند، پژوهش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که انتقال دی.ان.اِی 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]

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 این‌گونه مشاهدات باتوجه 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. به‌عنوان مثال در یک لاین تراریخته گندم با مقایسه سیگنال‌های FISH و fiber-FISH مشاهده شد که سیگنال‌های متافاز در مرحله اینترفاز به یکدیگر نزدیک و حتی گاهی به یک سیگنال تبدیل می‌شوند (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 توالی‌ها از قبل در محل تلفیق وجود داشته و یا این‌که 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.اِی کلروپلاست هسته‌ای (NUclear Plastid DNA (NUPTs)) بودند (Ming *et al*.2008). حضور توالی میتوکندری و کلروپلاست به ترتیب در لاین‌های تراریخته برنج (Takano *et al*.1997) و آرابیدوپسیس (Morikawa *et al*.2002) نیز گزارش شده است. بنابراین حضور توالی اندامک درون جایگاه تراژن یک پدیده معمول است و مشکلی در ارزیابی‌های ایمنی زیستی ایجاد نمی‌کند (Council of the European communities 2004).

در مجموع ۱۷ قطعه از قسمت‌های مختلف پلاسمید و سه قطعه از ژنوم برنج در توالی‌های مجاور جداسازی شده مشاهده شد که شامل ۱۰ اتصال بین دو قطعه از تراژن (T/T) و پنج اتصال بین دی.ان.اِی میزبان و تراژن (T/C) است (شکل شش). بررسی‌های زیادی نشان می‌دهد که سازوکار اولیه در شکل‌گیری جایگاه تراژن اتصال دو انتهای آزاد به واسطه میکروهمولوژی یا نوترکیبی‌های غیر معمول ((IR(Illegitimate recombination) ، به‌ویژه از طریق مسیر ترمیمی SDSA (synthesis-dependent strand annealing) است (Gorbunova and Levy 1999; Svitashev *et al*.2002). در توالی‌های 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 ٤٠ و ١٤٨ (شکل ٦) توالی مورد توافق توپوایزومرازII (5´-GTNWAYATTNATNNG-3´, Sander and Hsieh 1985) وجود دارد. با توجه به این‌که توالی‌های مجاور ´۳ جدا سازی شده مخلوطی از قطعات ناپیوسته‌ای از تراژن و دی.ان.اِی میزبان است که از طریق IR به هم متصل شده‌اند، به نظر می‌رسد که این قسمت از جایگاه *cry1Ab* نتیجه مسیر ترمیمی SDSA باشد.

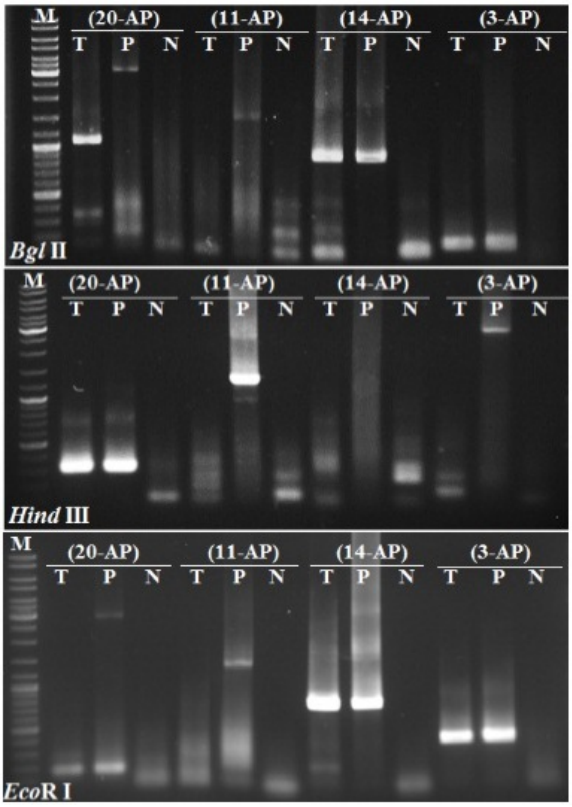
در تولید برنج تراریخته طارم مولایی پلاسمید pChitIHygII حامل ژن‌های هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hpt*)، تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر tml و ژن کیتیناز جو تحت پیشبر اکتین و پایانبر nos، همزمان با پلاسمید pCIB4421 به گیاه منتقل شد. قطعه‌ای به طول ۸۰ نوکلئوتید در توالی مجاور ´۵ کاست ژنی *cry1Ab* مطابق با توالی پایانبر tml است، این مشاهده می‌تواند بیانگر ترکیب قسمت‌هایی از این دو پلاسمید با یکدیگر باشد.

بررسی توارث دو ژن *cry1Ab* و *hpt* 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 pChitIHygII و pCIB4421 دارای حدود ۲/٦kb توالی مشترک هستند.

توالی بین ژن مقاومت به امپی‌سیلین و پیشبر PEPC از پلاسمید pCIB4421 که در نواحی مجاور ´۵ مشاهده شده است به طور کامل مشابه توالی‌های مجاور پایانبر tml در پلاسمید pChitIHygII است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]



شکل ۵- نتایج Splinkerette PCR، (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، ۱٤ 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).

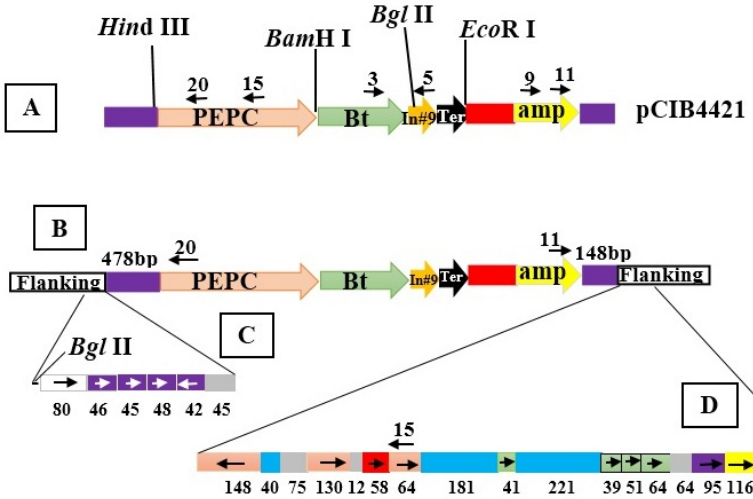
بررسی توالی مجاور ´۵ نشان داد که از ۷۲۰ نوکلئوتیدی کـه بعـد از انتهای ´۳ آغازگر شماره ۲۰ دست نخورده بـاقی مانـده اسـت، ٤۷۸ نوکلئوتید متعلق به ناحیه بین ژن مقاومت بـه امپـی‌سـیلین و پیشبر PEPC است (شـکل ٦) قطعـه ٤۸ نوکلئوتیـدی نشـان داده شده در شکل شش بر روی پلاسمید pCIB4421 تنها دارای چهار نوکلئوتید فاصله با قطعه ٤۷۸ است و قطعـه ٤٦ جفـت بـازی در شکل ٦ بر روی پلاسمید pCIB4421 به طور کامل مشابه بخشـی از توالی قطعه ٤۷۸ جفت بازی است.

این نتایج را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که بین قطعات ٤۷۸ و ٤۲ بر روی پلاسمید pCIB4421 یـک شکسـت رخ داده و دی.ان.اِی تک رشته‌ای حاصل از تجزیه انتهایی به توالی همولوگـوس خـود در پلاسمید pChitIHygII متصل شده و تـرمیم شکسـتگی انجـام شده است. بر این اساس احتمال دارد قطعات ٤۲ و ٤۵ مربوط بـه پلاسمید pChitHygII باشند که بـه‌عنـوان فیلـر دی.ان.اِ در محـل شکسـتگی درج شـده‌انـد. البتـه تفسـیر و درک بهتـر رخـدادهای مشاهده شده تنها پس از توالی یـابی کامـل جایگـاه امکـان پـذیر خواهد بود. (Ghareyazie 1996) ساز و کـار تلفیـق تـراژن را در چهار لاین تراریخته برنج حاصل از تراریزش هم‌زمان دو پلاسمید pTRA132 و pCaI1GC مورد بررسـی قـرار داد و بـا اسـتفاده از تجزیه‌های سادرن بلات، پی.سی.آر و توالی‌یابی نشـان داد کـه دو پلاسمید قبل از تلفیق با یکدیگر ترکیب می‌شوند. بررسی جایگـاه تراژن در یک لاین تراریخته یولاف حاصل از تراریـزش همزمـان دو پلاسمید نیز نشان داد کـه دو پلاسـمید در یـک مکـان تلفیـق شده‌اند (Makarevitch *et al*.2003). به‌طورکلـی تعـداد نسـخه‌ی تراژن، دست نخوردگی (Intactness) و بازآرایی‌های مربـوط بـه آن‌ها و چگونگی جهت‌گیـری آن‌هـا نسـبت بـه هـم از مهمتـرین

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]

جنبه‌های 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).

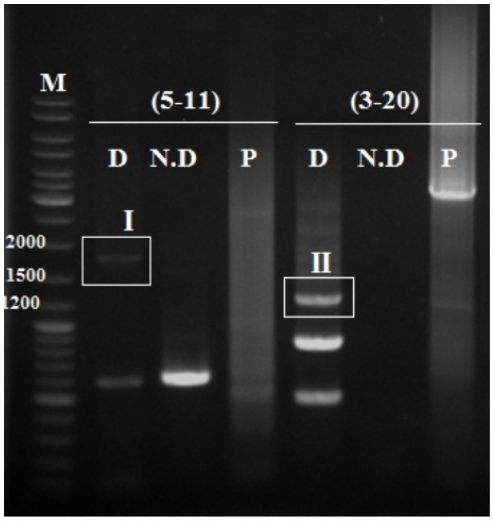
برنج تراریخته طارم مولایی در تجزیه سادرن بلات الگوی تلفیق ساده‌ای را نشان داد که شامل سه نسخه از ژن *cry1Ab* بود (Ghareyazie *et al*.1997). حفظ بیان بالای تراژن در طی بیش از ۱۰ نسل نیز احتمال دارد در نتیجه ساختار ساده جایگاه آن باشد. بررسی بخشی از توالی‌های مجاور این جایگاه نشان می‌دهد که دارای خصوصیات مشترکی مانند حضور توالی‌های میتوکندریایی هسته‌ای با جایگاه‌های تراژن در برخی گیاهان تراریخته تجاری است و این می‌تواند تایید کننده حضور یک ساز و کار محافظت شده در سلول گیاه برای تلفیق پایدار دی.ان.اِی بیگانه درون ژنوم باشد. بدون شک درک بیشتر این سازوکارها و مسیرهای درگیر در تلفیق دی.ان.اِی 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 اثرها، 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 تراریخته طارم مولایی می‌تواند منبع ارزشمندی برای پژوهش در زمینه درک دقیق‌تر عوامل پایدارای بیان تراژن باشد.



شکل ٦- تصویر شماتیک ساختار توالی‌های مجاور ´۳و ´۵ کاست ژنی *cry1Ab*، (A) ساختار خطی پلاسمید 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 *cry1Ab*، شامل نسخه کامل و توالی‌های مجاور آن. (C) توالی مجاور '۵، این قسمت به روش Splinkerette PCR ایزوله شده است. قسمت‌های مشابه با پلاسمید با رنگ‌های مشابه نشان داده شده‌اند و قسمت‌های خاکستری بخشی از توالی را نشان می‌دهد که با پلاسمیدهای pCIB4421، pChitIHygII و ژنوم برنج همولوژی نداشته است. قطعه ۸۰ نوکلئوتیدی بخشی از پلاسمید pChitIHygII است. پیکان‌های رسم شده در داخل مستطیل‌ها 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 علامت‌گذاری‌ها 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]



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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]

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, Svitashev 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.
Svitashev 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.6.7]