

بررسی افزایش بیان ژن *BnFUL* در گیاهان تراریخته کلزا

سمیرا کهک^۱، علی محمد شکیب^{۲*}، جلال صبا^۳، سیامک اسدی^۴، مانا احمد راجی^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه زنجان

۲- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۳- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۴ و ۵- به ترتیب کارشناس ارشد و کارشناس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a_shakib@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

کلزا
گیاه تراریخته
بیان ژن *BnFUL*
تعداد نسخه
ریزش دانه

کلزا یکی از گیاهان مهم روغنی است که در سال‌های اخیر کشت آن در ایران توسعه زیادی پیدا کرده است. یکی از مشکلات کلزا ریزش دانه قبل و در حین برداشت است که بسته به شرایط آب و هوایی می‌تواند تا ۵۰ درصد باعث کاهش محصول شود. تولید گیاهان متحمل به ریزش دانه می‌تواند موجب افزایش عملکرد شود. عوامل ژنتیک و محیطی متعددی بر روی این صفت اثر دارند. از جمله عوامل ژنتیک وجود ژن *FUL* در این گیاهان است که افزایش بیان آن می‌تواند مانع از باز شدن غلاف و ریزش دانه شود. ژن *FUL* که از کلزا رقم Quantum جداسازی و به سه رقم مختلف گیاهان تراریخته کلزا انتقال داده شده بود در این پژوهش استفاده شد. بررسی‌های مولکولی روی گیاهان تراریخته در نسل T_2 با استفاده از آزمون‌های پی‌سی‌آر، لکه‌گذاری سادرن و Real Time-PCR انجام گرفت. آزمون پی‌سی‌آر نشان داد که علاوه بر ژن داخلی گیاه، تراژن *BnFUL* نیز در گیاهان تراریخته وجود دارد. آزمون لکه‌گذاری سادرن نشان داد که در گیاهان تراریخته حداقل یک نسخه از تراژن وجود دارد. آزمون Real Time-PCR نشان داد که بیان ژن *BnFUL* در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافته است. همچنین سطح بیان این ژن در لاین‌های مختلف نیز اختلاف نشان دادند. بخشی از این تفاوت در بیان می‌تواند ناشی از تعداد نسخه‌های مختلف تراژن و یا اثرهای محل ورود تراژن در ژنوم باشد.

روغن گیاهی یکی از کالاهای مصرفی در سبد غذایی مردم است. کلزا یک گیاه مهم روغنی است و در میان گیاهان روغنی مقام دوم را به خود اختصاص داده است (MacLeod and Ogilvy, 1982). کلزا^۱ گیاهی متعلق به خانواده براسیکاسه^۲، یکساله و خودگشن با حدود ۳۰ درصد دگرگشتی است. گیاهان خانواده براسیکاسه به طور معمول دانه‌های خود را به وسیله سازوکار شکستن غلاف پراکنده می‌کنند. اگرچه باز شدن غلاف یک سازوکار مفید برای پراکندگی دانه‌ها در طبیعت است، اما یکی از مشکلات مهم زراعت کلزا است. در صورتی که برداشت به تاخیر بیافتد ریزش دانه می‌تواند تا ۵۰ درصد عملکرد محصول را کاهش دهد (Child and Evans, 1989; Prince et al., 1996). علاوه بر این، دانه‌های کلزای ریخته شده، بر روی زمین باقی می‌مانند و در تناوب با گیاه بعدی به عنوان علف هرز باعث ایجاد مشکلاتی می‌شوند (Gulden et al., 2003). باز شدن غلاف از نظر ریخت‌شناسی^۳ به شکل منطقه شکوفایی وابسته است. منطقه شکوفایی شامل یک لایه‌ی چند سلولی است که دیواره میانی^۴ را از مرز پریکارپ^۵ پوشش غلاف جدا می‌سازد، (شکل ۱) (Wang et al., 2007). در گیاه آراییدوپسیس تعدادی ژن شناسایی شده‌اند که در شکل‌گیری و تنظیم منطقه باز شدن غلاف شرکت دارند (Gu et al., 1998; Lillegren et al., 2000; Dinneny and Yanofsky, 2005). ژن‌های مشابه به احتمال زیاد در نمو غلاف و مقاومت به ریزش دانه در کلزا نیز شرکت دارند زیرا که شباهت‌های زیادی بین نمو و ساختار غلاف در کلزا و آراییدوپسیس وجود دارد (Spence et al., 1996; Roberts et al., 2002). این ژن‌ها شامل *FUL*، *SHP1*، *SHP2*، *IND*، *ALC* و *RPL* هستند. بعضی از این ژن‌ها با اثر بر روی منطقه شکوفایی باعث تشدید ریزش دانه می‌شوند. که ژن‌های *SHP1*، *SHP2*، *IND* و *ALC* از این جمله هستند. در مقابل ژن‌های *FUL* و *RPL* با اثر بر روی سلول‌های منطقه شکوفایی باعث کاهش ریزش دانه

- 1- *Brassica napus* L.
- 2- Brassicaceae
- 3- morphology
- 4- replum
- 5- valve margin

می‌شوند (Dinneny and Yanofsky, 2005). ژن *FUL* متعلق به خانواده ژنی *MADS-box* است که برای انبساط و تمایز پوسته‌های میوه پس از باروری مورد نیاز است. افزایش بیان تراژن *FUL* در گیاه *Brassica juncea* باعث کاهش توسعه ناحیه حاشیه پوسته غلاف شده که می‌تواند برای کاهش ریزش دانه استفاده شود (Ostergaard et al., 2006). در این پژوهش بیان ژن *BnFUL* پس از انتقال به گیاهان کلزا مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخته

ژن *BnFUL* قبلاً از کلزا رقم Quantum جداسازی (Seifi and Shakib, 2005) و به روش انتقال توسط اگروباکتریوم و با استفاده از ناقل پلاسمیدی pABAS204 حاوی ژن *BnFUL* به گیاهان کلزا از سه رقم *Okapi*، *Licord* و *RGS003* منتقل شد (Asadi, 2008).

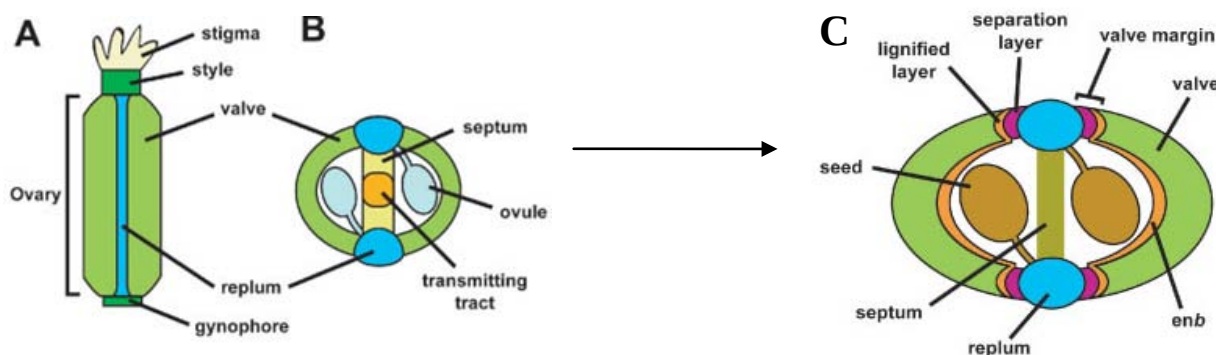
کشت گیاهان تراریخته

این پژوهش در سال ۹۰-۱۳۸۹ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران^۶ انجام گرفت. بذور گیاهان تراریخته نسل T₂ کلزا از رقم *Okapi*، *Licord* و *RGS003* حاوی تراژن *BnFUL* به همراه گیاهان شاهد غیرتراریخته در گلخانه کشت شدند. در مرحله پنج برگی گیاهان ارقام پاییزه (*Okapi*، *Licord*) برای سرمادهی به مدت دو ماه به فیتوترون با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از آن برای ادامه رشد در شرایط کنترل شده داخل گلخانه قرار گرفتند.

استخراج دی‌اوکسی‌نوکلئیک اسید (دی.ان.ای) ژنومی

نمونه‌برداری از برگ گیاهان تراریخته و شاهد (غیرتراریخته) انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله پس از جدا کردن از گیاه در ازت مایع قرار گرفتند. سپس برگ‌ها در هاون استریل با استفاده از ازت مایع پودر شدند. استخراج دی.ان.ای به روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۹۸) انجام گرفت. کیفیت و کمیت دی.ان.ای‌های استخراج

6- Agricultural Biotechnology Institute of Iran (ABRII)



شکل ۱- شماتیک غلاف و قسمت‌های مختلف آن

A- ساختار بیرونی غلاف. B- برش عرضی غلاف. C- برش عرضی غلاف بالغ (Dinneny and Yanofsky, 2004).

Figure 1- Schematic view of pod.

A-Exterior structure of pod. B- Transverse cross section of pod. C- Transverse cross section of mature pod (Dinneny and Yanofsky, 2004)..

گرفتند، سپس در هاون استریل با استفاده از ازت مایع پودر شدند. استخراج آر.ان.ای کل از گیاهان فوق با استفاده از RNasy Mini Kit شرکت QIAGEN انجام گرفت. به منظور اطمینان از کیفیت و کمیت آر.ان.ای استخراج شده، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrop 2000) خوانده شد. آر.ان.ای‌های استخراج شده بوسیله بارگذاری در ژل آگارز نیز تعیین کیفیت شدند. آر.ان.ای‌ها با آنزیم DNase I تیمار شدند. ساخت cDNA با استفاده از کیت (BIO-RAD, iScript cDNA synthesis kit) انجام گرفت.

آزمون Real Time-PCR

بیان ژن مورد نظر توسط Real Time-PCR در سه تکرار آزمایشی با استفاده از کیت (BIO-RAD, iQ Syber Green Supermix) و دستگاه (iCycler iQ realtime-PCR, Bio-Rad) بررسی شد. درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول کیت به همراه یک میکرولیتر از هر آغازگر و یک میکرولیتر cDNA و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر ریخته شد. ابتدا جهت آزمون Real Time-PCR منحنی‌های استاندارد رسم شد. بر این اساس و با استفاده از آغازگرهای ژن *BnFUL* و آغازگرهای ژن گلیسرول ۳- فسفات دهیدروژناز *GAPDH*^۷ (با توالی

شده، بوسیله بارگذاری در ژل آگارز و با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrop 2000) تعیین شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (آزمون پی.سی.آر)

آزمون پی.سی.آر با استفاده از دی.ان.ای‌های استخراج شده و آغازگرهای اختصاصی ژن *BnFUL* که کمترین اختصاصیت را با ژن‌های خانواده MADS-box دارا هستند (با توالی
F:AAGATAGAGAGATGGGAAG
(R:CGCGAGGTAACCCAATCAACGACGATGTAC
انجام گرفت.

آزمون لکه‌گذاری سادرن

برای این منظور دی.ان.ای‌ها توسط آنزیم *Hind* III به مدت یک شب مورد هضم قرار گرفتند و سپس در ژل آگارز یک درصد بارگذاری شدند. مراحل انتقال به غشا، شستشو و رنگ‌آمیزی با استفاده از دستورالعمل سمبروک و راسل (۲۰۰۱) انجام گرفت.

استخراج ریبونوکلیک اسید (آر.ان.ای) و ساخت دی.ان.ای مکمل (cDNA)

نمونه‌برداری از غلاف، ۴ هفته پس از گرده‌افشانی انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله پس از جدا کردن از گیاه در ازت مایع قرار

7- Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

پروژه‌های ایجاد گیاهان تراریخته لاین‌های حاوی تک نسخه تراژن مطلوب هستند تا در نسل‌های بعدی از ثبات ژنتیکی بهتری برخوردار باشند این موضوع می‌تواند در ادامه این بررسی مورد توجه قرار گیرد.

نمودارهای ذوب آزمون Real Time-PCR نشان دادند که آغازگرهای ژن‌های *BnFUL* و *GAPDH* به صورت اختصاصی عمل کرده‌اند زیرا که در نمودارهای ذوب برای هر ژن یک نقطه اوج اختصاصی مشاهده می‌شود و نمودارهای تکثیر نشان دادند که میزان بیان در نمونه‌های مختلف متفاوت است. به طور کلی نتایج آزمون Real Time-PCR نشان داد که بیان ژن *BnFUL* در گیاهان تراریخته از هر سه رقم نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است. در گیاهان تراریخته رقم Licord بیشترین افزایش بیان مشاهده می‌شود و گیاهان تراریخته رقم‌های Okapi و RGS003 به ترتیب پس از Licord مقام‌های دوم و سوم را دارند (شکل ۹). این نتایج نشان می‌دهد که حضور نسخه‌ی یا نسخه‌های جدیدی از ژن *BnFUL* در گیاه کلزا باعث افزایش بیان این ژن شده و با توجه به گزارش استرگارد و همکاران در سال ۲۰۰۶ می‌تواند در کاهش ریزش دانه موثر باشد.

اثر تعداد نسخه تراژن بر سطح بیان ژن پیچیده است. هرچند انتظار می‌رود که افزایش تعداد نسخه ژن باعث افزایش بیان شود، اما به تجربه دیده می‌شود که گاهی تعداد نسخه‌های زیاد باعث هم‌فروشناسی^۹ و خاموشی ژن^{۱۰} می‌شود (Vaucheret et al., 1998). تعداد نسخه تراژن می‌تواند به طور مثبت یا منفی با میزان بیان تراژن ارتباط داشته باشد (Hobbs et al., 1993). در برخی موارد، یک نسخه منفرد از تراژن می‌تواند خاموش شود (Elmayan et al., 1996). به طور کلی، فرض می‌شود که انتخاب گیاهان با تعداد نسخه کمتر پدیده هم‌فروشناسی ژن را کاهش خواهد داد (Dai et al., 2001). دایی و همکاران در سال ۲۰۰۱ بیان کردند که گیاهان برنج تراریخته‌ای که تعداد نسخه‌های زیادتری از تراژن را داشتند سطح فعالیت ژن گاس^{۱۱} کمتری داشتند و پیشنهاد کردند که بیان کم ژن ممکن است به خاطر مکانیسم خاموشی ژن باشد (Dai et al., 2001).

9- co-suppression
10- gene silencing
11- GUS activity

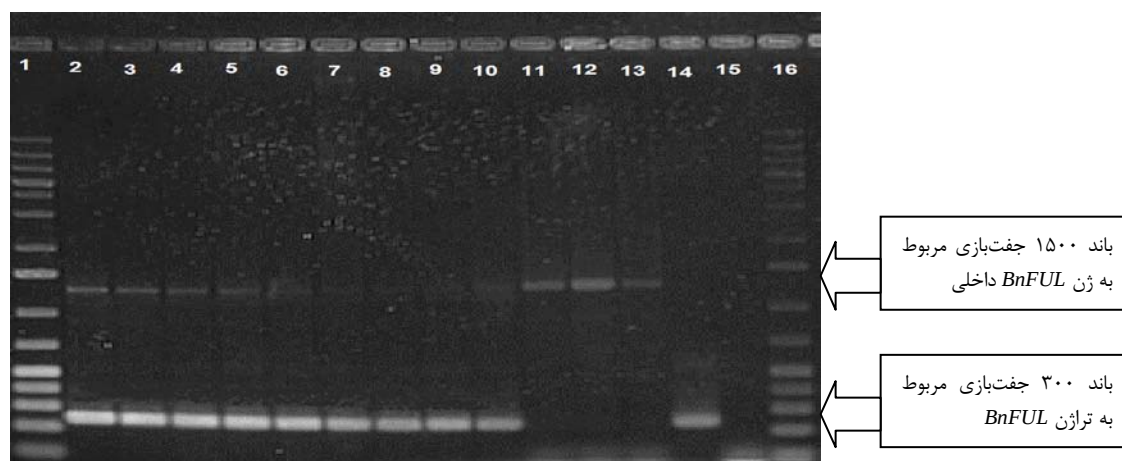
و F:AGAGCCGCTTCCTTCTTCAACATCAT
به عنوان ژن (R:TGGGCACACGGAAGGACATACC)
خانه‌دار^۸ نمودارهای تکثیر و ذوب رسم شدند و آزمون سطح بیان ژن انجام گرفت. میزان بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak et al., 2001) محاسبه شد. در این روش، همه داده‌ها با حدود آستانه ژن *GAPDH* نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد (غیرتراریخته) سنجیده شد.

نتایج و بحث

بررسی گیاهان تراریخته فرضی با استفاده از آزمون پی.سی.آر، حضور تراژن در گیاهان تراریخته از هر سه رقم را تایید کرد. با توجه به شکل ۲ دو سری باند مشاهده می‌شود، یکسری باند که در تمام گیاهان (اعم از تراریخته و شاهد) مشاهده می‌شود مربوط به ژن *BnFUL* داخلی گیاه است که به دلیل حضور ایترون‌ها قطعه بزرگ‌تری را نسبت به ژن *BnFUL* وارد شده به گیاهان تراریخته دارد و سری دوم که کوچکتر است قطعه تکثیری ژن وارد شده به گیاهان تراریخته (تراژن) است. قطعه تکثیری اول مربوط به ژن داخلی گیاه در گیاهان تراریخته و شاهد قابل مشاهده است در صورتی که در پلاسמיד مشاهده نمی‌شود. قطعه تکثیری دوم مربوط به ژن وارد شده به گیاهان تراریخته است که در گیاهان تراریخته و پلاسמיד قابل مشاهده است. قابل ذکر است که اندازه قطعه تکثیری ژن داخلی در گیاهان شاهد و تراریخته یکسان است و اندازه قطعه تکثیری ژن وارد شده در گیاهان تراریخته و پلاسמיד یکسان است (شکل ۲). این نتایج نشان می‌دهند که گیاهان تراریخته علاوه بر ژن *BnFUL* داخلی دارای تراژن *BnFUL* نیز هستند در حالی که گیاهان شاهد تنها دارای ژن *BnFUL* داخلی هستند. این آزمون اولین گام در اثبات حضور تراژن در گیاهان تراریخته است.

نتایج آزمون لکه‌گذاری سادرن نشان داد که گیاهان تراریخته‌ی رقم Okapi دارای حداقل سه نسخه از تراژن، گیاهان تراریخته از رقم RGS003 یک نسخه از تراژن و گیاهان تراریخته از رقم Licord دو نسخه از تراژن را دارا هستند (شکل ۳). از آنجایی که در

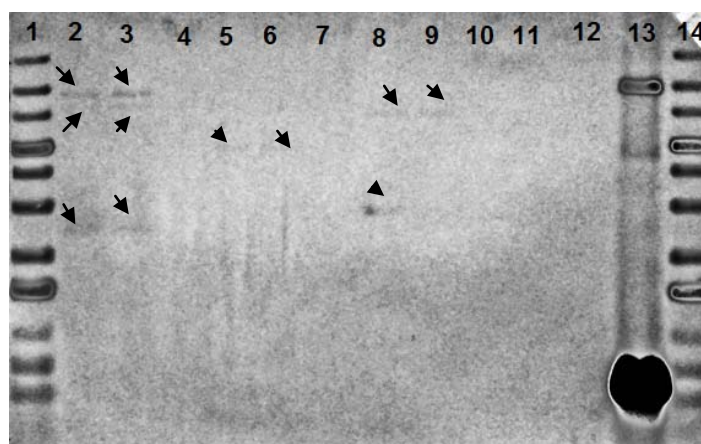
8- housekeeping gene



شکل ۲- تکثیر ژن *BnFUL* در گیاهان تراریخته و غیرتراریخته با استفاده از آزمون پی.سی.آر (چاهک‌های ۱ و ۱۶ 1 kb plus ladder؛ چاهک‌های ۲ تا ۱۰ گیاهان تراریخته؛ چاهک‌های ۱۱ تا ۱۳ گیاهان شاهد؛ چاهک ۱۴ پلاسمید و چاهک ۱۵ کنترل منفی با آب)

Figure 2- Amplification of *BnFUL* gene in transgenic and nontransgenic plants using PCR.

(wells 1 and 16 1 kb plus ladder; wells 2 to 10 transgenic plants; wells 11 to 13 wild type plants; well 14 plasmid and well 15 negative control of water)

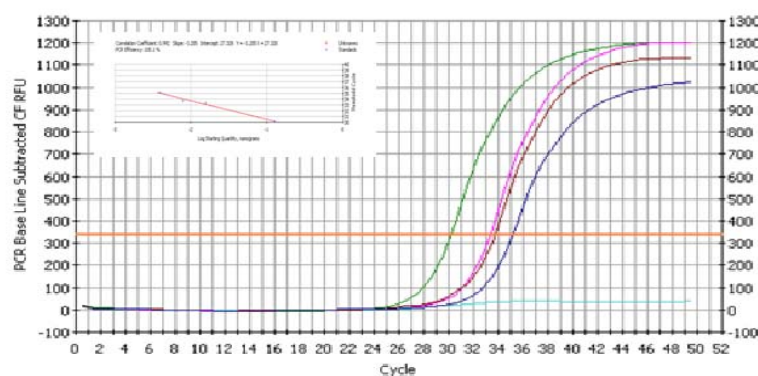


شکل ۳- نتیجه آزمون لکه‌گذاری سادرن.

(چاهک‌های ۱ و ۱۴ 1 kb plus ladder؛ چاهک‌های ۲ و ۳ هضم آنزیمی دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم Okapi؛ چاهک ۴ دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم Okapi؛ چاهک‌های ۵ و ۶ هضم آنزیمی دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم RGS003، چاهک ۷ دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم RGS003، چاهک ۸ و ۹ هضم آنزیمی گیاه تراریخته از رقم Licord، چاهک ۱۰ دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم Licord، چاهک ۱۱ هضم آنزیمی گیاه شاهد، چاهک ۱۲ دی.ان.ای گیاه شاهد و چاهک ۱۳ هضم آنزیمی پلاسمید)

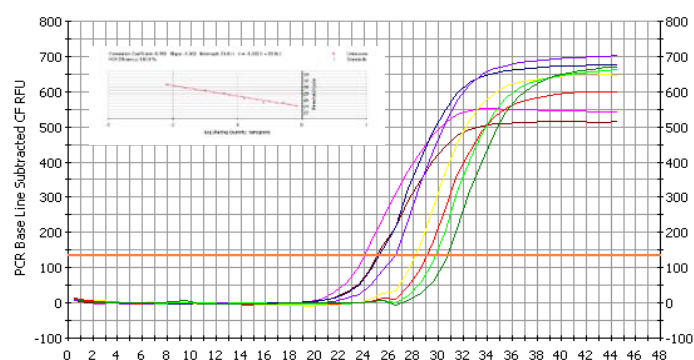
Figure 3- Southern blot analysis results.

(1 and 14 wells: 1 kb plus ladder; 2 and 3: digested DNA from transgenic plants of Okapi cultivar; 4: DNA from transgenic plant of Okapi cultivar; 5 and 6: digested DNA from transgenic plants of RGS003 cultivar; 7: DNA from transgenic plant of RGS003 cultivar; 8 and 9: digested DNA from transgenic plants of Licord cultivar; 10: DNA from transgenic plant of Licord cultivar; 11: digested DNA from ctr. Plant; 12: DNA of ctr. Plant and 13: digested DNA from Plasmid)



شکل ۴- نمودار استانداردسازی آزمون realtime-PCR برای ژن *BnFUL*

Figure 4- Standard Curves in realtime_PCR for *BnFUL* gene.



شکل ۵- نمودار استانداردسازی آزمون realtime-PCR برای ژن *GAPDH*

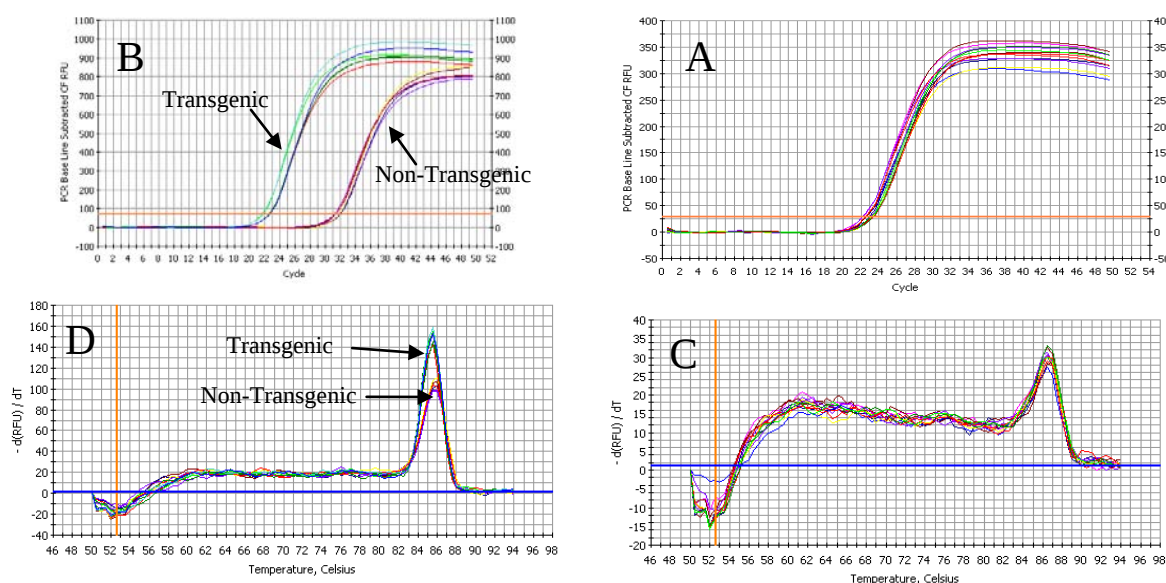
Figure 5- Standard Curves in realtime-PCR for *GAPDH* gene

تعداد نسخه متفاوتی از تراژن در گیاهان تراریخته رقم‌های مختلف مشاهده می‌شود. در گیاهان تراریخته رقم RGS003 تعداد یک نسخه تراژن وارد شده است و در نتایج آزمون Real Time-PCR می‌بینیم که این گیاهان نسبت به گیاهان تراریخته رقم‌های دیگر بیان کمتری دارند. در صورتی که بیان ژن را در گیاهان دو رقم دیگر مقایسه کنیم خواهیم دید که گیاهان تراریخته رقم Okapi با تعداد نسخه تراژن بیش‌تر نسبت به گیاهان تراریخته رقم Licord بیان کمتری را دارند. این موضوع به احتمال زیاد با اثر محل ورود تراژن در ژنوم گیاهان تراریخته ارتباط داد. با توجه به نتایج این پژوهش انتظار می‌رود لاین‌های تراریخته تولید شده قادر باشند در شرایط نامناسب محیطی تحمل بهتری به ریزش نشان دهند. در این زمینه بررسی‌های فنوتیپی برای ارزیابی تحمل آنها به ریزش دانه در شرایط تنش ضروری است.

در انتقال‌های مستقل، تراژن در محل‌های متفاوتی در ژنوم گیاه وارد می‌شود. این موضوع باعث می‌شود که سطوح بیان تراژن در انتقال‌های منفرد با تعداد نسخه یکسان از تراژن، متفاوت باشد. در نتیجه، تفاوت‌های کمی در بیان تراژن به تفاوت اثرهای دی.ان.ای کروموزومی مجاور تراژن نسبت داده می‌شود. این تفاوت‌های کمی که به محل ورود تراژن در ژنوم بستگی دارند با عنوان اثر محل^{۱۲} شناخته می‌شوند (Blundy et al., 1991; Dean et al., 1988; Melynarova et al., 1994; Peach and Veltern, 1991). ساختار کروماتین در اطراف هر محل تراژن^{۱۳} متفاوت است و ممکن است باعث تفاوت در دسترسی عوامل رونویسی شود (Dean et al., 1998).

در پژوهش حاضر، با توجه به نتایج آزمون لکه‌گذاری سادرن

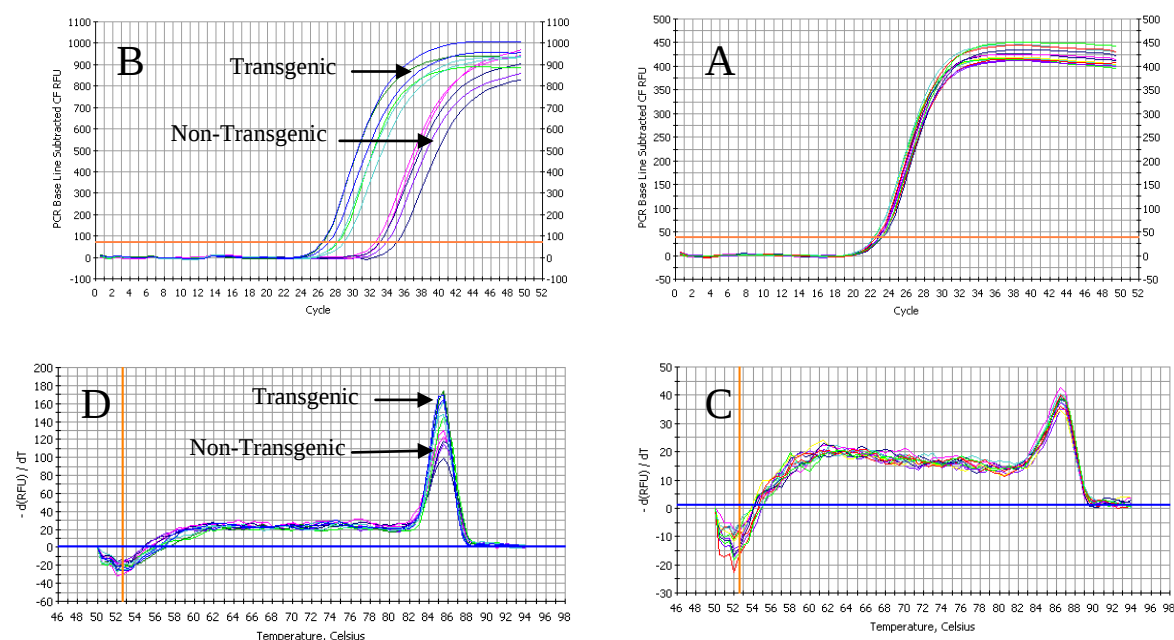
12- position effect
13- transgene locus



شکل ۶- نمودارهای تکثیر و ذوب مربوط به گیاهان تراریخته و شاهد رقم Licord.

A-نمودار تکثیر ژن *GAPDH*. B-نمودار تکثیر ژن *BnFUL*. C-نمودار ذوب ژن *GAPDH*. D-نمودار ذوب ژن *BnFUL*.

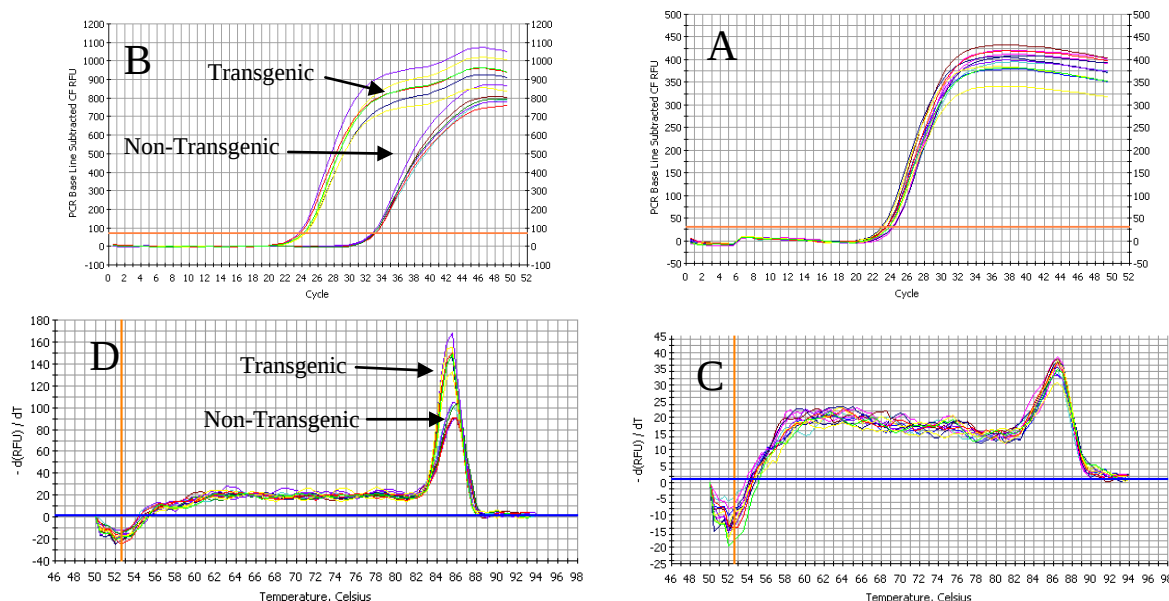
Figure 6- Amplification Curves and Melt Curves of transgenic and non-transgenic plants of Licord cultivar. A-Amplification Curve of *GAPDH* gene. B-Melt Curve of *BnFUL* gene. C- Amplification Curve of *GAPDH* gene. D-Melt Curve of *BnFUL* gene.



شکل ۷- نمودارهای تکثیر و ذوب مربوط به گیاهان تراریخته و شاهد رقم RGS.

A-نمودار تکثیر ژن *GAPDH*. B-نمودار تکثیر ژن *BnFUL*. C-نمودار ذوب ژن *GAPDH*. D-نمودار ذوب ژن *BnFUL*.

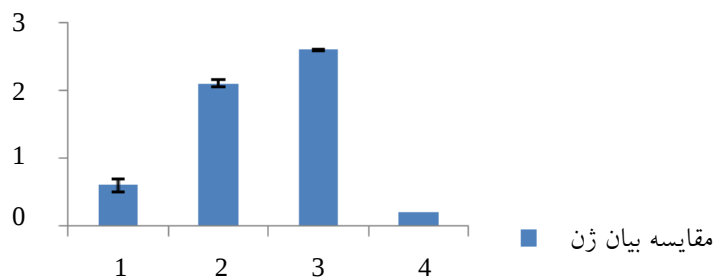
Figure 7- Amplification Curves and Melt Curves of transgenic and non-transgenic plants of RGS cultivar. A-Amplification Curve of *GAPDH* gene. B-Melt Curve of *BnFUL* gene. C- Amplification Curve of *GAPDH* gene. D-Melt Curve of *BnFUL* gene.



شکل ۸- نمودارهای تکثیر و ذوب مربوط به گیاهان تراریخته و شاهد رقم Okapi.

A-نمودار تکثیر ژن *GAPDH*. B-نمودار تکثیر ژن *BnFUL*. C-نمودار ذوب ژن *GAPDH*. D-نمودار ذوب ژن *BnFUL*.

Figure 8- Amplification Curves and Melt Curves of transgenic and non-transgenic plants of Okapi cultivar. A-Amplification Curve of *GAPDH* gene. B-Melt Curve of *BnFUL* gene. C- Amplification Curve of *GAPDH* gene. D-Melt Curve of *BnFUL* gene.



شکل ۹- نمودار مقایسه بیان ژن *BnFUL* در گیاهان شاهد و تراریخته

(ستون شماره ۱ مربوط به گیاهان شاهد، ستون شماره ۲ مربوط به گیاهان تراریخته رقم Licord، ستون شماره ۳ مربوط به گیاهان تراریخته رقم RGS003، ستون شماره ۴ مربوط به گیاهان تراریخته رقم Okapi)

Figure 9- Comparing in gene expression for *BnFUL* gene in transgenic and non-transgenic plants. (The first Column is related to non-transgenic plants, The second Column is related to transgenic plants of licord Cultivar, The third Column is related to transgenic plant of RGS003 cultivar, The forth Column is related to transgenic plants of Okapi cultivar.)

منابع

- Asadi S. 2008. Study over-expression of the *FUL* gene in oilseed rape. M Sc. Thesis, University of Zabol.
- Blundy KS, Blundy MAC, Carter D, Wilson F, and Park WD. 1991. The expression of class I patatin gene fusions in transgenic potato varies with both gene and cultivar. *Plant Molecular Biology* 16, 153-160.
- Child RD, and Evans DE. 1989. Improvement of recoverable yields in oilseed rape (*Brassica napus*) with growth retardants. *Aspect Applied Biology*. 23:135-144.
- Dinneny JR, and Yanofsky MF. 2005. Drawing lines and borders: how dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. *BioEssays* 27:42-49.

5. Dai Sh, Zheng P, Marmay Ph, Zhang Sh, Tian W, Chen Sh, Beachy RN, and Fauquet C. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*- mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7:25-33.
6. Dean C, Jones J, Favreau M, Dunsmuir P, and Bedbrook J. 1998. Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nucleic Acid Research* 16, 9267-9283.
7. Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep preparation version II. *Plant Molecular Biology*, 1:19-21.
8. Elmayan T, and Vaucheret H. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35s transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal*. 9:787-797.
9. Gu Q, Ferrandiz C, Yanofsky MF and Martienssen R. 1998. The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*. 125:1509-1517.
10. Hobbs ShLA, Warkentin TD, and DeLong CMO. 1993. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology*, 21: 17-26.
11. Lijegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, and Yanofsky MF. *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. 2000. *Nature*. 404:766-770.
12. MacLeod J, and Ogilvy S. 1982. Harvesting winter oilseed rape. *Journal of Scientific Food Agriculture*. 33:1265-1266.
13. Mlynarova LA Loonen, Heldens J, Jansen RC, Keizer P, Stiekema WJ, and Nap JP. 1994. Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix- associated region. *Plant Cell*, 6:417-426.
14. Ostergaard L, Kempin ShA, Bies D, Klee HJ, and Yanofsky MF. 2006. Pod shatter-resistant *Brassica* fruit produced by ectopic expression of the *FRUITFULL* gene. *Biotechnology Journal*. 4:45-51.
15. Peach C, and Velten J. 1991. Transgene expression variability position effect of CAT and Gus reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Molecular Biology*, 17:49-60.
16. Price JS, Hobson RN, Neale MA and Bruce DM. 1996. Seed losses in commercial harvesting of oilseed rape. *Journal of Agriculture Engineering Research*. 65:183-191.
17. Robles P, and Pelaz S. 2002. Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int. Dev. Biot*. 49:633-643.
18. Seifi AR, Shakib AM. 2005. Construction of a cDNA library and its isolation. Final Reports, Agricultural Research, Education and Training Organization, 84/1469.
19. Shakib AM, Seif, A, Ahmad Raji M, Oroojloo M. 2007. Cloning of *BnSHP* gene on suitable vector and transferring into oilseed rape. Final Reports, Agricultural Research, Education and Training Organization, 86/1199.
20. Spence J, Vercher Y, Gates P, and Harris N. 1996. Pod shatter in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*. *Journal of Microscopy*. 2:195-203.
21. Sambrook J, and Russel D. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
22. Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, and Vernhettes S. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal*. 16:651-659.
23. Wang R, Ripley VL and Rakow G. 2007. Pod shatter resistance evaluation in cultivars and breeding lines of *Brassica napus*, *B. juncea* and *Sinapis alba*. *Plant Breeding*. 126:588-595.