

روش انتقال ژن به گیاه ترشک (*Rumex acetosa L.*)

علی محمد شکیب*^۱، علی ایزدی دربندی^۲، مانا احمد راجی^۳ و مهناز عروجلو^۴

*۱ - نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، پست الکترونیک: E-mail: a_shakib@abrii.ac.ir

۲- استادیار، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ورامین

۳- کارشناس مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

۴- کارشناس مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۵/۱

چکیده

در این مطالعه عوامل موثر بر انتقال ژن به گیاه ترشک مورد بررسی قرار گرفت. از آگرو باکتریوم، سویه LBA4404 حاوی پلاسמיד pBI121، و غلظت‌های مختلف کانامایسین و زمان‌های مختلف تلقیح با استفاده از ریز نمونه برگ برای ارزیابی انتقال ژن گزارشگر *gus* استفاده گردید. کشت قطعات برگ روی محیط کشت MS دارای ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر IAA و غلظت‌های کانامایسین صفر، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نشان داد که غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین و بالاتر از آن از تولید کالوس و باززایی گیاه جلوگیری نموده و به عنوان غلظت آستانه کانامایسین در محیط کشت گزینش تعیین گردید. اثر غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم (۱، ۰/۶ و ۰/۲ OD) با زمان‌های مختلف تلقیح (۲، ۸ و ۲۵ دقیقه) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ریز نمونه‌های برگ با سوسپانسیون آگروباکتریوم دارای پلاسמיד pBI121 واجد ژن *gus* تلقیح شدند. ریزنمونه‌ها بعد از همکشتی به محیط باززایی حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سلین ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفاتوکسیم و ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین منتقل شدند. آزمون GUS سنجی بیان موفق این ژن را در گیاهان باززایی شده در شرایط تلقیح ۰/۲ و ۰/۶ OD و مدت زمان ۲ دقیقه تلقیح نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ترشک *Rumex acetosa L.*، انتقال ژن، آگروباکتریوم، ژن گزارشگر *gus*

مقدمه

شناخت چگونگی کنترل و رشد اعضای گل یکی از موضوعات مهم در زیست‌شناسی مولکولی گیاهی است. درک چگونگی تعیین هویت اعضای گل از جمله اعضای جنسی نر و ماده امکان کنترل آنها را فراهم می‌نماید و می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نباتات باغی، جنگلی، زراعی و زینتی کمک نماید. ترشک گیاهی علفی و دوپایه از خانواده پلی‌گوناسه است (Parker

and Clark, 1991). این گیاه دارای ویژگی‌هایی از

جمله تعداد کم کروموزوم، دوپایه بودن، وجود کروموزوم‌های جنسی و کوتاه بودن دوره رشد و نمو است (Parker, 1990) که موجب شده تا در مطالعات ژنتیکی و مولکولی تشکیل اعضای نر و ماده گل مورد استفاده قرار گیرد (Ainsworth et al., 1997). در ترشک، پایه ماده دارای $2n=2X=12+XX$ کروموزوم و پایه نر $2n=2X=12+XY_1Y_2$ کروموزوم است

ترشک امکان مطالعه نه تنها ژن‌های فوق بلکه مطالعه ژن‌هایی که در کنترل تعیین هویت اعضای گل و ایجاد تک جنسی دخالت دارند فراهم می‌شود.

مواد و روشها

از گیاهان ترشک که در شرایط درون شیشه تکثیر و نگهداری می‌شوند استفاده گردید. از بافت برگ و محیط MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به عنوان جداکشت و محیط کشت برای باززایی استفاده شد.

تعیین غلظت آستانه تاثیر کانامایسن

اثر غلظت‌های مختلف کانامایسن (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر تولید کالوس و باززایی گیاه برای تعیین غلظت آستانه این ماده آزمون شدند. هر تیمار شامل ۱۰۰ قطعه جداکشت بود. ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌های فوق در اتاق کشت با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۵ هفته قرار داده شدند. بعد از این مدت، میزان القاء کالوس و از بین رفتن ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی

در این مطالعه از پلاسمید pBI121 حاوی ژن *uidA(GUS)* تحت پیشبر *CaMV35S* به عنوان ژن گزارشگر، و ژن *nptII* به عنوان ژن عامل گزینش استفاده شد. ابتدا پلاسمید از سلولهای باکتری *E. coli* طبق روش لیز قلیایی استخراج شد و بعد از مشاهده باندهای پلاسمید مورد نظر روی ژل آگارز یک درصد، برای اطمینان از نوع پلاسمید، با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *BamHI* هضم و باندها روی ژل آگارز بررسی شدند.

(Ainsworth *et al.*, 1998). وقتی نسبت بین تعداد کروموزوم‌های x و مجموعه‌های اتوزومی برابر ۱ یا بالاتر باشد، پایه‌ها ماده هستند، در حالیکه نسبت‌های x به اتوزوم برابر با ۰/۵ و یا پایین‌تر، منتج به پایه‌های نر می‌شود. نسبت‌های بین ۰/۵ و ۱ فنوتیپ دوجنسی تولید می‌کنند. بنابراین تعیین جنسیت اساساً مستقل از وجود یا عدم وجود کروموزوم y است. همچنین تولید بخش‌های مختلف گل نر مستقل از کروموزوم y است، زیرا تتراپلوئیدهایی که در آن‌ها $2n$ برابر با ۲۴ به علاوه xxx است (با نسبت ۰/۷۵)، دوجنسی هستند. با این وجود دو کروموزوم y برای میوز موفق در سلول‌های مادری گرده لازم هستند (Ainsworth, 2000). بیشتر مطالعات انجام شده نشان داده است که ژن‌های کنترل کننده هویت اعضای گل متعلق به خانواده بزرگی از ژنها به نام MADS-box هستند (Riechman and Meyerowitz, 1997; Takahiro *et al.*, 2004; Noah Sather *et al.*, 2005) که عمدتاً فاکتورهای نسخه برداری را کد می‌کنند (Shore and Sharrocks, 1995). از گیاه مدل ترشک تعدادی ژن متعلق به همین خانواده ژنی از جمله ژن‌های *RADI*، *RAP1* و *RAD2* جداسازی شده است که مطالعه آنها از طریق هیبریداسیون در محل نشان داده که بیان آنها محدود به پریموردیای اعضای نر و ماده گل می‌شود (Ainsworth *et al.*, 1995). نقش ژن *RAP1* با انتقال به گیاه توتون مورد مطالعه قرار گرفت (Shakib, 1999). در گیاهان تراریخته توتون تغییراتی در اندام‌های گل مشاهده شده است. لذا نقش دقیقتر این ژن‌ها با انتقال آنها به پایه‌های مختلف ترشک مشخص می‌گردد. این کار مستلزم ایجاد روش مناسب انتقال ژن به این گیاه است. با بررسی عوامل موثر در انتقال ژن و بهینه سازی این روش در

رشد یافته استوک تهیه شد و از آن برای مراحل بعدی استفاده گردید.

کشت آگروباکتریوم و تلقیح بافت‌های گیاهی

به منظور تعیین مناسبترین زمان تلقیح و غلظت آگروباکتریوم غلظت‌های مختلف آگروباکتریوم (۰/۲، ۰/۶ و ۱ و OD=) و زمان‌های مختلف تلقیح (۲، ۸، و ۲۵ دقیقه) انجام شد برای این منظور یک کلنی از پتری دیش تازه واکشت شده در ۵ میلی لیتر محیط (pH 7) LB به علاوه ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین کشت شده و این کشت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه رشد داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، ۵۰ الی ۱۰۰ میکرولیتر از کشت فوق در ۲۵ میلی لیتر محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین رقیق شده و در همان دما و سرعت نگهداری شد. پس از رسیدن به غلظت‌های مناسب، ریزنمونه‌های برگ با سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند. بعد از گذشت زمان لازم، ریز نمونه‌ها از سوسپانسیون باکتری خارج شده و بعد از کمی خشک شدن بر روی کاغذ صافی استریل، روی محیط هم کشتی شامل محیط باززایی به علاوه ۱۰ میلی گرم در لیتر استوسیرینگون قرار گرفتند. برای هر تیمار تعداد ۶۰۰ ریزنمونه تلقیح شد و در هر پتری دیش ۱۵ ریزنمونه قرار داده شد. ریزنمونه‌ها بعد از ۲ روز هم کشتی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به محیط گزینش شامل محیط باززایی به اضافه ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفاتوکسیم برای کنترل رشد آگروباکتریوم و ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین برای گزینش سلول‌های گیاهی ترنسفرم شده منتقل و در همان شرایط نگهداری شدند.

تهیه سلول‌های مستعد آگرو باکتریوم و انتقال پلاسمید به آن یک تک کلنی از آگروباکتریوم سویه LBA4404 در ۵ میلی لیتر محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین (ژن مقاومت به ریفامپیسین روی کروموزوم آگرو باکتریوم قرار دارد). کشت شده و کشتها در ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه رشد داده شدند و بعد از ۱۶ الی ۲۴ ساعت، ۱ میلی لیتر از کشت فوق در ۵۰ میلی لیتر محیط جدید تلقیح شده و در همان شرایط قبلی نگهداری شد. زمانی که رشد سلول‌های باکتری در OD₆₀₀ به حدود ۰/۵ رسید با سانتریفیوژ و در دور ۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. رسوب حاصل در ۵۰ میلی لیتر گلیسرول ۱۰ درصد سرد حل شده و دوباره در ۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از خارج کردن محلول رویی رسوب را در ۲۵ میلی لیتر گلیسرول ۱۰ درصد سرد حل کرده و عمل سانتریفیوژ تکرار شد. این مراحل را با ۱۵ میلی لیتر گلیسرول ادامه داده و در آخر رسوب باکتری در یک میلی لیتر گلیسرول ۱۰ درصد سرد حل شده و به سرعت در ازت مایع منجمد شد. این سلولها را می‌توان تا شش ماه در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. برای انتقال ژن از دستگاه Ecoli Pulser استفاده شد. بدین منظور ۱ میکرولیتر از DNA پلاسمید (با غلظت حدوداً ۱۰۰ نانوگرم) به ۴۰ میکرولیتر سلول مستعد اضافه شد و سپس طبق دستورالعمل دستگاه به آن پالس الکتریکی اعمال گردید. بلافاصله ۱ میلی لیتر LB اضافه شده و باکتری به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور دقیقه رشد داده شد. و سپس بر روی محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین کشت شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۶ الی ۴۸ ساعت نگهداری شد. از یکی از کلنی‌های

بررسی بیان ژن *gus* از طریق آزمون هیستوشیمیایی

بیان ژن گزارشگر *gus* از طریق آزمون هیستوشیمیایی، طبق روش Jefferson و همکاران (۱۹۸۷) با اندکی تغییرات، مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم GUS سوبسترای X-Gluc را تجزیه کرده و محصول عمل پس از یک واکنش دایمریزایسون اکسیداتیو، رسوب آبی رنگی تشکیل می‌دهد که قابل رویت است. برای بررسی بیان ژن *gus*، ریزنمونه‌ها ۱۲ هفته بعد از کشت در محلول رنگ آمیزی بافر فسفات دارای ۱۰۰ میلی گرم در لیتر X-Gluc، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلرامفنیکل، ۱ میلی لیتر در لیتر تریتون X-100 و ۲۰ درصد متانول (متانول موجود در این محلول، از فعالیت داخلی GUS که در بعضی گیاهان گزارش شده است، جلوگیری می‌کند) قرار گرفته و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها از محلول فوق خارج شده و در اتانول به مدت چند ساعت قرار گرفته تا کلروفیل حذف شده و ریزنمونه‌ها بی رنگ شوند. سلولهای بیان کننده ژن *uidA* شمارش و ثبت گردید و بر این اساس تیمارها مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفتند. بررسی بیان پایدار ژن *gus* از طریق گیاهان باززایی شده در محیط انتخابی انجام گرفت. به این منظور، قسمتهای مختلف این گیاهان شامل برگ، دم‌برگ و ریشه در محلول X-Gluc قرار گرفته و بعد از ۲۴ ساعت که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند با استفاده از اتانول رنگ بری شده و زیر لوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

تعیین غلظت آستانه تاثیر کانامایسین

از آنجا که کارایی تولید گیاهان تراریخته وابسته به انتخاب دقیق سلولها و بافتهای تراریخته است، لازم است که آستانه تاثیر ژن انتخابگر گیاهی مشخص شود. برای این

منظور غلظت‌های مختلف کانامایسین بررسی گردید. ریزنمونه‌های شاهد روی محیط بدون کانامایسین کاملا سبز بوده و در حاشیه برش ایجاد کالوس کردند. در محیط با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر از این آنتی بیوتیک ریزنمونه‌ها اکثرا سبز بوده ولی القا کالوس در آنها بسیار ضعیف بود. در غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر، حدود ۸۰ الی ۹۰ درصد ریزنمونه‌ها زرد شده و از بین رفتند و هیچ گونه اثری از القاء کالوس در آنها مشاهده نگردید. در غلظتهای ۵۰ میلی گرم و بالاتر نیز تقریبا ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها از بین رفتند (جدول ۱). لذا غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر به عنوان آستانه تاثیر کانامایسین بر روی ریزنمونه‌های برگ گیاه ترشک در نظر گرفته شد. هر تیمار شامل ۱۰۰ قطعه جداکشت بود.

جدول ۱- اثر غلظت‌های کانامایسین روی میزان باززایی

از برگ ترشک

درصد باززایی	محیط انتخابی حاوی کانامایسین (میلی گرم در لیتر)
۳۶	۰
۱۹	۱۰
۰	۲۵
۰	۵۰
۰	۷۵
۰	۱۰۰

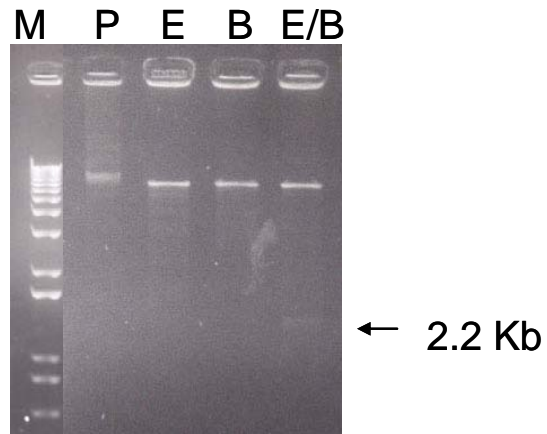
استخراج پلاسمید pBI121 و هضم آنزیمی

پس از استخراج پلاسمید، با دو آنزیم *EcoRI* و *BamHI* به صورت منفرد برش داده شد که پلاسمید خطی شد و در اثر هضم با هر دو آنزیم یک قطعه حدود ۲/۲ کیلو باز از پلاسمید جدا شد که تایید کننده وجود پلاسمید مورد نظر بود (شکل ۱).

می‌تواند ناشی از عوامل مختلف باشد. از جمله این عوامل بافت گیاهی و سیستم باززایی از آن است. باززایی از قطعات برگ در ترشک عمدتاً از سلول‌های مرستمی اطراف آوندی منشا می‌گیرد. از آنجاییکه ممکن است آگروباکتریوم هنگام تلقیح دسترسی کمتری به این سلول‌ها که در لایه‌های پایین تر از محل برش قرار دارند داشته باشد، موجب می‌شود تا سلول‌های تراریخته و باززایی از آنها به میزان زیادی پایین آید. استفاده از کالوس تشکیل شده در این بافتها در مراحل اولیه کشت و سپس تلقیح آنها با آگروباکتریوم ممکن است موثر بوده و بتواند کارایی تولید گیاهان تراریخته را افزایش دهد.

بحث

تشکیل و رشد اعضای جنسی گل مرحله مهمی در تولید بذر و میوه می‌باشد. بیشتر مطالعات ژنتیکی و مولکولی تشکیل اعضای نر و ماده گل روی گیاهان دو جنسی صورت می‌گیرد. استفاده از گیاهان تک جنسی، نسبت به گیاهان دو جنسی، برای مطالعات مولکولی و انتقال ژن‌های مرتبط با ایجاد و نمو اعضاء گل مناسب‌تر هستند. انتقال ژن به گیاهان تک جنسی مانند خیار، ذرت، و اسفناج گزارش شده اگرچه این گیاهان تحت شرایط محیطی و محیط کشت تغییرات در جنسیت گل نشان می‌دهند که به این دلیل مناسب نیستند (Shen *et al.*, 1993; Malepszw, and. Niemirowicz-) Szczytt, 1991; Ishida *et al.*, 1996; Komai *et al.*, 2003; Masuda, 2004; Zhang and Zevaart, 1999). این نقاط ضعف در گیاه ترشک دیده نمی‌شود و می‌تواند بعنوان یک گیاه دو پایه مدل در بررسی‌های انتقال ژن نیز مورد استفاده قرار گیرد. هرچند این کار نیازمند ابداع روش انتقال ژن به آن می‌باشد. در این بررسی نشان داده شد که



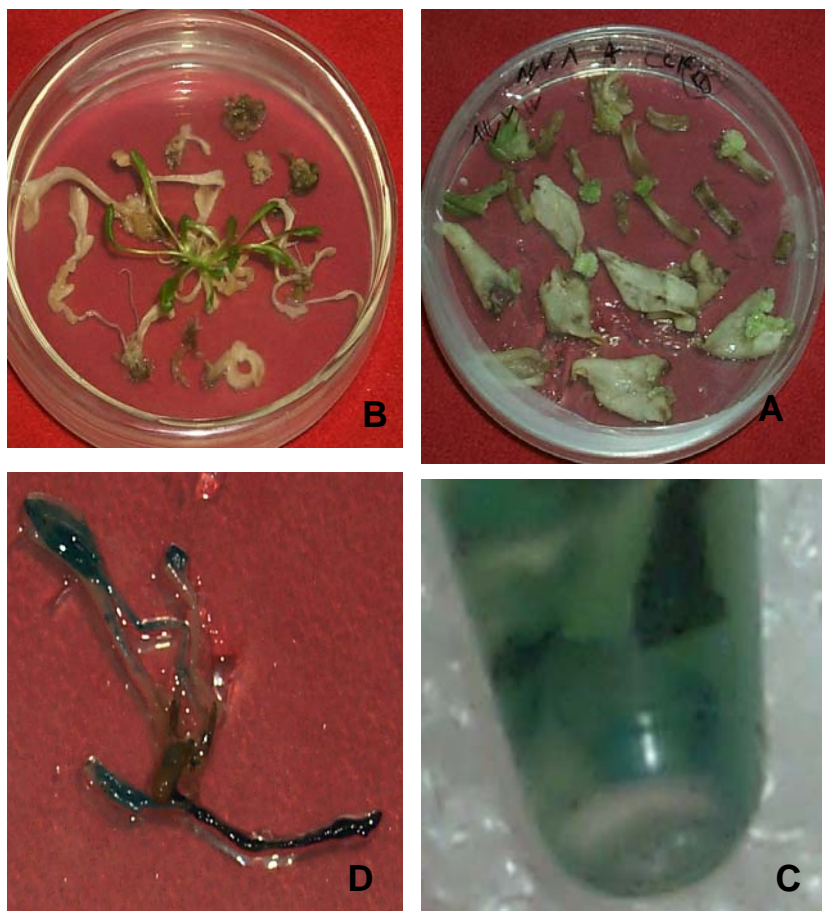
شکل ۱- هضم پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های برشی: M-مارکر؛ P- پلاسمید؛ E - هضم پلاسمید با آنزیم *EcoRI*؛ B - هضم پلاسمید با آنزیم *BamHI*؛ E/B - هضم پلاسمید با دو آنزیم *EcoRI* و *BamHI* و جدا شدن یک قطعه حدود ۲/۲ کیلو باز از پلاسمید.

ارزیابی بیان ژن *gus* در گیاهان باززایی شده

آزمایشات بررسی انتقال ژن نشان داد در تمامی تیمارهای با زمان تلقیح ۲۵ دقیقه القای کالوس به شدت کاهش یافت و در این سطح از زمان تلقیح هیچ گیاهچه‌ای باززایی نشد. در تیمارهای تلقیح با غلظت $OD=1$ نیز القای کالوس بسیار کاهش یافت و گیاهچه‌ای باززایی نشد. در تیمارهای با زمان تلقیح (۲ و ۸ دقیقه) و غلظت باکتری $0/2$ و $OD=0/6$ تعدادی گیاهچه باززایی شده روی محیط گزینش بدست آمد که پس از واکشت‌های بعدی بیشتر آنها از ادامه رشد بازماندند و تنها تعداد محدودی سبز ماندند. آزمون *GUS* سنجی روی نمونه‌های باززایی شده صورت گرفت و تنها در تیمارهای $OD(0/6)$ و $OD(0/2)$ و زمان تلقیح ۲ دقیقه پاسخ مثبت بدست آمد. ۲ گیاه در محیط تلقیح شده با OD برابر با $0/6$ و ۱ گیاه در محیط با شرایط OD برابر با $0/2$ بدست آمد که رنگ آبی در آنها بطور کامل ظاهر شد (شکل ۲). نرخ تراریختگی در این آزمایشات پایین بود که

شناخته شده است (Birch, 1997; Gheysen *et al.*, 1998;) اما تفاوت‌هایی در گیاهان مختلف مشاهده می‌شود. از جمله این عوامل ژنوتیپ گیاه، قطعه جداکشت، ترکیب محیط کشت و سویه مناسب آگروباکتریوم را می‌توان نام برد. لذا بررسی اثرات این عوامل و ترکیب مناسب و روش بهینه انتقال ژن برای هر گیاه ضروری است. نتایج این بررسی نشان داد که انتقال ژن به گیاه ترشک امکان پذیر است و بررسی‌های بیشتر برای افزایش کارایی انتقال ژن به آن، راه را برای استفاده از این گیاه در مطالعات تعیین جنسیت باز می‌نماید.

آگروباکتریوم به عنوان یک وسیله برای انتقال ژن به ترشک قابل استفاده است. بافت‌های گیاه نسبت به آنتی بیوتیک کانامایسین که در مطالعات انتقال ژن به عنوان عامل گزینش گیاهی استفاده می‌شود (Park *et al.*, 1998) حساس بوده و غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی گرم در لیتر آن مانع از رشد کالوس و باززایی گیاه می‌شوند. روش انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخته در خیلی از گیاهان بهینه سازی شده است و شاهد توسعه این روش به گیاهان بیشتری هستیم. موفقیت در تولید گیاهان تراریخته بستگی به کارایی روش انتقال ژن دارد. گرچه بطور کلی عوامل مؤثر در انتقال ژن به گیاه



شکل ۲- انتقال ژن *gus* به ترشک. A- اثر بازدارندگی کانامایسین بر باززایی گیاه؛ B- باززایی و رشد گیاه روی محیط گزینش ۸ هفته بعد از کشت؛ C- تولید رنگ آبی در بافت‌های تراریخته؛ D- تولید رنگ آبی در گیاه کامل ترشک

- oleracea* L.) by irradiation with ion particles. Plant Cell Reports, 21: 713-717.
- Malepszw, S. and Niemirowicz-Szczytt, K. 1991. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model for molecular biology. Plant Sci., 80:39-47.
- Noah Satter, D., York,, A., Pobursky, K. J., and Golenberg, E. M., 2005. Sequence evolution and sex specific expression of the C class floral identity gene, *SpAGAMOUS*, in dioecious *Spinacia oleracea* L. Planta, 222: 248-292.
- Park, S. H., Rose, S. C., Zapata, C., Srivatanakul M., and Smith. R. H. 1998. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *in vitro* Cell Dev. Biol. 34:117-121.
- Parker, J. S. 1990. Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants. Chromosomes Today, 10: 187-198.
- Parker, J. S. and Clark, M. S., 1991. Dosage sex-chromosome systems in plants. Plant Sci., 80: 79-92.
- Riechmann, J. L., and Meyerowitz, E. M., 1997. MADS domain proteins in plant development. Biol. Chem., 378: 1079-1101.
- Shakib, A. M., 1999. MADS box genes in sorrel (*Rumex acetosa* L.). Ph.D Thesis, University of London.
- Shen, W. H., Escudero, J., Schläppi, M., Ramos, C., Hohn B., and Koukolíková-Nicola, Z. 1993. T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of β -glucuronidase ctivity in maize tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 90:1488-1492.
- Shore, P., and Sharrocks, A. D., 1995. The MASD bos family of transcription factors. Eur. J. Biochem., 229: 1-13.
- Takahiro, Y., Nagasava, N., Kawasaki, S., Matsuoka, K, Nagato, Y., and Hirano, H. Y., 2004. The *YABBY* Ggene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. The Plant Cell, 16: 500-509.
- Zhang, H. X. and Zeevaart, J. A. D. 1999. An efficient *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach. Plant Cell Reports, 18: 640-645.
- ### منابع مورد استفاده
- Ainsworth, C., Crossley, S., Buchanan-Wollaston, V., Thangavelu, M., and Parker, J., 1995. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. Plant Cell, 7: 1583-1598.
- Ainsworth, C., Shephard, H., Jianping, L., Shakib, A. M., Rahman, A., and Bhattacharyya, T., 1997. Studies on sex determination in plants with X: Autosome dosage system. Flowering News Letter, May, 18-23.
- Ainsworth, C., Parker, J., and Buchanan-Wollaston, V., 1998. Sex determination in plants. Current Topics in Developmental Biology, 38: 167-223.
- Ainsworth, C., 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. Ann. Bot., 86: 211-221.
- Ainsworth, C., Rahman, Az., and Edwards, G., 2005. Intersex inflorescences of *Rumex acetosa* demonstrate that sex determination is unique to each flower. New Phytologist, 165: 711-720.
- Birch, R.G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:297-326.
- Gheysen, G., G. Angenon and M. Van Montagu. 1998. *Agrobacterium* -Mediated Plant Transformation: A Scientifically Intriguing Story With Significant Applications. In: Lindsey K (ed.) Transgenic plant research. Harwood Academic, Amsterdam. pp: 1-33.
- Guivarch, A., Caissard, J. C., Brown, S., Marie, D., Dewitte, W., Van Onckelen, H., Chriqui, D. 1993. Localization of target cells and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by direct acetosyringone pretreatment of carrot root discs. Protoplasma, 174:10-18.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari T., and Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nat Biotechnol., 14:745-750.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T. A. and Bevan M. W., 1987. GUS fusion: beta glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J., 6: 3901-3907.
- Komai, F., and Masuda, K. 2004. Plasticity in sex expression of spinach regenerated from root tissues. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 78: 258-287.
- Komai ,F., N. Shikazono and Tanaka, A. 2003. Sexual modification of female spinach seeds (*Spinacia*

Investigation in gene transforming method to sorrel (*Rumex acetosa* L.)

A.M. Shakib¹, A. Izadi-Darbandi², M. Ahmad-Raji³ and M. Orujloo⁴

1-* Corresponding author, Assis. Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute, I.R.Iran.

E-Mail: a_shakib@abrii.ac.ir

2. Assis. Prof., Aboo-Reihan Pardis, Tehran Univer., Varamin, I.R.Iran.

3 - Agricultural Biotechnology Research Institute, I.R.Iran.

4 – Agricultural Biotech norogy Research Institute, I.R.Iran.

Received: 29.03.2008

Accepted: 22.07.2008

Abstract

Effective factors on gene transferring to sorrel were considered. *Agrobacterium*, strain LBA4404 containing pBI121 plasmid, and different concentrations and inoculation time using leaf explants were used for evaluation of the *gus* gene transformation. Culture of leaf segments on MS medium containing 1.5 mg/l BAP and 0.75 mg/l IAA and kanamycin concentrations (0, 10, 25, 50 75 and 100 mg/l) showed that 25 mg/l kanamycin inhibited callus production and plant regeneration and it was determined as the effective kanamycin level in selection medium. Effects of *Agrobacterium* concentration (OD= 0.2, 0.6 and 1) with different inoculation duration were studied. For this purpose leaf explants were inoculated with *Agrobacterium* suspension having pBI121 plasmid containing the *gus* gene. After co-cultivation the explants were transferred on regeneration medium containing 500 mg/l carbenicilin, 200 mg/l cefotaxim and 25 mg/l kanamycin. GUS assay showed the successful transfer of this gene in regenerated plants under OD= 0.2, 0.6 and 2 minute inoculation duration.

Key words: Sorrel, *Rumex acetosa*, Transformation, *Agrobacterium*, *gus* gene