دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱٦، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱٤۸-۱٤۱ (۱۳۸۷)

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

علی محمد شکیب *[۱]، علی ایزدی دربندی[۲] مانا احمد راجی[۳] و مهناز عروجلو[٤]

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
٤- 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 اگرو باکتریوم، سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121، وغلظتهای 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 میلی‌گرم در لیترBAP و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیترIAA 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، ۰/٦ 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 اگروباکتریوم دارای پلاسمید pBI121 واجد ژن *gus* تلقیح شدند. ریزنمونه‌ها بعد از همکشتی به محیط باززایی حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کربنی سیلین 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 ۰/٦ =OD و مدت زمان ۲ دقیقه تلقیح نشان داد.

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

مقدمه

شناخت چگونگی کنترل و رشد اعضای گل یکی از موضوعات مهم در زیست شناسی مولکولی گیاهی است. درک چگونگی تعیین هویت اعضای گل از جمله اعضای جنسی نر وماده 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 کروموزم، دوپایه بودن، وجود کروموزم‌های جنسی وکوتاه 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

Archive of SID

www.SID.ir

(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 اساسا 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 ۲n برابر با ۲٤ به علاوهٔ 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 عمدتا فاکتورهای نسخه برداری را کد می‌کنند (Shore and Sharrocks, 1995). از گیاه مدل ترشک تعدادی ژن متعلق به همین خانواده ژنی از جمله ژن‌های *RAP1* ، *RAD1* و *RAD2* جداسازی شده است که مطالعهٔ آنها از طریق هیبریداسیون در محل نشان داده که بیان آن‌ها محدود به پریموردیای اعضای نر و مادهٔ گل می‌شود (Ainsworth *et al*., 1995). نقش ژن *RAP1* با انتقال به گیاه توتون مورد مطالعه قرار گرفت (Shakib, 1999). درگیاهان 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 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 برروی محیط‌های فوق در اتاق کشت با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱٦ 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 *uid*A(GUS) تحت پیشبر CaMV35S به عنوان ژن گزارشگر، و ژن *npt*II به عنوان ژن عامل گزینش استفاده شد. ابتدا پلاسمید ازسلولهای باکتری *E. coli*، طبق روش لیز قلیایی استخراج شد و بعد از مشاهده باند پلاسمید مورد نظر روی ژل آگارز یک درصد، برای اطمینان از نوع پلاسمید، با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Bam*HI هضم و باندها روی ژل آگارز بررسی شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه سلولهای مستعد اگرو باکتریوم و انتقال پلاسمید به آن

یک تک کلنی از آگروباکتریوم سویه LBA4404 در ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم درلیتر ریفامپیسین (ژن مقاومت به ریفامپیسین روی کروموزوم اگرو باکتریوم قراردارد.) کشت شده و کشتها در۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور دردقیقه رشد داده شدند و بعد از ۱۶ الی ۲۴ ساعت، ۱ میلی لیتر از کشت فوق در۵۰ میلی‌لیتر محیط جدید تلقیح شده و درهمان شرایط قبلی نگهداری شد. زمانی که رشد سلول‌های باکتری در OD_{600} به حدود ۰/۵ رسید با سانتریفیوژ و در دور g ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. رسوب حاصل در۵۰ میلی لیتر گلیسرول ۱۰ درصد سرد حل شده و دوباره در g۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. بعداز خارج کردن محلول رویی رسوب را در ۲۵ میلی لیترگلیسرول ۱۰ درصد سرد حل کرده و عمل سانتریفوژ تکرار شد. این مراحل را با ۱۵ میلی لیتر گلیسرول ادامه داده و درآخر رسوب باکتری دریک میلی لیتر گلیسرول ۱۰ درصد سرد حل شده و به سرعت در ازت مایع منجمد شد. این سلولها را می‌توان تا شش ماه دردمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. برای انتقال ژن از دستگاهEcoli Pulser استفاده شد. بدین منظور ۱ میکرولیتر از DNA پلاسمید (باغلظت 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 برروی محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم درلیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم درلیتر کاناما یسین کشت شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۶ الی۴۸ ساعت نگهداری شد. از یکی از کلنی‌های 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 و۱ =OD) و زمان‌های مختلف تلقیح (۲ ،۸ و۲۵ دقیقه) انجام شد برای این منظور یک کلنی از پتری دیش تازه واکشت شده در ۵ میلی لیتر محیط LB (pH 7) به علاوه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی گرم درلیتر کانامایسین کشت شده و این کشت در۲۸ 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 درهمان دما و سرعت نگهداری شد. پس از رسیدن به غلظت‌های مناسب، ریزنمونه‌های برگ باسوسپانسیون باکتری تلقیح شدند. بعد از گذشت زمان لازم، ریز نمونه‌ها از سوسپانسیون باکتری خارج شده و بعد از کمی خشک شدن برروی 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 درهر پتری دیش ۱۵ ریزنمونه قرار داده شد. ریزنمونه‌ها بعد از ۲ روز هم کشتی دردمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به محیط گزینش شامل محیط باززایی به اضافه ۵۰۰ میلی گرم درلیتر کربنی سیلین ۲۰۰ میلی گرم درلیتر سفاتوکسیم برای کنترل رشد آگروباکتریوم و ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین برای گزینش سلول‌های گیاهی ترنسفرم شده منتقل و درهمان شرایط نگهداری شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی بیان ژن *gus* از طریق آزمون هیستوشیمیایی

بیان ژن گزارشگر *gus* ازطریق آزمون هیستوشیمیایی، طبق روش Jefferson و همکاران (۱۹۸۷) با اندکی تغییرات، مورد بررسی قرارگرفت. 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 ۱۰۰میلی گرم درلیتر X–Gluc ، ۱۰۰میلی گرم درلیتر کلرامفنیکل ، ۱میلی لیتر درلیتر تریتون 100 -X و ۲۰ درصد متانول (متانول موجود دراین محلول، ازفعالیت داخلی GUS که در بعضی گیاهان گزارش شده است، جلوگیری می‌کند) قرارگرفته و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ 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 *uid*A 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 درمحیط انتخابی انجام گرفت. به این منظور، قسمتهای مختلف این گیاهان شامل برگ، دمبرگ و ریشه درمحلول X–Gluc قرار گرفته وبعد از ۲٤ ساعت که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند با استفاده از اتانول رنگ بری شده و زیر لوپ مورد بررسی قرارگرفتند.

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 در صد 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.

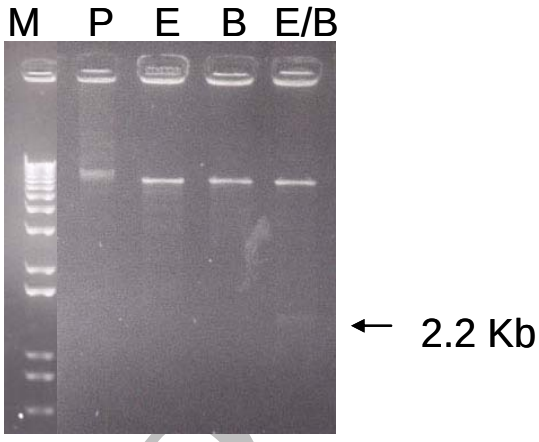
جدول ۱- اثر غلظت‌های کانامایسین روی میزان باززایی از برگ ترشک

محیط انتخابی حاوی کانامایسین (میلی گرم در لیتر)	درصد باززایی
۰	۳٦
۱۰	۱۹
۲۵	۰
۵۰	۰
۷۵	۰
۱۰۰	۰

استخراج پلاسمید pBI121 و هضم آنزیمی

پس از استخراج پلاسمید، با دو آنزیم *Eco*RI و *Bam*HI 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).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- هضم پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های برشی: M -مارکر; P- پلاسمید; E - هضم پلاسمید با آنزیم *Eco*RI ; B -هضم پلاسمید با آنزیم *Bam*HI; E/B - هضم پلاسمید با دو آنزیم *Eco*RI و *Bam*HI 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=۱ نیز القای کالوس بسیار کاهش یافت و گیاهچه‌ای باززایی نشد. در تیمارهای با زمان تلقیح (۲ و ۸ دقیقه) و غلظت باکتری ۰/۲ و ۰/۶ =OD 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 (۰/۶ و۰/۲) و زمان تلقیح ۲ دقیقه پاسخ مثبت بدست آمد. ۲ گیاه در محیط تلقیح شده با OD برابر با ۰/۶ و ۱ گیاه در محیط با شرایط OD برابر با ۰/۲ بدست آمد که رنگ آبی در آنها بطور کامل ظاهر شد (شکل۲). نرخ تراریختگی در این آزمایشات پایین بود که می‌تواند ناشی از عوامل مختلف باشد. از جمله این عوامل بافت گیاهی و سیستم باززایی از آن است. باززایی از قطعات برگ در ترشک عمدتا ازسلول‌های مریستمی 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.

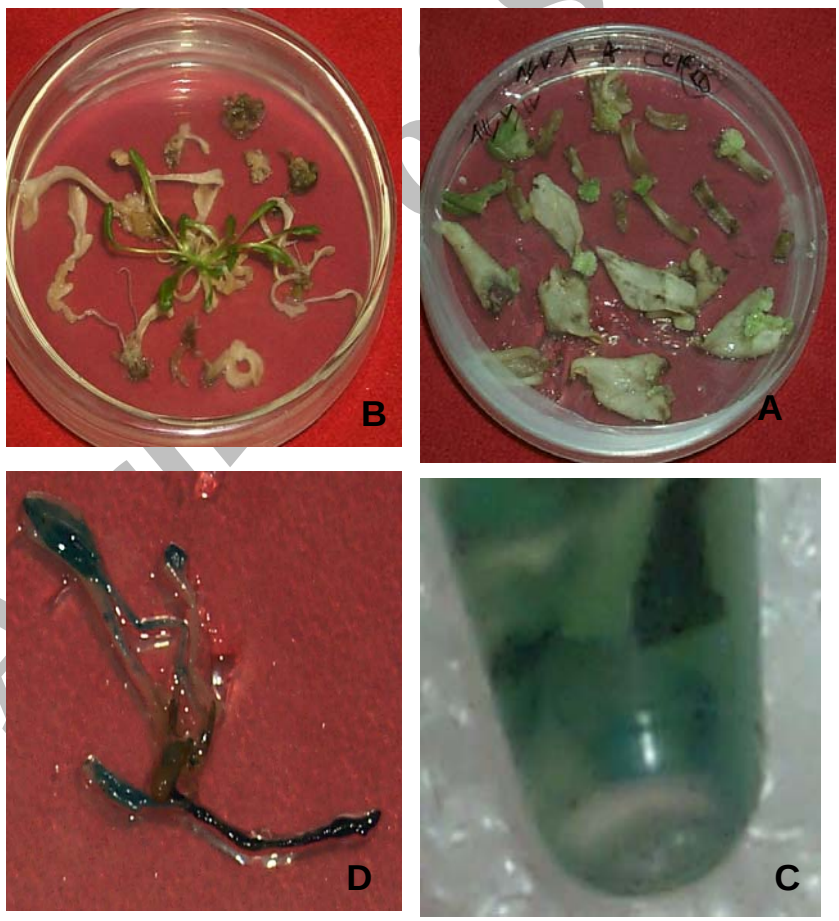
بحث

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 دوجنسی، 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 نمی شود 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

Archive of SID

www.SID.ir

آگروباکریوم به عنوان یک وسیله برای انتقال ژن بـه ترشـک قابل استفاده است. بافت‌های گیاه نـسبت بـه آنتـی بیوتیـک کانامایسین که در مطالعات انتقال ژن به عنوان عامل گـزینش گیاهی استفاده می‌شود (Park *et al*., 1998) حساس بوده و غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی گرم در لیتـر آن مـانع از رشـد کالوس و باززایی گیاه مـی‌شـوند. روش انتقـال ژن و تولیـد گیاهان تراریخته در خیلی از گیاهان بهینه سازی شده است و شاهد توسعه این روش به گیاهان بیشتری هـستیم. موفقیـت در تولید گیاهان تراریخته بستگی به کارایی روش انتقـال ژن دارد. گرچه بطور کلی عوامـل مـؤثر در انتقـال ژن بـه گیـاه شناخته شده اسـت (Birch, 1997; Gheysen *et al*., 1998; Guivarch *et al*., 1993) اما تفاوت‌هایی در گیاهان مختلف مشاهده می‌شود. ازجمله ایـن عوامـل ژنوتیـپ گیـاه، قطعـه جداکـشت، ترکیـب محـیط کـشت و سـویه مناسـب آگروباکتریوم را می‌توان نام برد. لذا بررسی اثرات این عوامل و ترکیب مناسـب و روش بهینـه انتقـال ژن بـرای هـر گیـاه ضروری است. نتایج این بررسی نشان داد کـه انتقـال ژن بـه گیاه ترشک امکان پذیر اسـت و بررسـی‌هـای بیـشتر بـرای افزایش کارایی انتقال ژن به آن، راه را بـرای اسـتفاده از ایـن گیاه در مطالعات تعیین جنسیت باز می‌نماید.



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

www.SID.ir

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 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

A.M. Shakib[1], A. Izadi-Darbandi[2], M. Ahmad-Raji[3] and M. Orujloo[4]

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 – Agricaltaral 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

Archive of SID

www.SID.ir