Plant Prod., 2023, 46(3), 353-366
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2024.43645.2099
Received: 22 May 2023
Accepted: 21 December 2023

Plant Productions

Research Article

Optimization of antibiotics during co-culture of *Petunia hybrida* leaf explants and *Agrobacterium tumefaciens* to increase gene transgenic efficiency

Azadeh Khadem[1*], Zahra Sargazi Moghaddam[2], Mahboobeh Yazdi[3], Mahdiyeh Kharrazi[4], Ahmad Sharifi[5]

1,4,5. Horticultural Plants Biotechnology Department, Research Institute for Industrial Biotechnology, Academic Centre for Education, Culture and Research (ACECR)- Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

2. Ph.D. Student of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

3. Ph.D. Graduated from the Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Citation: Khadem, A., Sargazi Moghaddam, Z., Yazdi, M., Kharrazi, M., & Sharifi, A., Optimization of antibiotics during co-culture of *Petunia hybrida* leaf explants and *Agrobacterium tumefaciens* to increase gene transgenic efficiency. (2023) *Plant Productions*, 46(3), 353-366.

Abstract

Introduction

Gene transfer by the *Agrobacterium tumefaciens* is one of the well-known methods for the production of the transgenic plants. The success rate of this method depends on the growth of the bacteria and the regeneration of the plant explants. Among these variables, the antibiotics functioning as bacterial growth regulators have mainly inhibitory effects on the plant growth. Therefore, the introduction of a successful gene transfer method which is mediated by *Agrobacterium* requires the identification of an antibiotic with an inhibitory effect on the growth of the bacteria and also has a minimal effect on the regeneration of the explants and the growth of the transgenic plants. In this regard, the present research was conducted with the aim of optimizing the antibiotic used in co-culture in order to increase the transgenic yield of *Petunia hybrida*. For this purpose, a variety of antibiotics in different concentrations were tested.

Materials and Methods

The growth rate of *A. tumefaciens* in the different medium culture with two suitable pH for the bacterial growth (7) and plant growth (5.7) in the presence of 500 mg/L of the cefotaxime antibiotic as a common antibiotic for controlling bacterial growth was investigated. Sensitivity

* **Corresponding Author:** Azadeh Khadem
E-mail: r. azadeh.khadem@jdm.ac.ir

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

tests were run. The second experiment was conducted to investigate the effect of five different antibiotics in three concentration on the regeneration of the petunia leaf explants.

Results and Discussion

The results of the bacterial sensitivity test showed that the type and concentration of salt and the pH of the medium culture significantly affect the growth rate of the bacteria. So that the highest rate of bacterial growth was observed in LB and MH medium culture at pH=7, but on the contrary, no growth was observed in MS medium culture. In addition, two antibiotics of cefotaxime and ceftriaxone at 700 mg/L concentration had the highest inhibitory effect on the bacterial growth. The results of this experiment showed that different antibiotics have different effects on the regeneration of explants and the growth of the seedlings. According to the results, the highest volume of callus and also the highest percentage of regeneration were observed in the presence of ceftizoxime and coamoxiclav antibiotics in all three concentrations and cefepime at 300 mg/L. The highest number of the seedlings was also observed in the treatment of ceftizoxime at concentrations of 300 and 500 mg/L with an average of 7.70 seedlings. In relation to the seedling growth traits, the highest number and length of root per seedling were observed in ceftizoxime at 300 mg/l and cefotaxime at the same concentration, respectively. The highest dry weight belonged to the grown seedlings in the presence of co-amoxiclav antibiotic followed by the ceftizoxime (300 mg/L).

Conclusion

The overall results of these experiments show that the seedlings which are grown in the presence of ceftizoxime antibiotic had a good growth rate, while the use of this antibiotic was effective in inhibiting the growth of *A. tumefaciens*. Therefore, we recommend that the use of ceftizoxime antibiotic in the co-culture process will be effective in increasing the efficiency of the gene transfer. Further studies will solidify these results.

Keywords: Cefotaxime, Ceftizoxime, Medium culture, pH, Seedling growth

تولیدات گیاهی

مقاله پژوهشی

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۲، ۴۶(۳)، ۳۵۳-۳۶۶
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2024.43645.2099
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۳۰

بهینه‌سازی آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در هم‌کشتی به منظور کنترل باکتری *Agrobacterium tumefaciens* و افزایش بازده تراریختی گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*)

آزاده خادم[1*]، زهرا سرگزی مقدم[2]، محبوبه یزدی[3]، سیده مهدیه خرازی[4]، احمد شریفی[5]

۱،۴،۵ - گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۲- دانشجوی دکتری،گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۳- دانش آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

چکیده

انتقال ژن با واسطه باکتری *Agrobacterium tumefaciens* یکی از روش‌های شناخته شده با هدف تولید گیاهان تراریخته است. موفقیت در این روش بستگی به نحوه رشد باکتری و باززایی ریزنمونه‌های گیاهی دارد. در این میان، آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد باکتری عمدتا اثرات بازدارندگی بر روی رشد گیاه دارند. از این‌رو معرفی یک روش انتقال ژن موفق با واسطه آگروباکتریوم نیازمند شناسایی آنتی‌بیوتیک دارای اثر بازدارندگی رشد بر باکتری و نیز کمترین تأثیر بر باززایی ریزنمونه‌های گیاهی و رشد گیاهان تراریخته است. در این راستا این پژوهش با هدف بهینه‌سازی آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در هم‌کشتی به منظور افزایش بازده تراریختی گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*) انجام شد. بدین منظور ابتدا میزان رشد باکتری *A. tumefaciens* با اندازه‌گیری تعداد کلنی‌های باکتری و مساحت تحت رشد باکتری در محیط کشت‌های مختلف دارای دو pH مناسب برای رشد گیاه (۵/۷) و رشد باکتری (۷) در حضور غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به عنوان آنتی‌بیوتیک رایج به منظور کنترل رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حساسیت سنجی باکتری نشان داد که نوع و غلظت نمک و pH محیط کشت به طور معنی‌دار بر میزان رشد باکتری تأثیرگذار است، به طوری که بیشترین میزان رشد باکتری در محیط کشت‌های LB و MH در pH= 7 مشاهده شده اما بر خلاف آن هیچ‌گونه رشدی در محیط کشت MS مشاهده نشد. علاوه بر آن، دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتریاکسون در غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر رشد باکتری بودند. آزمایش دوم به منظور بررسی اثر آنتی‌بیوتیک بر روی باززایی ریزنمونه‌های برگ گیاه اطلسی انجام شد. نتایج این آزمایش نشان داد که آنتی-بیوتیک‌های مختلف اثرات متفاوتی بر باززایی ریزنمونه‌ها و رشد گیاه‌چه حاصل از آنها دارند. طبق این نتایج بیشترین حجم پینه و درصد باززایی در حضور آنتی‌بیوتیک‌های سفتی‌زوکسیم و کوآموکسی‌کلاو در هر سه غلظت و سفپیم در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطح ۵ درصد معنی‌دار آماری مشاهده گردید. بیشترین تعداد

* **نویسنده مسئول:** آزاده خادم

رایانامه: azadeh.khadem@jdm.ac.ir

گیاه‌چه نیز در تیمار سفتی‌زوکسیم در غلظت‌های ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۷/۷۰ گیاه‌چه بود. در ارتباط با صفات رشدی گیاه‌چه، بیشترین تعداد و طول ریشه در هر گیاه‌چه به ترتیب در تیمار سفتی‌زوکسیم در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سفوتاکسیم در همین غلظت مشاهده شد. بیشترین وزن خشک متعلق به گیاه-چه‌های رشدیافته در حضور آنتی‌بیوتیک کوآموکسی‌کلاو و پس از آن آنتی‌بیوتیک سفتی‌زوکسیم (۳۰۰ mg/l) بود. مجموع نتایج این آزمایش‌ها نشان می‌دهد گیاه‌چه‌های رشدیافته در حضور آنتی‌بیوتیک سفتی‌زوکسیم از رشد مناسبی برخوردار بودند در حالی‌که استفاده از این آنتی‌بیوتیک در بازدارندگی رشد *A. tumefaciens* موثر بود. از این‌رو کاربرد آنتی‌بیوتیک سفتی‌زوکسیم در فرآیند هم‌کشتی در افزایش بازدهی انتقال ژن موثر خواهد بود.

کلمات کلیدی: رشد باکتری، رشد گیاه‌چه ، سفوتاکسیم، سفتی‌زوکسیم، محیط کشت

مقدمه

یکی از پروتکل‌های کارآمد در مهندسی ژنتیک، انتقال ژن با واسطه باکتری *Agrobacterium tumefaciens* است (Qin, 2011). آگروباکتریوم‌ها به دلیل دارا بودن پلاسمیدهای Ti و Ri توانایی آلوده کردن گیاهان و انتقال ژن به آنها را دارند، از این‌رو این باکتری‌ها به ابزار مهمی در مهندسی ژنتیک گیاهی تبدیل شده‌اند (Bahramnejad et al., 2019). این گونه‌های باکتریایی پس از آلودگی گیاه و انتقال ژن به گیاه لازم است از محیط کشت حذف شوند (De Saeger et al., 2020). در این راستا آنتی‌بیوتیک‌های مختلف اثرات بازدارندگی متفاوتی بر رشد باکتری دارند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به عنوان یکی از قدیمی‌ترین و پرمصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها در دیواره سلولی باکتری تداخل ایجاد می‌کنند. دیواره سلولی باکتری یک ساختار پلی‌ساکارید است که اکثر سلول‌های باکتریایی را احاطه کرده و از غشای سیتوپلاسمی آنها در برابر پارگی اسمزی محافظت می-کند. این دیواره از پپتیدوگلیکان ساخته شده است که از زنجیره‌های گلیکان با پپتیدهای متصل برای اتصال عرضی گلیکان‌های مجاور استفاده می‌کند. بتالاکتام‌ها با غیرفعال کردن پروتئین‌های متصل شونده به پنی-سیلین، یکپارچگی زنجیره‌های پپتیدوگلیکان را از بین می‌برند (Cho et al., 2014). این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها جزء رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در آزمایش‌های انتقال ژن با واسطه *A. tumefaciens* هستند. با این حال، تولید بتالاکتامازها دلیل اصلی مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی و به خصوص *A. tumefaciens* است. بنابراین جستجوی بهترین آنتی‌بیوتیک بتالاکتام در برابر سویه‌های *A. tumefaciens* از اهمیت بالایی برخوردار است (Brouwers et al., 2020). از سوی دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر اثر بازدارندگی بر باکتری *A. tumefaciens* ممکن است بر روی سلول‌های گیاهی نیز اثرات سمی داشته باشند که بر توانایی باززایی گونه‌های مختلف گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیرگذار است (Ziemienowicz, 2014). مطالعات متعدد در کشت‌های مختلف نشان داده است برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر کنترل رشد باکتری ممکن است در رشد و نمو ریزنمونه تداخل ایجاد کند (Liang et al., 2019؛ Gerszberg et al., 2019؛ Mamidala et al., 2009؛ Meng et al., 2014). بنابراین موفقیت انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم به نوع و غلظت آنتی‌بیوتیک برای حذف موثر *Agrobacterium tumefaciens* در ریزنمونه‌ها نیز بستگی دارد (Qin, 2011 ؛ Lin, 1995 ؛ Mineykina, 2020).

اطلسی یکی از محبوب‌ترین گیاهان زینتی گلدانی از تیره Solanaceae (Goldani and Kamali, 2016) و بومی آمریکای جنوبی است (Tsuda et al., 2004). ارقام مختلف این گیاه دارای گل‌های با اندازه متفاوت همراه با ساقه و برگ چسبنده می‌باشند (Bombarely et al., 2016). این گیاه به دلیل دارا بودن ویژگی‌های متمایز مرفولوژیکی و ژنتیکی، به عنوان گیاه مدل در تحقیقات ژنتیک مولکولی گیاهان زینتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Gerats and Vandenbussche, 2005؛ Gübitz et al., 2009). با توجه به اهمیت بهینه‌سازی شرایط تراریختی ریزنمونه‌های گیاه اطلسی با واسطه *A. tumefaciens* این مطالعه با هدف بررسی اثر بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و باززایی ریزنمونه‌ها در شرایط محیطی گوناگون و نیاز به بررسی دقیق آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌های میکروبی

تعیین نوع و pH محیط کشت بر میزان رشد باکتری و اثر بازدارندگی آنتی‌بیوتیک

سوسپانسیون باکتری *A. tumefaciens* با غلظت نیم مک فارلند[1] از استوک گلیسرول موجود در فریزر۸۰- درجه سلسیوس به میزان دو برابر رقیق شده و با حجم ۲۰ میکرولیتر در سطح پلیت حاوی محیط کشت بصورت یکنواخت توزیع شد. باکتری در ۴ نوع محیط کشت مختلف شامل موراشیگ اسکوگ[2]، ½ MS، لوریا برتانی[3] و مولر هینتون[4] دارای pH ۵/۷ (مناسب برای رشد گیاه) و یا ۷ (مناسب برای رشد باکتری) تنظیم شد. به منظور بررسی اثر محیط کشت‌ها بر میزان عملکرد آنتی‌بیوتیک، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به عنوان آنتی‌بیوتیک رایج در تحقیقات تراریختی (Jalilian et al., 2017) به تمام محیط کشت‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴ روز قرار داده شدند. برای بررسی میزان رشد باکتری، تصویربرداری از نمونه‌ها پس از گذشت دو، سه و چهار روز از زمان کشت انجام شده و میزان رشد آنها از طریق شمارش تعداد کلنی‌های باکتری و محاسبه مساحت تحت رشد کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

حساسیت سنجی میکروبی

ابتدا باکتری در محیط کشت LB مایع کشت شده و جهت هوادهی برای رشد بهتر، بر روی شیکر با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از گذشت ۱۶ ساعت، سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد و بر روی محیط کشت MH[5] حاوی ۱۵ گرم در لیتر آگار و pH معادل ۷ کشت شد. جهت بررسی قدرت آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استفاده شد. دیسک‌های ۶ میلی‌متری در شرایط استریل به آب مقطر بدون آنتی‌بیوتیک به عنوان شاهد و ۵ نوع آنتی‌بیوتیک مختلف کوآموکسی‌کلاو، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتی‌زوکسیم و سفپیم در سه غلظت ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر آغشته و تعداد ۳ دیسک پس از اندکی آبگیری، در داخل پلیت‌ها در فاصله مناسب قرار گرفت.

آنالیز تصویر

نحوه رشد کلنی‌های باکتری به وسیله آنالیز تصاویر آنها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ انجام شد. با توجه به اینکه با گذشت مدت زمان کشت و رشد باکتری، کلنی‌ها با یکدیگر مقداری همپوشانی داشتند، سطح آستانه نرم‌افزار به تدریج از ۳ برای شمارش کلنی‌های مجزا تا ۸ برای شمارش کلنی‌های همپوشان انتخاب شد تا از سویی، امکان گزینش کلنی‌های همپوشان نیز وجود داشته و از سوی دیگر، نقاطی غیر از کلنی‌های باکتری توسط نرم‌افزار شناسایی نشود. همچنین سطح مقطع پتری‌دیش‌ها نیز به عنوان محدوده رشد باکتری نیز گزینش شد. پس از شمارش تعداد کلنی‌ها، مساحت تحت رشد آنها به پیکسل محاسبه شده و به منظور تبدیل آن به میلی‌متر مربع از سطح پتری‌دیش به عنوان شاخص مساحت

1- McFarland
2- MS
3- LB
4- MH
5- Mueller–Hinton

استفاده شد. محاسبه قطر هاله عدم رشدی به پیکسل انجام شد و بر اساس شاخص به میلی‌متر تبدیل شد.

آزمایش‌های گیاهی

تهیه مواد گیاهی و کشت ریزنمونه‌ها

ابتدا بذرهای گیاه *Petunia hybrida* در سینی کشت حاوی بستر کوکوپیت همراه با پرلیت کشت شدند. پس از گذشت یک ماه از جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاه‌چه‌ها، برگ‌های جوان آنها جدا شده و به عنوان ریزنمونه استفاده شد. برای این آزمایش از محیط کشت پایه MS فاقد هورمون به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار استفاده شد. اسیدیته محیط کشت (pH) در حدود ۵/۷ تنظیم شد و سپس محیط کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. برگ‌های جوان پس از جداسازی ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در آب جاری شستشو شدند و سپس به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد قرار گرفتند. در نهایت شستشوی نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار انجام شد. به منظور کشت ریزنمونه‌ها، قطعاتی به طول ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر از برگ‌ها تهیه و روی دستمال کاغذی استریل قرار داده شد تا آب اضافی آن‌ها گرفته شود، سپس به محیط کشت منتقل شدند. در این آزمایش، ۳ پتری‌دیش معادل ۳ تکرار در نظر گرفته شده و در هر پتری‌دیش، ۵ ریزنمونه قرار گرفت. ریزنمونه‌ها پس از کشت به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه و دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند.

هم‌کشتی با آگروباکتریوم و تیمار باززایی

پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت اولیه برگ، ریزنمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند و سپس به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA منتقل شدند. پس از گذشت سه روز به منظور حذف باکتری‌ها از محیط کشت، از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف استفاده شد. با توجه به گزارش‌های پیشین (Petri et al. 2007، Gambhir et al. 2017)، ۵ نوع آنتی‌بیوتیک مختلف آزمایش پیشین در سه غلظت ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر و نیز شاهد فاقد آنتی‌بیوتیک در فرآیند باززایی ریزنمونه‌ها استفاده شد. گیاه‌چه‌ها پس از رشد از بافت پینه جدا شده و به منظور القای تشکیل ریشه به محیط کشت ½ MS فاقد هورمون منتقل شدند. در طی باززایی و رشد گیاه‌چه‌ها، صفاتی شامل درصد پینه‌زایی، باززایی، تعداد گیاه‌چه تعداد و طول ریشه، تعداد و طول برگ و نیز وزن خشک گیاه مورد بررسی قرار گرفت. درصد پینه‌زایی و باززایی ریزنمونه‌ها طبق فرمول‌های زیر محاسبه شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی دارای ۶ تیمار آنتی‌بیوتیک در ۳ غلظت همراه با ۳ تکرار انجام شد.

درصد پینه‌زایی= (تعداد ریزنمونه‌های دارای پینه/تعداد کل ریزنمونه‌ها)×۱۰۰

درصد باززایی= (تعداد ریزنمونه‌های باززای شده/تعداد ریزنمونه‌های دارای پینه)×۱۰۰

تجزیه و تحلیل‌های آماری

آماده سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP 8 انجام شد. در تمام آزمایش‌ها، مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطح معنی‌دار ۵ درصد انجام شد. نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

نحوه رشد باکتری *A. tumefaciens* در محیط کشت‌های مختلف حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم

بررسی تعداد کلنی‌های باکتری و مساحت تحت رشد آنها نشان داد که روند رشد باکتری در محیط کشت‌های مختلف تقریبا مشابه با یکدیگر بود، به طوری که تعداد کلنی‌های رشد یافته تا روز سوم پس از کشت به مقدار قابل توجهی افزایش یافته اما پس از آن، در تمام محیط کشت‌ها تقریبا ثابت باقی ماند (شکل ۱). نتایج نشان داد که تا روز سوم، مساحت تحت رشد باکتری‌ها نیز همگام با افزایش تعداد کلنی‌ها افزایش یافته اما پس از آن نیز مساحت کلنی‌های رشد یافته همچنان به روند افزایشی خود با شیب کمتری ادامه داده است تا آنجا که در روز

چهارم، برخی از کلنی‌های باکتری با یکدیگر هم‌پوشانی داشتند (شکل ۲). از این‌رو، بیشترین تعداد کلنی باکتری *A. tumefaciens* با کمترین میزان هم‌پوشانی در روز سوم پس از کشت بدست آمد. بررسی اثر محیط کشت و pH آن بر میزان رشد باکتری نشان داد که این دو عامل تأثیر چشمگیری بر تعداد و مساحت تحت رشد کلنی‌های باکتری داشته است.

طبق نتایج این آزمایش مشخص شد در محیط کشت MS در هر دو pH مورد مطالعه هیچ باکتری رشد نکرده و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در این محیط کشت بیشترین تأثیر ممانعت از رشد باکتری را داشته است. بیشترین تعداد کلنی رشد یافته و مساحت تحت رشد کلنی‌ها به ترتیب در محیط کشت LB و MH با pH= 7 بود که تفاوت معنی‌دار با دو محیط کشت دیگر داشت (شکل ۲ و ۳). در تحقیقات پیشین، اثر نمک‌های محیط کشت بر پروفایل متابولیت‌های باکتری *Escherichia coli* نشان داد که محیط کشت به شدت بر روند متابولیسم سلولی تأثیرگذار است (Kim and Kim, 2017). از سوی دیگر، تحقیقات مختلف نشان داده است که تجزیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به شدت به pH وابسته است به طوری که حداکثر پایداری آلفا آمینو بتالاکتام‌ها (مانند آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین) و بتالاکتام‌های فاقد زنجیره جانبی گروه آمینو تقریبا در pH بین ۴ تا ۵ بوده و تغییر pH از محدوده پایداری این آنتی‌بیوتیک‌ها سبب افزایش سرعت تجزیه آنها شد (Hou and Poole ,1971). در آزمایشی، Brouwers و همکاران (۲۰۲۰) پایداری آنتی‌بیوتیک مسیلینام را در دو محیط کشت‌های MOPS[1] و LB با pHهای مختلف مورد بررسی قرار دادند. طبق این نتایج، نیمه‌عمر آنتی‌بیوتیک مسیلینام در محیط کشت MOPS و LB با pH=۷/۴ به ترتیب حدود ۲ ساعت و ۵-۴ ساعت برآورد شد اما با تنظیم pH ، پایداری آنتی بیوتیک مسیلینام تا نیمه عمر تقریبا ۶ ساعت افزایش یافت.

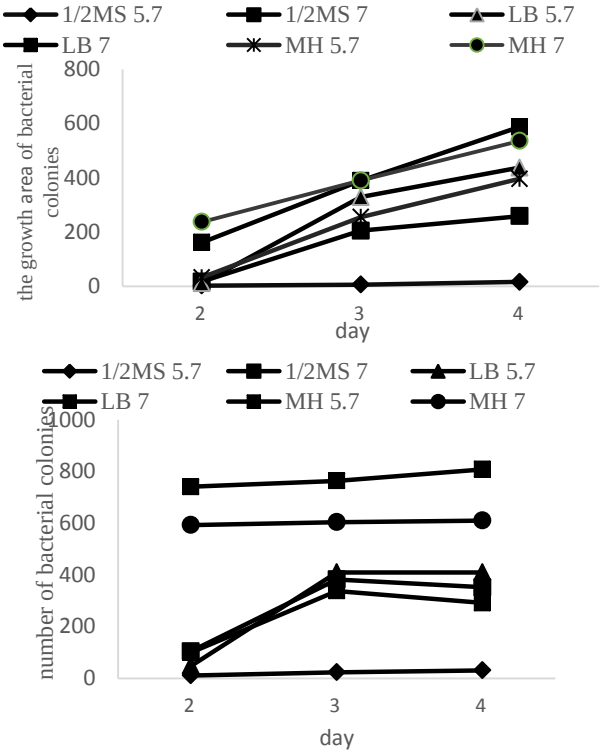
1- (N-Morpholino)propane sulfonic acid (MOPS)

اثر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر بازدارندگی رشد باکتری *A.tumefaciens*

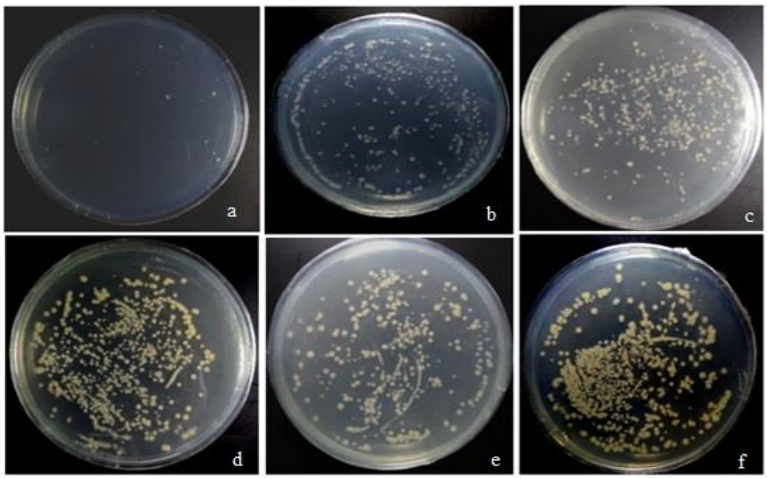
نتایج این آزمایش نشان داد که میزان رشد باکتری به طور معنی‌دار تحت تأثیر نوع و غلظت آنتی‌بیوتیک قرار گرفت. طبق این نتایج، در تیمار شاهد (فاقد آنتی‌بیوتیک) باکتری به طور کامل در پیرامون دیسک‌های آنتی‌بیوگرام رشد نموده و هیچ گونه هاله عدم رشدی مشاهده نشد. نتایج نشان داد که بین انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و غلظت‌های مختلف آنها از نظر قطر هاله‌ی عدم رشد تفاوت معنی‌داری وجود داشت و با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها اثر بازدارندگی آن‌ها به صورت قطر هاله عدم رشد در پیرامون دیسک‌ها افزایش یافت (شکل ۴ و ۵). بر اساس نتایج بدست آمده، غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کوآموکسی‌کلاو بسیار ضعیف عمل نموده و همانند تیمار شاهد تأثیری بر کنترل رشد باکتری *A. tumefaciens* نداشت. از سوی دیگر، بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری *A. tumefaciens* در غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتریاکسون مشاهده شد که به ترتیب ۱/۹۲ و ۱/۹۰ سانتی‌متر بود. این نتایج بیانگر آن است که به منظور بازدارندگی رشد باکتری *A. tumefaciens*، دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتریاکسون از قدرت بیشتری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی برخوردار بودند. تفاوت اثر بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر متقابل آن‌ها با نمک‌های معدنی موجود در محیط کشت در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده است (Bernier & Surette et al., 2006, Wiebke, 2017). در پژوهشی تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شامل جنتامایسین، کانامایسین، مترونیدازول، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین بر جلوگیری از رشد باکتری *E. coli* در سه محیط کشت TSB[2]، MH و M9 مورد بررسی قرار گرفت (Ratiu et al., 2019). در این آزمایش از آنالیزهای MALDI-TOF MS که برای تشخیص سریع تغییراتی که در پروفایل پروتئین ریبوزومی رخ می‌دهد، استفاده شد. بر اساس این آنالیزها نحوه رشد باکتری در تیمارهای مورد بررسی با یکدیگر متفاوت بود. علاوه بر این، تجزیه و

2- Trypticasein Soy Broth

تحلیل‌های فلوسایتومتری جهت ارزیابی نتایج MALDI-TOF MS از طریق تعیین نسبت سلول‌های مرده به زنده انجام شد. طبق نتایج آن‌ها، از میان آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بودند به طوری که بالاترین نسبت سلول‌های مرده به زنده را داشتند. با این حال برای باکتری‌های کشت شده در محیط کشت TSB و MH کاهش مداوم باکتری‌های زنده از ۳ تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح با دو آنتی‌بیوتیک فوق مشاهده شد، اما درباره باکتری‌های کشت شده در محیط کشت M9 روند افزایشی مشاهده گردید.



Figureure 1. Growth of *A. tumefaciens* in different culture media containing 500 mg/L cefotaxime.



Figureure 2. The effect of the type and pH of the culture media on the number and the growth area of bacterial colony on the fourth day of cultivation. a) ½ MS medium culture with pH=7.5, b) ½ MS medium culture with pH=7, c) LB medium culture with pH=7.5, d) LB medium culture with pH=7, e) MH medium culture with pH=7.5, f) MH medium culture with pH=7.

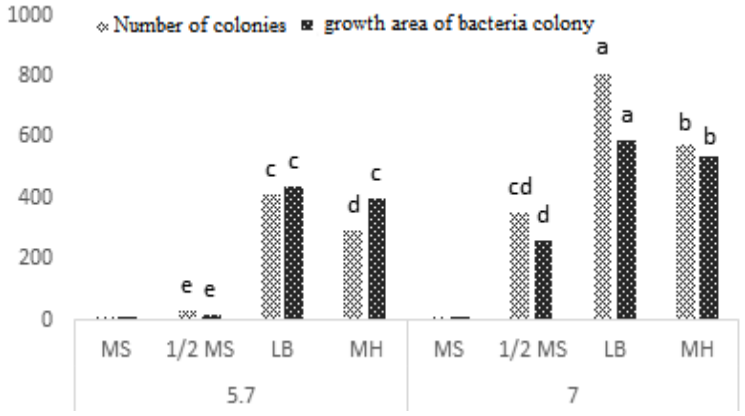


Figure 3. The effect of the type and pH of the culture media on the number and growth area of bacteria colonies. Means with the same letters indicate no significant difference (P ≤ 0.05).

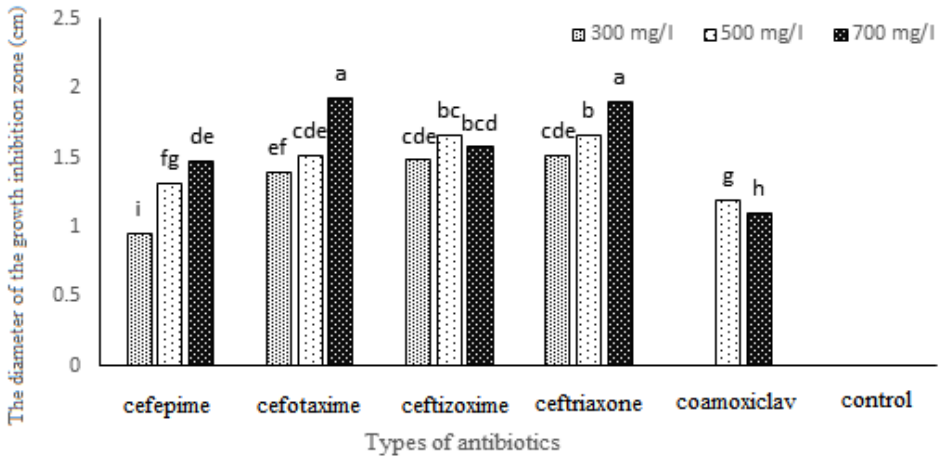


Figure 4. The effect of the type and concentration of different antibiotics on the diameter of the growth inhibition zone. Means with the same letters indicate no significant difference (P ≤ 0.05).

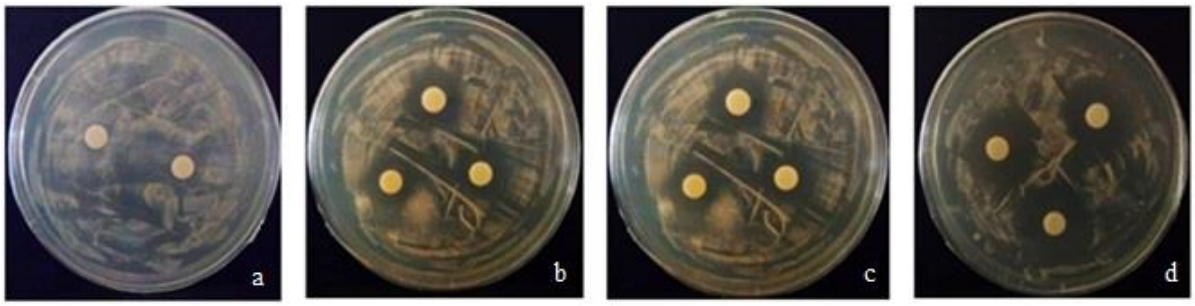


Figure 5. The effect of different concentrations of cefotaxime on the inhibition zone diameter in the disk diffusion method. a) control treatment (no antibiotic), b) 300 mg/L, c) 500 mg/L, d) 700 mg/L.

اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر پینه‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های گیاه اطلسی

پس از گذشت ۱۲ تا ۱۵ روز پینه‌زایی در لبه‌های برگ شروع شده و یک ماه پس از کشت اولیه بیشترین حجم پینه به دست آمد. طبق نتایج حاصل نوع آنتی‌بیوتیک بر حجم پینه القایی اثر معنی‌دار داشت، به طوری که بیشترین حجم پینه در ریزنمونه‌های شاهد و تیمار آنتی‌بیوتیک‌های سفتی‌زوکسیم و کوآموکسی‌کلاو

در هر سه غلظت و سفپیم در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر تشکیل شد (جدول ۱ و شکل ۶). در گزارش‌های پیشین، استفاده از سفوتاکسیم رشد پینه و اندام‌زایی را در گیاهان گندم، تریتیکاله (Asif et al., 2013)، جو (Chernobrovkina et al., 2004) و ذرت (Danilova et al., 2004) افزایش داد، در حالی که با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم و سفتریاکسون حجم پینه تشکیل شده بر روی ریزنمونه‌ها کاهش یافت (جدول ۱).

در تحقیقات پیشین گزارش شده است که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کاربنی‌سیلین و پنی‌سیلین عملکردی مشابه هورمون‌های گیاهی دارند. این آنتی‌بیوتیک‌ها پس از قرار گیری در محیط کشت تجزیه شده و سطوح فعال فیزیولوژیکی هورمون اکسین فنیل استیک اسید را ایجاد می‌کنند که مکانیسم تحریک رشد به سمت تشکیل جوانه ناشی از آنتی‌بیوتیک را توجیه می‌کند (Padilla et al., 2010). بررسی میزان باززایی داده‌ها مشخص نمود پس از شاهد، غلظت‌های ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک‌های سفتی‌زوکسیم و کوآموکسی‌کلاو و غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفپیم بیشترین میزان باززایی را به خود اختصاص دادند. این در حالی است که با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون، درصد باززایی و نیز تعداد نمونه باززا شده کاهش یافت (جدول ۱).

با بررسی تأثیر نوع آنتی‌بیوتیک بر میانگین تعداد گیاه‌چه مشخص گردید که بیشترین تعداد گیاه‌چه با ۱۲/۳۳ عدد مربوط به تیمار شاهد بود و پس از آن تیمار آنتی‌بیوتیک سفتی‌زوکسیم در دو غلظت ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفت (جدول ۱ و شکل ۷). کمترین تعداد گیاه‌چه نیز در تیمار آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (جدول۱). طبق این نتایج برخلاف اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری، برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه در غلظت‌های پایین رشد و نمو گیاه را تحریک می‌کنند. از این‌رو، عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است نسبت هورمونی را در محیط‌های کشت پیچیده کند و بر کارایی باززایی تأثیر بگذارد (Padilla et al., 2011).

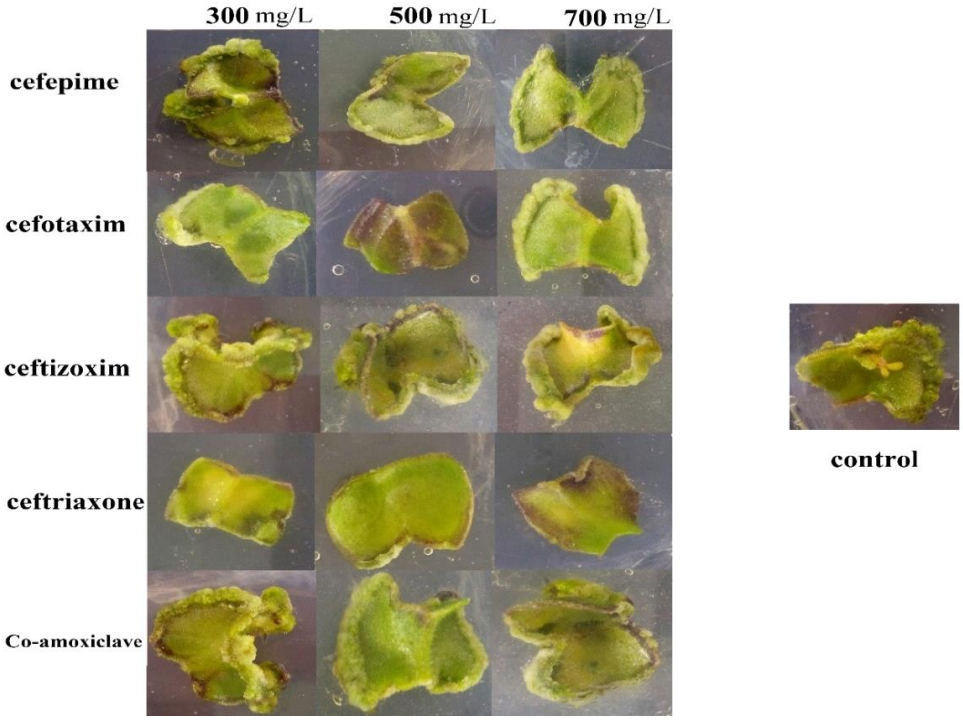


Figure. 6. The effect of type and concentration of antibiotics on callus production of petunia leaf explants.

Table 1. The effect of antibiotics used on the regeneration characteristics of the explants. Means with the same letters indicate no significant difference (P ≤ 0.05).

Regenerated seedlings per explant (NO.)	Regeneration (%)	Callus formation (%)	Concentration (mg/L)	Antibiotic treatment
12.33^{a}	100^{a}	100^{a}		Control without antibiotics
3.03^{d-g}	78^{b}	100^{a}	300	cefepime
2.70^{d-g}	30^{d}	85^{ab}	500	
0.90^{fgh}	5^{e}	92^{ab}	700	
3.13^{def}	22^{de}	92^{ab}	300	cefotaxime
0.80^{gh}	10^{e}	29^{c}	500	
0.40^{h}	7^{e}	85^{ab}	700	
7.87^{b}	49^{cd}	100^{a}	300	ceftizoxime
7.60^{b}	75^{b}	100^{a}	500	
3.53^{de}	78^{b}	100^{a}	700	
2.80^{d-g}	59^{bc}	80^{b}	300	ceftriaxone
4.46^{cd}	39^{cd}	79^{b}	500	
1.80^{e-h}	8^{e}	30^{c}	700	
6.53^{bc}	55^{bc}	100^{a}	300	coamoxiclav
3.70^{de}	78^{b}	100^{a}	500	
4.00^{de}	75^{b}	100^{a}	700	

اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر صفات رشدی گیاه

بررسی اثر آنتی‌بیوتیک بر میزان القای ریشه‌ها نشان داد بیشترین تعداد ریشه در گیاه‌چه‌های رشدیافته در شاهد (۳۱/۳۳) و تیمار آنتی‌بیوتیک سفتی‌زوکسیم در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۳۰/۸۸) مشاهده شد. این در حالی است که گیاه‌چه‌های رشدیافته در آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر کمترین تعداد ریشه را تشکیل دادند (جدول ۲). این نتایج همسو با مطالعه صورت گرفته بر روی کلم چینی است که آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم را بازدارنده تمایز اندام هوایی و ریشه گزارش کرده است (Meng et al., 2014). طبق نتایج حاصل از این آزمایش، گیاه‌چه‌های رشدیافته در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم بیشترین طول ریشه را داشتند اما گیاه‌چه‌های رشدیافته در غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر این آنتی‌بیوتیک کمترین طول ریشه در میان تیمارهای آزمایش را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). همچنین این نکته حائز اهمیت است که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتی‌زوکسیم در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر طول ریشه را نسبت به شاهد نیز افزایش داده است (جدول ۲). اثر تحریک کننده آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام ممکن است به دلیل شباهت ساختاری آنها به هورمون اکسین باشد که آنها را قادر می‌سازد تا نقشی مشابه هورمون‌های گیاهی را ایفا کنند (Mineykina et al., 2020).

در بررسی صفت تعداد برگ، بیشترین تعداد برگ مربوط به گیاه‌چه‌های رشدیافته در حضور آنتی‌بیوتیک کوآموکسی‌کلاو در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و بعد از آن سفتریاکسون در غلظت مشابه بود (جدول ۲). کمترین تعداد برگ نیز در حضور آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در غلظت‌های ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (جدول ۲). طبق نتایج تحقیقات پیشین، سلول‌های گیاهی در شرایط تنش آنتی‌بیوتیکی فعالیت‌های فیزیولوژیکی خود را برای مقابله با تغییرات محیط پیرامون خود تغییر می‌دهند. گزارش شده است که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیدازها و نیز محتوای پرولین در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که بیانگر فعالیت سیستم دفاعی گیاه برای محافظت از بافت‌های گیاهی در برابر اثرات سمی آنتی‌بیوتیک‌ها است (Qin et al., 2011).

Table 2. The effect of the antibiotics on the growth traits of seedlings. Means with the same letters indicate no significant difference (P ≤ 0.05).

Dry weight (mg)	Leaf length (mm)	Number of leaves	Root length (mm)	Number of roots	Concentration (mg/L)	Antibiotic treatment
216.66^{a}	16.66^{ab}	14.33^{ab}	29.00^{bc}	31.33^{a}		Control without antibiotics
103.11^{fgh}	16.66^{ab}	13.44^{a-d}	23.33^{cde}	23.11^{cde}	300	cefepime
97.22^{gh}	13.88^{abc}	12.22^{a-e}	26.88^{bcd}	20.22^{c-f}	500	
81.11^{h}	18.44^{a}	12.88^{a-d}	18.66^{efg}	21.88^{c-f}	700	
179.11^{bc}	16.00^{ab}	13.22^{a-d}	37.44^{a}	16.55^{efg}	300	cefotaxime
151.44^{de}	14.00^{ab}	9.22^{e}	7.22^{ij}	15.22^{fg}	500	
94.44^{gh}	9.00^{c}	9.44^{e}	1.44^{j}	4.66^{h}	700	
179.66^{bc}	15.22^{ab}	13.77^{a-d}	30.66^{ab}	30.88^{a}	300	ceftizoxime
130.00^{ef}	14.11^{ab}	10.77^{de}	23.22^{cde}	23.77^{bcd}	500	
153.00^{cde}	15.66^{ab}	14.11^{abc}	12.55^{ghi}	26.55^{abc}	700	
82.55^{h}	15.88^{ab}	15.11^{ab}	18.88^{efg}	15.77^{fg}	300	ceftriaxone
114.66^{fg}	14.22^{ab}	12.77^{a-d}	14.88^{fgh}	22.22^{c-f}	500	
82.33^{h}	13.66^{abc}	11.88^{b-e}	12.33^{ghi}	20.88^{c-f}	700	
184.00^{b}	13.88^{abc}	15.22^{a}	20.44^{def}	18.33^{def}	300	coamoxiclav
174.88^{bcd}	12.00^{bc}	13.22^{a-d}	16.22^{fgh}	21.11^{c-f}	500	
174.11^{bcd}	18.44^{a}	13.44^{a-d}	9.66^{hi}	9.66^{gh}	700	

طبق نتایج این آزمایش، تفاوتی بین طول برگ در تیمارهای مختلف مشاهده نشد (جدول ۲). از سوی دیگر نتایج مقایسه میانگین نشان داد که شاهد و پس از آن تیمار کوآموکسی‌کلاو در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین وزن خشک را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). استفاده از سفتریاکسون در غلظت ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سفپیم در غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز منجر به ثبت کمترین وزن خشک گیاه‌چه‌ها گردید (جدول ۲). احتمالاً افزایش عملکرد در غلظت‌های پایین آنتی‌بیوتیک نسبت به غلظت‌های بالا به دلیل سمیت کمتری است که در برهم‌کنش با ترکیبات محیط کشت به وجود می‌آید (McManus et al., 2002).

نتیجه‌گیری

نحوه عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها در سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت بسیار پیچیده است و دارای جنبه‌های فیزیولوژیکی بسیاری است. اثرات ناشناخته آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآیند انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم منجر به تغییر میزان و نحوه باززایی گیاهان تراریخته شده است. از این‌رو در این مطالعه اثر پنج نوع آنتی‌بیوتیک سفپیم، سفتی‌زوکسیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و کوآموکسی‌کلاو در غلظت‌های مختلف بر میزان بازدارندگی رشد باکتری *A. tumefaciens* و نحوه باززایی و رشد گیاه‌چه‌های اطلسی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج کشت میکروبی در حضور آنتی‌بیوتیک نشان داد که میزان رشد باکتری تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله نوع محیط کشت، pH و تیمار آنتی‌بیوتیک قرار گرفت. در این راستا دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتریاکسون از قدرت بیشتری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بر بازدارندگی رشد باکتری برخوردار بودند. نتایج کشت ریزنمونه گیاهی در حضور آنتی‌بیوتیک نیز نشان داد در بیشتر موارد، استفاده از آنتی‌بیوتیک موجب کاهش صفات باززایی ریزنمونه و صفات رشدی گیاه شده است. در میان آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، کاربرد آنتی‌بیوتیک سفتی‌زوکسیم در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر را می‌توان مناسب‌ترین تیمار آنتی‌بیوتیک معرفی کرد، چرا که علاوه بر کنترل

مناسب رشد باکتری، کمترین تغییرات را در صفات مورد بررسی نسبت به شاهد به همراه داشت. با توجه به نتایج به دست آمده، بهینه‌سازی شرایط محیطی، نوع و غلظت آنتی‌بیوتیک می‌تواند نقش موثری را در کنترل رشد باکتری ایفا کند. بنابراین در نظر گرفتن ساختار، عملکرد و اثر آنتی‌بیوتیک بر رشد سلولی و ریزنمونه‌ها برای بهینه‌سازی انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم از اهمیت بالایی برخوردار است. نتایج این پژوهش در دستیابی به پروتکلی کارآمد برای حذف آگروباکتریوم در مسیر انتقال ژن به گیاه اطلسی مؤثر واقع شده و در تحقیقات بعدی با هدف افزایش بازده این روش در سایر گیاهان زینتی نیز کمک شایانی خواهد نمود. علاوه بر آن با توجه به رشد متفاوت باکتری *A. tumefaciens* در محیط کشت‌های مورد بررسی در این پژوهش، پیشنهاد می‌شود به منظور کنترل رشد باکتری در شرایط درون-شیشه‌ای، نوع و میزان عناصر غذایی و pH محیط کشت نیز مورد بررسی قرار گیرد.

سپاس گزاری

محققان این پژوهش از پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی گروه بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی جهاد دانشگاهی مرکز مشهد به دلیل فراهم نمودن زیرساخت و امکانات آزمایشگاهی قدردانی می‌نمایند.

References

Amin, A., Ahmad, W., Khan, G. M., & Khan, M. A. (2012). Complete elimination of indigenously isolated *Agrobacterium tumefaciens* strains by quinolone and metallo β-Lactam antibiotics. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences, 5*(1), 1-7.

Asif, M., Eudes, F., Randhawa, H., Amundsen, E., Yanke, J., & Spaner, D. (2013). Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. *Plant Cell Reports, 32*(10), 1637-1646.

Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., & Jha, S. (2019). A critical review on use of Agrobacterium rhizogenes and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances, 37*(7), 107405.

Bernier, S.P., & Surette, M.G. (2017). Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments, *Front. Microbiol*, 4-20.

Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, C. S., & Bruggmann, R. (2016). Insight into the evolution of the solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature plants, 2*(6), 1-9.

Brouwers R. Vass H. Dawson A. Squires T. Tavaddod S., & Allen R.J. (2020). Stability of β-lactam antibiotics in bacterial growth media. *PLoS One*, 15(7), e0236198.

Chernobrovkina, M. A., Karavaev, C. A., Kharchenko, P. N., & Melik-Sarkisov, O. S. (2004). Somatic embryogenesis and morphogenetic potential of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) in the system of technological genetic transformation. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences, 31*(4), 332-336.

Cho, H., Uehara, T., & Bernhardt, T. G. (2014). Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell, 159*(6), 1300-1311.

Danilova, S. A., & Dolgikh, Y. I. (2004). The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. *Russian Journal of Plant Physiology, 51*(4), 559-562.

De Saeger, J., Park, J., Chung, H. S., Hernalsteens, J.-P., Van Lijsebettens, M., Inzé, D., & Depuydt, S. (2021). Agrobacterium strains and strain improvement: Present and outlook. *Biotechnology Advances, 53*, 107677.

Gambhir, G., Kumar, P. & Srivastava, D.K. (2017). Effect of antibiotic sensitivity on different cultured tissues and its significance in genetic transformation of cabbage *Brassica oleracea*. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 10(4), pp.652-661.

Gerats, T. & Vandenbussche, M. (2005). A model system for comparative research: Petunia. *Trends in plant science*, *10*(5), pp.251-256.

Gerszberg, A., & Grzegorczyk-Karolak, I. (2019). Influence of selected antibiotics on the tomato regeneration in in vitro cultures. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 47*(3).

Goldani, M., & Kamali, M. (2016). Evaluation of culture media including vermicompost, compost and manure under Drought Stress in Iranian Petunia (*Petunia hybrida*). *Plant Productions*, 39(3), 91-100. doi:10.22055/ppd.2016.12335. [In Persian]

Gübitz, T., Hoballah, M.E., Dell'Olivo, A. & Kuhlemeier, C. (2009). Petunia as a model system for the genetics and evolution of pollination syndromes. In *Petunia* pp. 29-49, Springer, New York, NY.

Hou, J., & Poole, J.W. (1971). ß -lactam antibiotics: Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure, *Journal of Pharmaceutical Sciences* .60 (4), 503-532.

Kim, J. & Kim, K.H. (2017). Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem*. 57, 64 –71.

Jalilian, A., Esmaili, A., Nazarian Firozabadi, F., & Hosseini, S. Z. (2017). Induction of Transgenic Hairy Roots in Medicinal Plant Poppy (*Papaver somniferum* L.) by *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation. *Plant Productions*, 39(4), 1-14. doi:10.22055/ppd.2017.12057. [In Persian]

Liang, C., Wu, R., Han, Y., Wan, T., & Cai, Y. (2019). Optimizing suitable antibiotics for bacterium control in micropropagation of cherry rootstock using a modified leaf disk diffusion method and E test. *Plants*, *8*(3), 66.

Lin, J.J., Assad-Garcia, N., & Kuo, J. (1995). Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Science*, *109*(2), 171-177.

McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, *40*(1), 443-465 .

Mamidala, P., & Nanna, R. S. (2009). Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato. *Plant Omics*, *2*(4), 135-140.

Meng, Q., Liu, Z., Zhang, Y., Liu, C., Ren, F., & Feng, H. (2014). Effects of antibiotics on in vitro-cultured cotyledons. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *50*(4), 436-441.

Mineykina, A., Shumilina, D., Bondareva, L., Soldatenko, A., & Domblides, E. (2020). Effect of beta-lactam antibiotics on microspore embryogenesis in Brassica species. *Plants*, *9*(4), 489.

Padilla, I., & Burgos, L., (2010). Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*, *29*(11), 1203-1213.

Petri, C., López-Noguera, S., Alburquerque, N., Egea, J., & Burgos, L. (2008). An antibiotic-based selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency. *Plant science*, 175(6), pp.777-783.

Qin, Y., Teixeira da Silva, J. A., Bi, J., Zhang, S., & Hu, G. (2011). Response of in vitro strawberry to antibiotics. *Plant Growth Regulation*, *65*(1), 183-193.

Ratiu, I.A., Plugaru, VR., Pomastowski, P., Milanowski, M., Mametov, R., Bocos-Bintintan, V., & Buszewski, B. (2019). Temporal influence of different antibiotics onto the inhibition of Escherichia coli bacterium grown in different media. *Analytical. Biochemistry*, *585*, 113407.

Tsuda, SH., Fukui, Y., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ohira, K., Ueyama, Y., Ohkawa, H., A.Holton, T., Kusumi, T., & Tanaka, Y., (2004). Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotechnology* 21: 377-386.

Wiebke, B., Ferreira, F. Pasquali., G. Bodanese-Zanettini, M.H., & Droste, A. (2006). Influence of antibiotics on embryogenic tissue and *Agrobacterium tumefaciens* suppression in soybean genetic transformation. *Bragantia*. 65(4), 543-551.

Ziemienowicz, A. (2014). Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatal Agric Biotechnol*, 3 (4), 95-102.