اثر آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم و هورمون‌ها بر باززایی گیاه رازیانه (*Foeniculum vulegare Mill.*)

شیوا شاهی[۱]، علی ایزدی دربندی*[۱]، حسین رامشینی[۱]
[۱]گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
نویسنده مسئول: aizady@ut.ac.ir

چکیده

به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت بافت رازیانه و یافتن بهترین غلظت آنتی‌بیوتیک جهت انجام پژوهش‌های انتقال ژن، اثرات مختلف آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم و هورمون‌های رشد گیاهی بر روی جنین آن مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور ریزنمونه‌های جنین بر روی محیط B5 حاوی نمک‌های ماکرو و میکرو، آهن، ویتامین‌ها، آگار ۰/۸ درصد، ساکارز ۳ درصد، ترکیبات متفاوت هورمونی و آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم کشت شدند. در این تحقیق از ۲۴ ترکیب تیماری شامل دو غلظت ۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم، سه غلظت ۰ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA ، دو غلظت ۰ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر IAA و سه غلظت ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAPاستفاده شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تمامی مراحل اندام زایی و ریشه‌زایی بدون انجام واکشت و در همان محیط اولیه انجام شده و کالوس‌زایی و چندشاخه‌زایی ریزنمونه های جنین کشت شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. بالاترین میزان کالوس‌زایی (باززایی غیرمستقیم) و چند شاخه زایی (تعداد شاخه‌ها بین ۳۰۰-۲۰۰ عدد) در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم بدون نظر گرفتن غلظت سایر هورمون‌های رشد مشاهده گردید که این خود نشان‌دهنده فعالیت شبه اکسینی آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم است.

کلمات کلیدی: **جنین، اکسین، چندشاخه‌زایی، BAP، NAA، IAA**

مقدمه

رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare Mill*، یکی از چهار گیاه اصلی معطر جهان و جز مهم‌ترین محصولات کشاورزی صادراتی ایران محسوب می‌شود (Nasabian et al., 1391). کشت این گیاه همانند سایر گیاهان در هر زمانی به راحتی امکان‌پذیر نبوده و مشکلاتی همچون تنش‌ها (زنده و غیرزنده) از دیرباز همواره بر سر راه کشت آن بوده است. روش‌های اصلاحی نوین از جمله انتقال ژن می‌تواند تا حد زیادی در اصلاح ژنتیکی این گیاه کمک کند. بر این اساس استفاده از کشت بافت گیاهی به‌عنوان نخستین گام در انتقال ژن ضروری به نظر می‌رسد.

اساسی‌ترین هدف کشت بافت کوتاه کردن طول دوره اصلاحی و تولید تعداد زیادی گیاهان عاری از بیماری بوده که کالوس‌دهی و باززاییِ هم‌زمان به این مسئله کمک می‌کند (Valizadeh et al., 1386). کشت بافت یکی از مراحل ضروری و لازم برای انجام مراحل انتقال ژن بوده که البته میزان کارآیی آن به عواملی چون ژنوتیپ، ریزنمونه، موقعیت قرارگیری نمونه در محیط، توانایی باززایی ریزنمونه و درنهایت مقدار آنتی‌بیوتیک مصرفی جهت حذف باکتری در طول انتقال ژن بستگی دارد. آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند اثر مثبت یا منفی بر روی باززایی گیاه تراریخت شده داشته باشند (نانا و مامیدالا، ۲۰۰۹). امروزه محققین دریافته‌اند که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مثل سفاتوکسیم باعث بهبود باززایی در برخی گیاهان می‌شوند (Yu and Wei, 2008).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که غلظت‌های مختلف سفاتوکسیم اثرهای متفاوتی بر گونه‌های مختلف گیاهی دارد، برای مثال بر اساس مطالعاتی که بر روی اثر سفوتاکسیم بر روی جنین‌زایی و باززایی گندم انجام شد، ثابت شد که سفوتاکسیم شدیداً باعث تحریک رشد کالوس، جنین‌زایی و باززایی آن می‌شود (Mathis and Boyed, 1986). در حالی‌که غلظت بالای همین آنتی‌بیوتیک مانع رشد کالوس در گیاه پاپایا می‌شود (Panathula et al., 2014).

تاکنون پژوهش‌های زیادی برروی رازیانه صورت گرفته که از بین آن‌ها می‌توان به باززایی از کالوس، سوسپانسون سلولی (Hunault et al., 1989) و جنین‌زایی سوماتیکی(Maheshwari and Gupta, 1965) اشاره نمود که اکثر این تکنیک‌ها نه‌تنها باززایی موفقی نداشته بلکه برای انجام کارهای انتقال ژن نیز مناسب نبوده است.

هدف از این تحقیق، بررسی اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم و هورمون‌های رشد بر کالوس‌زایی و چند شاخه‌زایی گیاه رازیانه به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت آن برای انجام پژوهش‌های انتقال ژن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

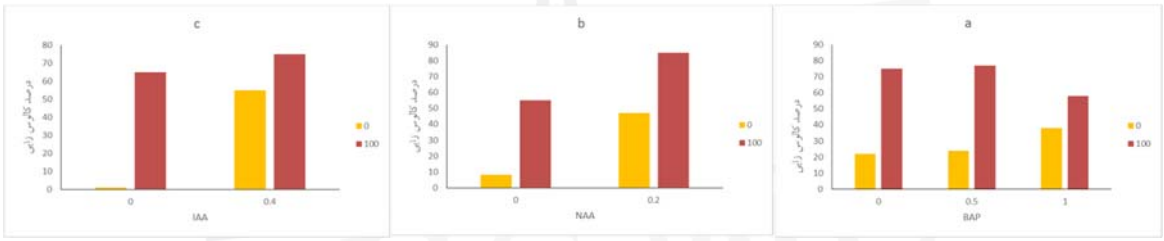
برای انجام این آزمایش از رقم فسا کشت شده در پردیس ابوریحان دانشگاه تهران استفاده شد. به‌منظور استخراج جنین رازیانه ابتدا بذور در زیر هود با الکل ۷۰درصد به‌مدت ۲۰ ثانیه ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر استریل ۴-۳ بار شستشو شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی شده و در انتها با آب مقطر استریل شده ۳-۴ بار شستشو انجام گرفت. سپس بذور ۳-۶ ساعت در آب قرار گرفتند. بعد از گذشت این مدت زمان، با کمک اسکالپل، سر هر بذر برش داده شد و با کمک همان پنس از وسط، بذر را فشرده و جنین خارج گردید (Ebrahimi et al., 2003).

برای کشت، از محیط‌کشت B5 شامل نمک‌های ماکرو و میکرو، آهن، ویتامین‌ها، آگار ۰/۸درصد و ساکارز ۳٪ با pH=۵/۷ استفاده شد. این آزمایش شامل ۲۴ ترکیب تیماری شامل غلظت آنتی‌بیوتیک ۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و هورمون های مصرفی به ترتیب BAP (۰، ۰/۵ و ۱میلی‌گرم بر لیتر)، NAA (۰ و ۰/۲میلی‌گرم بر لیتر) و IAA (۰و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر) بود. تمامی مراحل اندام‌زایی و ریشه‌زایی بدون انجام واکشت و در همان محیط اولیه انجام شد.

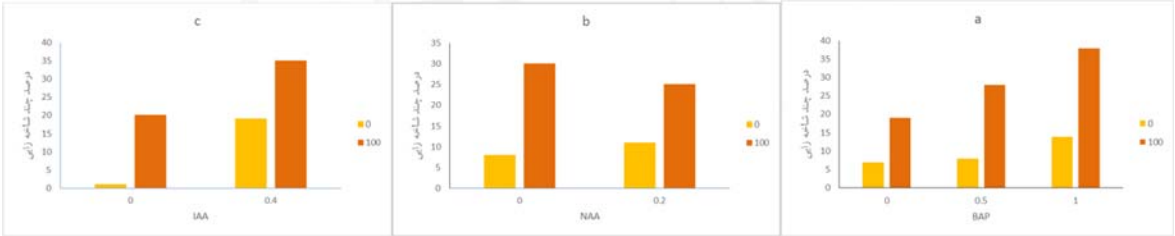
به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها، تبدیل داده انجام گرفت. آزمایش به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار SAS (ver 9.1) تجزیه واریانس و مقایسات میانگین تیمارها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح یک درصد و ترسیم نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

شکل‌های ۱ و ۲ نمایانگر اثرات تک‌تک هورمون‌ها به‌همراه دو غلظت آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم (۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر کالوس‌زایی و چندشاخه‌زایی جنین رازیانه می‌باشد.



شکل۱- اثر تک‌تک هورمون‌ها و دو غلظت (۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) سفاتوکسیم بر کالوس‌زایی جنین رازیانه



شکل۲- اثر تک‌تک هورمون‌ها و دو غلظت (۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) سفاتوکسیم بر چند شاخه‌زایی جنین رازیانه

همان‌طور که در شکل ۱ و ۲ مشاهده می‌شود در حضور سفاتوکسیم میزان بالایی از کالوس‌زایی و چندشاخه‌زایی وجود دارد. در نمودار 1a، در حضور سفاتوکسیم و بدون توجه به غلظت هورمون BAP کالوس‌زایی افزایش می‌یابد. این در حالی است که برای دو هورمون اکسین دیگر (NAA وIAA) (1b-1c) بدون در نظر گرفتن سفاتوکسیم (غیاب)، میزان کالوس‌زایی

با افزایش غلظت هورمون اکسین، افزایش می‌یابد. ولی بالاترین درصد کالوس‌زایی، در حضور سفاتوکسیم و هورمون اکسین (حدوداً ۱۰۰ درصد) مشاهده شد.

شکل۳- نمونه جنین باززا شده با تعداد شاخه‌های بین ۲۰۰-۳۰۰ عدد در محیط حاوی سفاتوکسیم

در شکل۲ نیز همانند شکل ۱، در حضور آنتی‌بیوتیک بالاترین میزان چندشاخه زایی مشاهده گردید (شکل ۳). در نمودار ۲a در حضور سفاتوکسیم با افزایش غلظت BAP درصد چندشاخه‌زایی به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد ولی در غیاب آنتی‌بیوتیک تغییر محسوسی به چشم نمی‌خورد. در نمودار ۲b نیز در حضور سفاتوکسیم میزان چندشاخه زایی افزایش یافت. البته این میزان در حضور هورمون NAA کاهش ناچیزی داشت. این در حالی است که در نمودار۲c و عدم حضور هورمون IAA و سفاتوکسیم، هیچ‌گونه شاخه‌زایی مشاهده نشد. ولی در حضور هورمون IAA و سفاتوکسیم بیشترین درصد چندشاخه‌زایی مشاهده گردید. با توجه به شکل2c و برابر بودن نتیجه در زمان حضور آنتی‌بیوتیک و عدم حضور هورمونIAA در مقایسه با زمان حضور هورمون IAA و غیاب آنتی‌بیوتیک می‌توان به‌راحتی نقش شبه اکسینی آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم را دریافت.

همان‌طور که از نتایج بدست می‌آید در غیاب هورمون اکسین (که هورمون اصلی برای اندام‌زایی است) و حضور سفاتوکسیم، باززایی از جنین رخ می‌دهد. این موضوع بیان‌گر این مطلب است که سفاتوکسیم دارای فعالیت شبه اکسینی است که توانسته کمبود هورمون اکسین در محیط را جبران کند. از بین دو هورمون اکسین فوق چنین بر می‌آید که هورمون IAA از اهمیت بیشتری برخوردار باشد، این بدین دلیل است که در غیاب هورمون IAA و سفاتوکسیم در هر دو نمودار (1c-2c) ، هیچ‌گونه عملکردی مشاهده نشد ولی در نمودار (1b-2b) در غیاب سفاتوکسیم و هورمون NAA درصد کمی از باززایی و چندشاخه‌زایی مشاهده گردید. این به این معنی است که نبود هورمون IAA مانع کالوس‌زایی و چندشاخه‌زایی می‌شود ولی در نبود هورمون NAA، باز هم مقداری کالوس‌زایی و چندشاخه‌زایی مشاهده می‌شود.

در این آزمایش به‌طور کلی ، هرچه میزان هورمون اکسین و شبه اکسین (آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم) افزایش می‌یابد، میزان کالوس‌زایی و چندشاخه‌زایی نیز افزایش می‌یابد. بررسی‌ها نشان داد که سفاتوکسیم علاوه بر دارا بودن فعالیت ضد میکروبی، دارای فعالیت شبه اکسینی است که باعث افزایش باززایی اکثر گیاهان می‌گردد (Nauerby et al., 1997) ، البته باید غلظت‌های بهینه این آنتی‌بیوتیک برای هرگونه گیاهی مورد آزمایش قرار گیرد تا مانع باززایی گیاه نگردد (Ahmadi et al., 2014). برای مثال غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش باززایی از کالوس سیب (Danilova and Dolgikh, 2004) و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای باززایی نرمال از جنین *T. aestivum* (Ahmadi et al., 2014) مناسب گزارش شده است و هرگونه تغییر در غلظت آن می‌تواند سبب تغییر فاز (باززایی مستقیم، کالوس‌زایی، جنین‌زایی و ...) در این گیاه شود (Danilova and Dolgikh, 2004).

منابع

Ahmadi, B., Shariatpanahi, M.E., Aghapour Ojaghkandi, M., Heydari, A.A. 2014. Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus L.*Plant Cell Tissue and Organ Culture 118: 497-505.

Danilova, S.A., Dolgikh, Yu.I. 2004. The Stimulatory Effect of the Antibiotic Cefotaxime on Plant Regeneration in Maize Tissue Culture. Russian Journal of Plant Physiology 51: 559-562.

Ebrahimie, E., Habashi, A.A., Ghareyazie, B., Ghannadha, M., Mohammadie, M. 2003. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 75**:**19-25

Hunault, G. 1984. In vitro culture of fennel tissues (*foeniculum vulgare miller*) from cell suspension to mature plant. Scientia Horticulturae 22: 55-65.

Hunault, G., Desmarest, P., Du Manoir, J. 1989. *Foeniculum vulgare* Miller: Cell culture, regeneration, and the production of anethole. Biotechnology in Agriculture and Forestry 7: 185–211.

Maheshwari, S.C., Gupta, G.R.P. 1965. Production of adventitious embryoids in vitro from stem callus of *Foeniculum vulgare*. Planta 67: 384-386.

Mathis, R.J., Boyed, L.A. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat *(Triticum aestivum L em. thell).* Plant Science 46:217-223.

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

Nauerby, B., Billing, K., Wyndaele, R. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens.* Plant Science 123:169-177.

Panathula, C.S., Mahadev, M.D.N., Naidu, C.V. 2014. The Stimulatory Effects of the Antimicrobial Agents Bavistin, Cefotaxime and Kanamycin on In Vitro Plant Regeneration of *Centella asiatica (L.)*-An Important Antijaundice Medicinal Plant. American Journal of Plant Sciences 5: 279-285.

Wei, Z.M. and Yu, Y. 2008. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. Biologia Plantarum 52 (3): 553-556.

Nesabian, S., Gholamhosseini, t., Jebelamali, f.1391. Comparison of exporting some medicinal plants to some other exporting countries(Fennel,…), Episode of Economical Modeling, 4:75-92 (in persian).

Valizadeh, M., Safarnejad, A., Nematzade, G., Kazemitabar, S.K. 1386. Regeneration of Plantlets from Embryo Explants of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. JWSS.; 11 (42) :33-38 (in persian).

The Effect of Antibiotic Cefotaxime and Growth Regulators on Regeneration of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) Embryo

Shiva Shahi[1], Ali Izadi-Darbandi[1]*, Hossein Ramshini[1]
Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
*Corresponding author: aizady@ut.ac.ir

Abstract

In order to optimize fennel tissue culture and finding the best concentration of antibiotic cefotaxime for gene transfer research, we assessed different doses of antibiotic cefotaxime and plant growth regulators on its embryo. For this purpose, embryo explants were cultured on B5 media containing macro and micro elements, vitamins, 0.8 % agar, 3% sucrose, various concentration of hormones and antibiotic cefotaxime. In this project, Different concentrations of antibiotic cefotaxime (0, 100 mgl^{-1}), NAA (0, 0.2 mgl^{-1}), IAA (0, 0.4 mgl^{-1}) and BAP (0, 0.5 and 1 mgl^{-1}) were used in this experiment. The experiment was conducted as afactorial design. Simultaneous shoot and root production were observed on the same media with no subculturing. Then callus production and proliferation data were analyzed. Maximum callus development (indirect shoot regeneration) and multiple shoot regeneration (200-300 numbers) were achieved in the presence of 100 mgl^{-1} cefotaxime concentration without any hormones which may be due to auxin-like activity of cefotaxime.

Key words: embryo, proliferation, auxin, BAP, NAA, IAA