Crop Biotech.
Autumn (2020) 9(4): 31-44 DOI: 10.30473/cb.2020.54411.1816

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دهم، شماره اول، پیاپی سی‌ویکم، پائیز ۱۳۹۹ (۴۴-۳۱)

تأثیر سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes*، نوع و سن ریزنمونه بر تولید ریشه‌های مویین در گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.)

محمدعلی اعظمی[1*]، سمیعه غفوری[2]، محمدباقر حسن‌پور اقدم[3]

۱. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

۲. کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

۳. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران و دانشیار، پژوهشی مرکز پژوهش‌های مجلس شورای اسلامی، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۱۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۸)

Effect of different strains of *Agrobacterium rhizogenes*, type and age of explant on hairy root production in *Valeriana officinalis* L.

Mohammadali Ali Aazami[1*], Samieh Ghafury[2], Mohammad Bagher Hassanpouraghdam[3]

1. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
2. M.Sc. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
3. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran and Research Associate Professor, Islamic Parliament Research Center, Tehran, Iran.

(Received: Aug. 20, 2020 - Accepted: Dec. 20, 2020)

چکیده

گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) از خانواده Valerianaceae به‌عنوان گیاه دارویی ارزشمند همواره مورد توجه بوده است که از آن برای درمان بیماری‌های عصبی استفاده می‌شود. پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل سویه‌های باکتری (R1000, LBA9402, C58, A4, GM, ATTCC15834)، سن ریزنمونه جهت تلقیح (۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز) و ریزنمونه‌های مختلف گیاه سنبل‌الطیب (برگ و ریشه) در سه تکرار انجام گرفت. جهت کشت باکتری‌ها از محیط کشت MYA جامد و جهت تهیه سوسپانسیون باکتری به‌منظور تلقیح از محیط MYA مایع حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. دو روش تلقیح (روش غوطه‌وری و تزریق) بر درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و روش تزریق در القای ریشه مویین بر ریزنمونه‌ها مؤثر واقع نشد. پس از مشخص شدن بهترین سویه و بهترین ریزنمونه، جهت پرآوری ریشه‌های مویین کلون‌ها در محیط کشت جامد MS، 1/2 MS و MS + 0.2 mg/L NAA کشت گردیدند، مشاهده شد که ریشه‌های قرار داده شده در محیط کشت MS بیشترین زیست‌توده را داشتند. سویه ATCC15834و A4 رشد یافته در محیط MYA روی ریز نمونه برگی ۳۰ روزه مناسب‌ترین سویه‌ها بودند. بیشترین طول ریشه و تعداد ریشه مویین در القای با سویه A4 دیده شد. ریشه‌های مویین القاء شده در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان رشد ریشه‌های مویین را نشان داد. نتایج نشان داد که کاربرد سویه‌های ATTCC15834, R1000, LBA9402 و A4 باعث القای ریشه‌های مویین در گیاه سنبل‌الطیب شد و دو سویه دیگر در القای ریشه‌های مویین ناکارآمد بودند.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، سنبل‌الطیب، سویه، ریشه مویین، محیط کشت MS.

Abstract

Valeriana officinalis from the valerianaceae is a precious medicinal plant has been employed for the treatment of mental ailments. The study was a factorial experiment in a CRD including bacterial strains (R1000, LBA9402, C58, A4, GM, and ATTCC15834), age of explants for inoculation (10, 20 and 30 days) and different explants of valerian (leaves and roots) in three replications. Solid Manitol Yest exteract Agar (MYA) medium was used for bacterial culture and MYA medium containing rifampicin antibiotic (50 mg/l) was used to prepare the bacterial suspension for inoculation. Two inoculation methods (floating and injection method) were evaluated on the percentage of rooting and the injection method was not effective in hairy root induction on explants. After determining the best strain and the best explants of the clones were cultured in MS, 1/2 MS and MS+0.2 mg/L NAA solid culture medium it was observed that the roots placed in MD medium were the most they had biomass. Strains of ATCC15834 and A4 on the MYA medium on 30 days old leaf explants was the best strain than others. The optimized root length and the top hairy root number were induced by A4 strain. The newly produced hairy root showed the highest growth on MS medium enriched with 3% sucrose at 25°C. Our results showed that the application of ATTCC15834, R1000, LBA9402 and A4 strains induced hairy roots in valerian and the other two strains were ineffective.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Culture medium MS, Hairy root, Strain, *Valeriana officinalis* L.

* نویسنده مسئول: محمدعلی اعظمی

E-mail: Aazami58@gmail.com

مقدمه

گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) از خانواده Valerianaceae از زمان‌های گذشته به‌عنوان گیاه دارویی ارزشمند همواره مورد توجه و استفاده انسان بوده است و خواص دارویی این گیاه را می‌شناختند و برای معالجه برخی بیماری‌های عصبی از آن استفاده می‌کردند (Shahzad and Saeed, 2015).

یکی از کاربردهای بیوتکنولوژی گیاهی، کشت میکروارگانیسم‌ها با سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها در محیط درون شیشه‌ای است که شامل تراریخت نمودن گیاهان برای اهداف خاص نظیر تولید بیشتر، مقاومت، القای صفتی خاص و غیره است. در مواردی تولید متابولیت‌های دارویی با استفاده از گیاه روییده در شرایط طبیعی اقتصادی نبوده و به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه می‌توان از فنون کشت سلول و کشت بافت گیاهی به‌طور بهینه استفاده نمود (Ionkova, 2007).

ریشه مویین توسط یک باکتری گرم منفی خاکزی به نام آگروباکتریوم رایزوزنز ایجاد می‌شود. زمانی که باکتری وارد گیاه می‌شود، تعدادی از ژن‌ها از پلاسمید باکتری، به گیاه منتقل‌شده و وارد ژنوم هسته‌ای گیاه میزبان می‌شود حاصل این انتقال تولید ریشه مویین در نزدیکی جایگاه ورود باکتری است (Chabaud *et al.*, 2006). ریشه‌های مویین به‌سرعت رشد می‌کنند و در محیط بدون هورمون‌های گیاهی به‌خوبی تکثیر شده و تولید انشعابات فرعی می‌نمایند. ثبات بالا در تولید متابولیت‌های ثانویه یک ویژگی مهم کشت ریشه‌های مویین است. ریشه‌های مویین به‌عنوان یک سیستم بیولوژیکی برای تولید ترکیبات با ارزش از گیاهان دارویی همواره مورد توجه بوده است. علاوه بر این، ریشه‌های مویین به دلیل افزایش ریشه‌های نئوپلاستی، به‌عنوان یک واحد مستقل گیاهی عمل می‌کند. پیشرفت‌های اخیر در افزایش تولید ریشه‌های مویین این سیستم را به یک روش کاربردی برای فرآیندهای صنعتی تولید متابولیت‌های ثانویه تبدیل کرده است (Guillon *et al.*, 2006).

فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی بر رشد و تولید ریشه‌های مویین تأثیر گذارند. بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت جهت دست‌یابی به بالاترین میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین ضروری است (Nartop, 2018). نوع سویه باکتری، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه، منبع کربن و غلظت آن، غلظت یون‌های موجود در محیط کشت، pH محیط کشت، نور، فیتوهورمون‌ها و دما همگی بر رشد و متابولیسم ثانویه ریشه‌های مویین مؤثر هستند (Morgan *et al.*, 2000; Roychowdhary *et al.*, 2017). استفاده از روش‌هایی نظیر محرک‌ها، تغذیه با پیش ماده، نفوذپذیرسازی غشا، به دام انداختن مولکول‌های آزاد شده در محیط مایع و سیستم کشت توأم از جمله روش‌هایی هستند که به‌منظور بهبود تولید در کشت ریشه‌های مویین بکار گرفته شده‌اند (Wu, 2007).

Granicher و همکاران (۱۹۹۵) برای اولین بار موفق به تولید ریشه‌های مویین در *Valeriana sumbucifolia* شدند. آن‌ها مشتقاتی از اسانس را در ریشه مویین مشاهده کردند که در ریشه طبیعی وجود نداشت. محققین ریزنمونه‌های مختلف جینسنگ هندی (*Withania somnifera*) با سویه R1601 آگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح کردند که موجب ظهور ریشه‌های مویین در کوتیلدون و برگ شد (Murty *et al.*, 2008). در گیاه شاه‌بیزک (*Atropa komarovii*) القای ریشه‌زایی با استفاده از آگروباکتریوم سویه ATCC15834 در ریزنمونه دیسک برگی به روش غوطه‌وری در مدت زمان ۲۰-۱۵ دقیقه بهترین نتیجه را نشان داد (Banihashemi *et al.*, 2015).

سرعت بالای رشد ریشه‌های مویین انتقال قطعه‌ای از ژنوم ناقل باکتری موسوم به قطعه T-DNA به درون ژنوم گیاه است که با دارا بودن

جایگاه‌های ژنی *rolA*، *rolB*، *rolC* و ژن‌های مربوط به سنتز هورمون‌هایی همچون اکسین باعث تراریزش ریشه‌ها و ایجاد علائم ریشه‌های مویین در محل آلودگی گیاه با آگروباکتریوم می‌گردند (Chabaud *et al.*, 2006). ژن‌های *rol* از طریق افزایش میزان حساسیت سلول‌های گیاه میزبان به فیتوهورمون‌ها ازجمله هورمون اکسین عملکرد ریشه‌زایی را بهبود بخشید و در حضور مقادیر بسیار ناچیز این هورمون (چه در درون سلول‌های ریشه و چه در محیط کشت) بیشترین تأثیر در القای ریشه‌زایی اتفاق افتاد (Cardarelli *et al.*, 1987, Mi *et al.*, 2020, Gutierrez- valdes *et al.*, 2020). از میان ژن‌های *rol*، ژن *rolB* به‌عنوان مهم‌ترین و قوی‌ترین ژن ریشه‌زا شناخته شده است، چرا که این ژن‌ها به‌تنهایی قادر به القای ریشه‌زایی بر روی برگ و ساقه گیاهان توتون بود (Ho and Du, 2006; Cardelli *et al.*, 1987).

القای ریشه مویین در گیاه سنبل‌الطیب توسط آگروباکتریوم سویه‌های LBA9402 و AR15834 در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و ریشه ۸۱/۲۵٪ بود. محققین مطرح کردند که سویه باکتری تنها عامل مؤثر بر ظهور ریشه‌زایی نبوده بلکه نوع محیط کشت و نوع ریزنمونه در القای ریشه مویین تأثیرگذار است (Zebarjadi *et al.*, 2011). القای ریشه مویین در گیاه سنبل‌الطیب با آگروباکتریوم رایزوژنز سویه R1601 باعث افزایش محتوی اسانس در این گیاه گردید (Filizadeh and Goodarzi, 2010). در تحقیقی استفاده از الیسیتورها در افزایش القای ریشه مویین گیاه سنبل‌الطیب با آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A13 باعث افزایش راندمان ماده مؤثره آن تا شش برابر گردید (Dini Torkamani *et al.*, 2014).

این مطالعه با اهداف بررسی و انتخاب بهترین سویه آگروباکتریوم (بعضی از سویه‌هایی که در این گیاه هنوز مطالعه نشده بود) جهت تراریخت کردن ریزنمونه‌های ریشه و برگ گیاه سنبل‌الطیب، بهینه‌سازی روش‌های تلقیح آگروباکتریوم و نقش الیسیتورها در افزایش راندمان تلقیح و القای ریشه مویین صورت گرفت و بررسی محیط‌های مختلف کشت جهت افزایش راندمان تولید ریشه‌های مویین انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه گیاهی

برای شکستن خواب فیزیولوژیکی، بذرها به مدت ۵ ساعت در محلول جیبرلین (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) خیسانده شدند و به‌منظور ضدعفونی، بذور در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و محلول هیپوکلریدسدیم ۲۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه غوطه‌ور شدند و سپس در سه مرحله به مدت زمان‌های ۵، ۷ و ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذور استریل شده در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1968) جامد شامل ۸ گرم در لیتر آگار (بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) کشت گردیدند سپس در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به‌منظور جوانه‌زنی نگهداری شدند. القای ریشه‌های مویین در دو ریزنمونه ریشه و برگ با سنین ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روزه گیاه سنبل‌الطیب مورد بررسی قرار گرفت.

کشت باکتری، تلقیح و هم کشتی ریزنمونه

شش سویه مختلف از باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (R1000, LBA9402, C58, A4, GM, ATTCC15834) جهت القای ریشه‌های مویین مورد استفاده قرار گرفت. جهت کشت باکتری‌ها از محیط کشت MYA (Manitol Yest exteract Agar) جامد (Morton and Fuqua, 2012) و جهت تهیه سوسپانسیون باکتری به‌منظور تلقیح از محیط MYA مایع حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. تک کلون

هر یک از سویه‌های باکتری در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که هر یک حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MYA مایع و حاوی ۱۵۰ میکرو لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بودند، کشت گردید. رشد باکتری در داخل شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور دقیقه در شرایط تاریکی، به مدت ۴۸ ساعت انجام گردید. غلظت بهینه باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) توسط دستگاه اسپکتوفتومتر بین ۰/۷ -۰/۶ قرائت گردید. ریزنمونه‌های برگ و ریشه ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روزه جهت تلقیح با باکتری در محیط 1/2MS حاوی استوسرینگون ۱۰۰ میکرومولار و بدون استوسرینگون آماده شدند. بدین منظور ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های مادری جدا شده و در داخل پتری‌دیش استریل به‌صورت جداگانه قرار گرفتند. در مرحله بعد جهت نفوذ بهتر باکتری به درون ریزنمونه‌ها، در سطح ریزنمونه‌ها به‌وسیله اسکالپل و به‌صورت تصادفی، زخم‌هایی ایجاد گردید. سوسپانسیون باکتری آماده شده برای هر سویه نیز به درون پتری‌دیش‌های جداگانه ریخته شده و ریزنمونه‌ها درون سوسپانسیون هر یک از سویه‌های باکتری به‌طور جداگانه و به مدت ۲ و ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت MS جامد (محیط هم‌کشتی ریزنمونه با باکتری) منتقل شدند. محیط‌های کشت به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط تاریکی و به مدت ۴۸ ساعت منتقل شدند. به‌عنوان نمونه‌های شاهد نیز، تعدادی ریزنمونه آماده شده، بدون تلقیح با باکتری به روش مشابه کشت شدند.

باکتری‌زدایی و بهینه سازی ظهور ریشه‌های مویین

بعد از گذشت ۴۸ ساعت جهت حذف باکتری، ریزنمونه‌ها پس از حذف رطوبت اضافی آن‌ها به‌وسیله کاغذ صافی استریل، به محیط کشت 1/2MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم فاقد هورمون‌های گیاهی منتقل شدند. عمل واکشت ریزنمونه‌ها و انتقال به محیط MS جدید حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم تا چهار نوبت و تا حذف کامل باکتری ادامه یافت. پس از ظهور ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌ها، جهت افزایش رشد ریشه‌ها در محیط جامد، هر یک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار، به‌صورت تکی به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون‌های گیاهی و حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. عمل واکشت ریزنمونه‌ها در محیط جدید هر دو هفته یک‌بار صورت گرفت و در هر بار واکشت، اندکی از بافت ریزنمونه حذف گردید و در نهایت با حذف کامل ریزنمونه، ریشه‌های مویین بدون نیاز به بافت ریزنمونه، به‌راحتی و با سرعت زیاد در محیط کشت تکثیر یافتند. حداقل ۴ بار عمل واکشت ریشه‌های مویین در محیط کشت 1/2MS جامد انجام گردید و هر بار غلظت آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم کاهش یافت.

روش آزمایش

ابتدا تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز در القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه سنبل‌الطیب مورد بررسی قرار گرفت و صفات میانگین طول ریشه، تعداد ریزنمونه‌های ریشه داده در هر پتری، زمان القای ریشه بعد از تلقیح، درصد القای ریشه، تراکم ریشه در هر ریزنمونه، القای ریشه با استفاده از استوسیرینگون و بدون استفاده از استوسیرینگون بررسی شد. پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل سویه‌های باکتری (R1000, LBA9402, C58, ATTCC15834 A4, GM)، سن ریزنمونه جهت تلقیح (۱۰،۲۰ و ۳۰روز) و ریزنمونه‌های مختلف گیاه سنبل‌الطیب (برگ و ریشه) در سه تکرار بود. هر پتری‌دیش به‌عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و داخل هر پتری‌دیش پانزده عدد ریزنمونه تلقیح شده کشت گردید. در طول مدت کشت ریزنمونه‌ها

درصد ریشه‌زایی در ریزنمونه‌ها ثبت گردید. دو روش تلقیح (روش غوطه‌وری و تزریق) بر درصد ریشه‌زایی بررسی شد. در مرحله‌ی بعدی پس از مشخص شدن بهترین سویه (A4)و بهترین ریزنمونه (برگ)، جهت القای ریشه‌های مویین ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS جامد کشت گردیدند. سپس ریشه‌های مویین حاصل از مرحله قبلی، جهت تأثیر محیط کشت جامد (MS، 1/2MS و MSهمراه با ۰/۲ گرم در لیتر NAA) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر میزان تولید ریشه‌های مویین با چهار کلون (هر ریز نمونه برگی حاوی ریشه مویین به‌عنوان یک کلون در نظر گرفته شد) مورد بررسی قرار گرفت.

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین

جهت اثبات تراریخت بودن ریشه‌های مویین تولیدشده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی هر یک از ریشه‌های مویین با استفاده از روش CTAB (Khan *et al*., 2007) استخراج گردیدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌منظور تأیید حضور ژن *rol*B آگروباکتریوم رایزوژنز در ریشه‌های مویین انجام گردید. توالی آغازگرها به‌صورت زیر بود. – '5 ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTC CACGA-3' (آغازگر مستقیم) - و -'5 TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACT GCAGC-3' (آغازگر معکوس) (www.ncbinlm.nih.gov). تکثیر قطعات 780bp ژن *rol*B با استفاده از توالی آغازگرهای مورد اشاره انجام گرفت. جهت آماده‌سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش، از ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (آغازگرهای مستقیم و معکوس) با غلظت ۱۰ میکرومول در لیتر، ۱۲/۵ میکرولیتر از کیت آماده PCR master mix شرکت Cinna Gen (حاوی بافر 10xPCR، آنزیم Taq DNA Polymerase، $MgCl_2$ (۴ میلی‌مول بر لیتر) و dNTPs (۱۰ میکرومول بر لیتر) ، ۱ میکرولیتر (۲۵ نانوگرم) DNA ژنومی و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه استفاده گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل تهیه PCR mix تحت شرایط استریل زیر هود لامینار و بر روی یخ انجام گردید.

برنامه PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود که با دستگاه Bio-RAD Mj-mini انجام شد. به‌منظور مشخص شدن اندازه قطعات حاصل، از DNA مارکر 1kb شرکت Cinna Gen استفاده گردید.

جهت تعیین کیفیت، ۶ میکرولیتر از DNA استخراج شده در داخل ۳ میکرولیتر آب دیونیزه حل‌شده و حدود ۳ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی متیلن-بلو به آن اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل، درون چاهک‌های ایجادشده بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در دستگاه الکتروفورز افقی قرار گرفت. ژل آگارز توسط نور UV با استفاده از دستگاه ژل‌داک (KiAGEN, Model: CCD-5) آشکارسازی گردید.

آنالیز آماری

آزمایش بر اساس طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار انجام گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (v 9.1) انجام گرفت و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گردید. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel (۲۰۱۶) ترسیم شدند.

نتایج و بحث

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز در القای ریشه مویین و همچنین بهینه‌سازی شرایط القای ریشه‌ها در گیاه سنبل‌الطیب با شش سویه متفاوت (R1000, LBA9402, C58, A4, GM , ATTCC15834) در سه سن مختلف، بر روی دو نوع ریزنمونه بررسی و ارزیابی شد (شکل ۱). درصد تراریختگی ریزنمونه‌های تلقیح شده در مدت زمان ۲ دقیقه با هر دو روش غوطه‌وری و تزریق صفر شد و روش تزریق در ۱۵ دقیقه نیز باعث القای ریشه مویین در ریزنمونه‌ها نگردید.

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل سویه بر نوع ریزنمونه در اندازه ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. در بررسی تعداد ریز نمونه‌هایی که القای ریشه صورت گرفته بود، اثر متقابل سویه بر نوع ریز نمونه و سن ریزنمونه هر دو در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل نوع ریز نمونه و سن ریزنمونه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. در صفت درصد القای ریشه اثر متقابل نوع سویه باکتری در نوع و سن ریزنمونه در سطح احتمال ۱ درصد و نوع ریزنمونه در سن ریزنمونه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل نوع سویه در نوع ریزنمونه در سطح احتمال ۱ درصد و نوع سویه در سن ریزنمونه در سطح احتمال ۵ درصد در صفت تراکم ریشه در هر ریزنمونه حالت معنی‌داری را نشان داد.

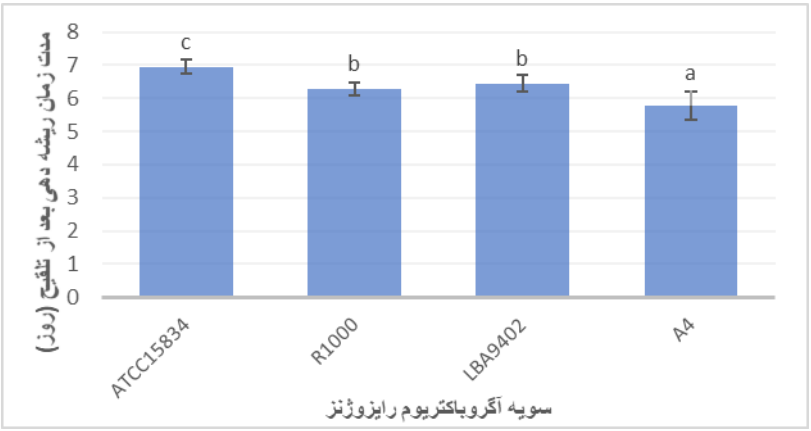
نوع سویه مستقل از فاکتورهای سن و نوع ریزنمونه بر مدت زمان ریشه‌زایی بعد از تلقیح به‌طور چشمگیری مؤثر واقع شد (جدول ۱)، به‌نحوی‌که سویه باکتریایی ATCC15834 در القای ریشه‌های مویین عملکرد بهتری نسبت به سایر سویه‌ها نشان داد، ولی دو سویه LBA9402 و R1000 عملکرد یکسانی داشتند. باکتری سویه A4 مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین را کاهش داد (شکل ۲). در دو سویه C58 و GM القای ریشه مویین صورت نگرفت. با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌توان سویه باکتریایی A4 را به‌عنوان سویه‌ای که می‌تواند سبب تسریع در ظهور ریشه‌های مویین گردد، معرفی کرد. این در حالی است که سویه R1000 نمونه وحشی سویه باکتریایی A4 بوده و انتظار می‌رفت که همانند یکدیگر عمل کنند که نتایج حاصل، خلاف این امر را نشان می‌دهد و احتمالاً به دلیل توانایی بالاتر R1000 در شناسایی سریع‌تر میزبان و انتقال پلاسمید به داخل سلول گیاهی باشد که با یافته‌های Thwe و همکاران (۲۰۱۶) منطبق بود.

شکل ۱. الف) کشت ریزنمونه برگ تلقیح یافته با باکتری، ب) ظهور ریشه‌های مویین از ریز نمونه برگ، ج) تعدد ریشه‌های مویین از محل زخم تلقیح‌یافته با آگروباکتریوم A4، د) خروج ریشه‌های مویین حاصل از ریزنمونه ریشه القاشده با آگروباکتریوم ATTCC15834

جدول ۱. تجزیه واریانس سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rizhogenes*) نوع و سن ریزنمونه بر القای ریشه‌های مویین در گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriane officinalis* L.)

منابع تغییر	df	میانگین مربعات (MS)					
		X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
A	1	0.998^{ns}	296.055^{**}	0.500^{ns}	1454.312^{**}	2.722^{**}	1731.426^{*}
B	2	1.017^{ns}	354.597^{**}	0.180^{ns}	1768.503^{**}	3.041^{**}	389.301^{ns}
C	3	5.961^{**}	468.333^{**}	4.166^{**}	3076.410^{**}	21.222^{**}	876.848^{**}
AB	2	0.055^{ns}	42.097^{*}	0.041^{ns}	283.855^{*}	0.097^{ns}	8.827^{ns}
AC	3	3.860^{**}	64.018^{**}	0.018^{ns}	336.365^{**}	1.648^{**}	338.066^{ns}
BC	6	0.117^{ns}	64.708^{**}	0.236^{ns}	375.044^{**}	0.986^{*}	305.729^{ns}
ABC	6	0.459^{ns}	8.171^{ns}	0.060^{ns}	41.881^{ns}	0.189^{ns}	642.110^{**}
خطا	48	0.413	9.152	0.402	56.215	0.361	175.129
CV (%)		26.70	29.921	9.976	30.802	20.030	20.502

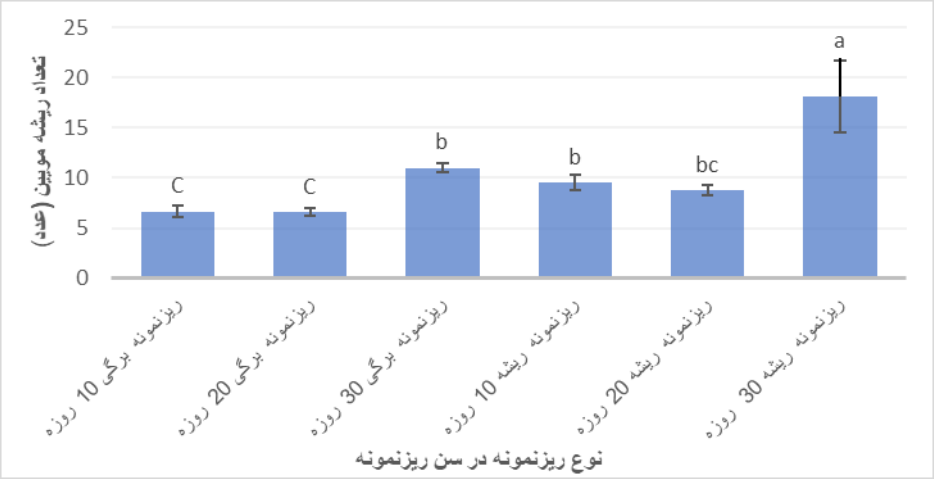
ns، *، **: به ترتیب، غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ درصد و ۱ درصد. X_1: میانگین طول ریشه. X_2: تعداد ریزنمونه‌های ریشه داده در هر پتری. X3: زمان القای ریشه بعد از تلقیح. X_4: درصد القای ریشه. X_5: تراکم ریشه در هر ریزنمونه. X_6: القای ریشه با استفاده از استوسیرینگون. A: نوع ریزنمونه. B: سن ریزنمونه. C: نوع سویه آگروباکتریوم رایزوژنز.



شکل ۲. تأثیر سویه آگروباکتریوم رایزوژنز بر مدت زمان ریشه‌دهی بعد از تلقیح در گیاه سنبل‌الطیب.
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

مدت زمان لازم جهت ظهور ریشه بسیار حائز اهمیت است، به‌طوری‌که هر چه این زمان کمتر باشد، روند رشد ریشه، تولید و استخراج متابولیت کوتاه‌تر و مقرون به‌صرفه خواهد بود (Dehghan *et al.*, 2012; Weber and Bodanese, 2011). در گیاه باباآدم (*Arctium lappa* L.)، ظهور ریشه ۷ الی ۱۰ روز طول کشیده، درحالی‌که در حسن یوسف (*coleus blumei*) ۱ تا ۴ روز پس از تلقیح ریشه‌ها ظاهر شدند (Soleimani *et al.*, 2012). مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش سن ریزنمونه‌های گیاهی، توانایی سلول‌ها برای پذیرش ژن بیگانه افزایش یافته است. ریزنمونه ریشه با محدوده سنی ۳۰ روزه بیشترین میزان ظهور ریشه مویین را نشان داد و به‌عنوان مناسب‌ترین ریزنمونه سنی برای افزایش ظهور ریشه مویین شناخته شد (شکل ۳).

سن ریز نمونه گیاهی تأثیر بسیار مهمی بر توانایی تولید ریشه مویین دارد، زیرا سن سلول گیاهی تعیین‌کننده ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن است و وضعیت فیزیولوژیکی، سنتز DNA و تقسیمات سلولی در بافت‌های مختلف، ممکن است دلیل توانایی متفاوت ریزنمونه‌ها جهت تولید ریشه مویین باشد (Murthy *et al.*, 2010). نتایج حاضر با یافته‌های Kabirnataj و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تأثیر سن ریزنمونه در ظهور ریشه‌های مویین گیاه دارویی کاسنی (*Chichorium intybus* L.) مطابق بود.

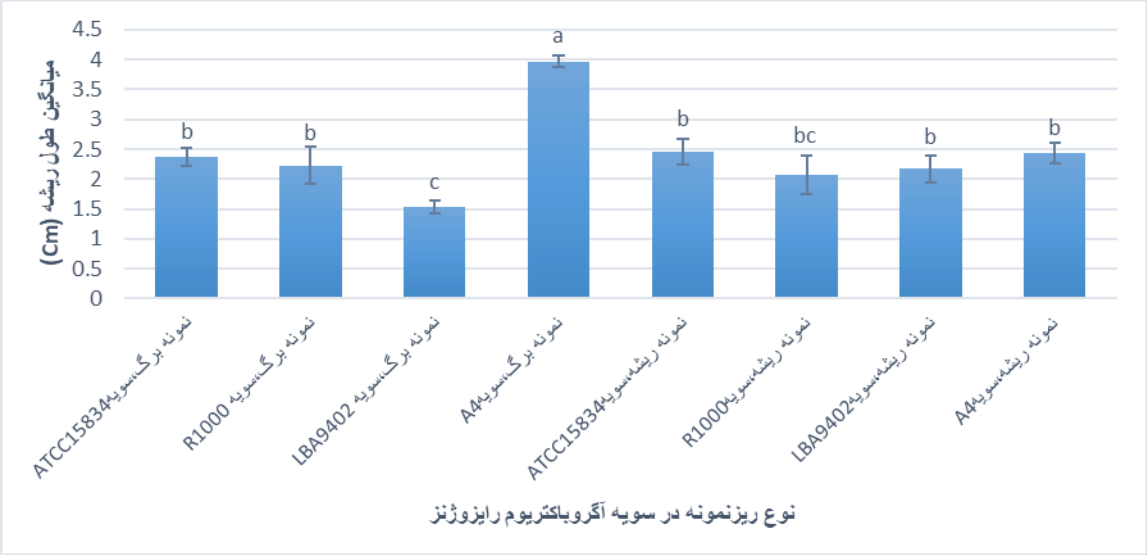


شکل ۳. اثر متقابل نوع ریزنمونه و سن ریزنمونه بر میزان ظهور ریشه مویین در گیاه سنبل‌الطیب.
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

میزان ظهور ریشه‌های مویین و تأثیر متقابل ریزنمونه و سویه نشان داد که در ریزنمونه برگ و ریشه، سویه A4 دارای عملکرد مناسب‌تری نسبت به سایر سویه‌ها بود، درحالی‌که سه سویه ATCC15834، R1000 و LBA9402 به یک میزان مؤثر بودند (شکل ۴). طبق مطالعات صورت گرفته گاهی اوقات T-DNA ها شامل ژن‌های *tms* است که مستقیماً سبب بیوسنتز اکسین و القای ریشه می‌شوند (Tamakawa *et al.*, 1998; Bonhomme *et al.*, 2000; Ahlawat *et al.*, 2012).

معمولاً سویه‌های آگروپینی (ATCC15834، LBA9402 و A4) توانایی بیشتری در تلقیح بافت‌های گیاهی دارند. بیشترین میزان ظهور ریشه مویین در نمونه ۳۰ روزه ریشه و برگ تلقیح شده با سویه A4 و ATCC15834 مشاهده شد. این در حالی است که سویه‌های LBA9402 و R1000 مستقل از سن عمل کرده و در هر محدوده سنی به یک میزان موجب ایجاد تراریختگی در ریزنمونه‌های موردنظر شدند. بنابراین اگر که در تولید ریشه مویین گیاه سنبل‌الطیب هدف رسیدن به یک مقیاس وسیع از تولید ریشه‌ها با در نظر گرفتن سن ریزنمونه است، باکتری A4 با ریزنمونه‌های ۳۰ روزه مناسب‌ترین گزینه است. اطلاعات ژنتیکی انتقال‌یافته از پلاسمید Ri شامل ژن‌های است که سبب بیوسنتز اوپین‌های ویژه‌ای از قبیل آگروپین، مانوپین و کوکوموپین می‌شود که به‌منزله منبع کربن و نیتروژن برای باکتری عمل می‌کنند این یافته‌ها با مطالعات Petersen و همکاران (۱۹۸۶) و Sivanandhan و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد. برخی مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز بر اساس نوع اوپین ساخته‌شده در بافت تراریخت‌شده توسط آن‌ها توانایی‌های متفاوتی برای تلقیح بافت‌های گیاهی دارند (Mehrotra *et al.*, 2008).

طول ریشه تحت تأثیر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری قرار گرفت. تراریختگی ریزنمونه برگی توسط سویه A4 موجب افزایش طول ریشه‌های مویین گردید. یکی از دلایل اصلی استفاده از ریشه‌های مویین رشد سریع این ریشه‌ها در محیط کشت و حصول به زیست‌توده به مقدار مطلوب است. با توجه به تحقیق حاضر سویه A4 در ریزنمونه برگی بسیار کارآمد بوده است. همچنین این سویه بر ریزنمونه ریشه نیز به‌صورت فعال عمل کرده است، درحالی‌که سویه‌های LBA9402، ATCC15834 و R1000 در هر دو نوع ریزنمونه به یک‌میزان در اندازه طول ریشه مؤثر بودند (شکل ۴).

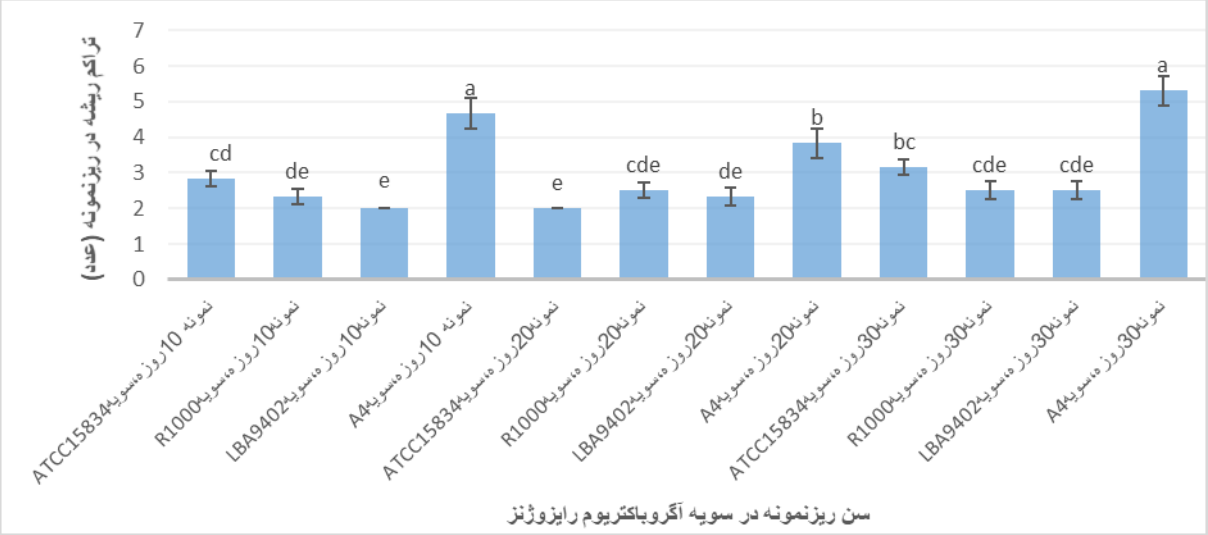


شکل ۴. اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه آگروباکتریوم رایزوژنز بر میانگین طول ریشه در گیاه سنبل‌الطیب.
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

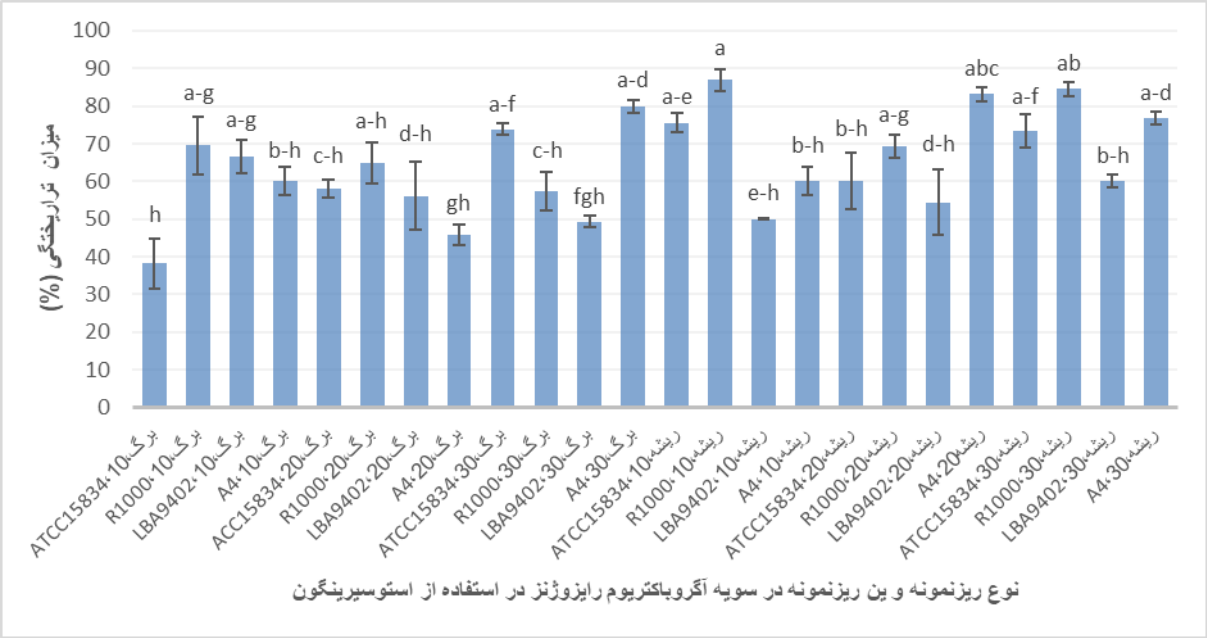
یافته‌های Pakdin-Parizi و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی ریشه‌های مویین ظهور یافته در ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب تراریخت‌شده با آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATCC15834، نشان داد که بیشترین طول ریشه و میزان ریشه‌زایی را در ریزنمونه‌های کوتیلدون تراریخت‌شده مشاهده کردند.

ریزنمونه برگی تلقیح‌یافته با سویه A4 بیشترین تعداد ریشه‌های مویین را نشان داد. به‌طوری‌که تعداد ریشه در ریزنمونه برگی نسبت به ریزنمونه ریشه تفاوت معنی‌داری داشت و اثر متقابل سایر سویه‌ها و ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند. با توجه به تأثیر متقابل سویه و سن ریزنمونه، سویه A4 در سنین ۱۰ و ۳۰ روزه ریزنمونه بیشترین تعداد ریشه را نشان دادند. سویه ATCC15834 در سنین ۱۰ روزه و ۳۰ روزه عملکرد یکسانی داشته است. سویه R1000 تقریباً مستقل از سن عملکرد داشته و سویه LBA9402 در سن ۳۰ روزه بهترین عملکرد را داشته و در سنین ۱۰ و ۲۰ روزه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵). در مطالعات Dini Torkamani و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تأثیر سه سن ۳ هفته‌ای، ۵ هفته‌ای و شش‌هفته‌ای گیاه سنبل‌الطیب، سن ۳ هفته‌ای را به‌عنوان مستعدترین سن معرفی کردند.

استفاده از استوسیرینگون باعث افزایش درصد تراریختگی شد به‌طوری‌که تأثیر نوع سویه بر میزان القای ریشه مویین را به‌صورت معنی‌داری افزایش داد. تأثیر سویه باکتریایی R1000 در استفاده از استوسیرینگون در سن ۱۰ روزه به میزان ۲۰ درصد نسبت به عدم استفاده از استوسیرینگون افزایش نشان داد .همچنین تأثیر استوسیرینگان در استفاده از سایر سویه‌ها محسوس است، چرا که باعث افزایش تعامل بین نمونه و سویه شده است (شکل ۶). نتایج حاضر با مطالعات Ramirez-Estrada و همکاران (۲۰۱۶) بر کاربرد الیسیتورها در شرایط درون شیشه‌ای تطابق دارد. القای ریشه مویین گیاه تورنیا با غلظت‌های پایین ۳۰ میکرومولار استوسرینگان تحریک شد ولی میزان ظهور را به‌طور قابل‌توجهی افزایش نمی‌دهد (Pitta–Alvarez *et al.*, 2000)، درحالی‌که در یافته‌های Bensaddek و همکاران (۲۰۰۸)، در محیط ظهور ریشه‌های مویین تنباکو ۱۵۰–۵۰ میکرومولار استوسیرینگان در میزان ظهور ریشه‌های مویین مؤثر بود.



شکل ۵. اثر متقابل سن ریزنمونه و سویه آگروباکتریوم رایزوژنز بر تراکم ریشه در ریزنمونه در گیاه سنبل‌الطیب.
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.



شکل ۶. اثر متقابل نوع ریزنمونه و سن ریزنمونه در سویه آگروباکتریوم رایزوژنز بر درصد تراریختگی در گیاه سنبل‌الطیب.
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.

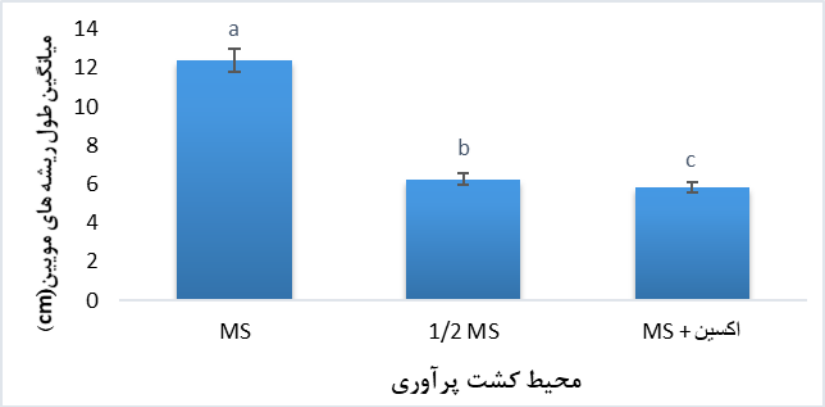
پرآوری ریشه‌های مویین

در پژوهش حاضر ریشه‌های مویین گیاه سنبل‌الطیب در سه نوع محیط متفاوت به مدت یک ماه کشت شدند. نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین سه نوع محیط کشت، نشان داد که محیط کشت MS تأثیر مثبت بر میانگین طول ریشه داشت این در حالی است که فاکتور کلون و اثر متقابل کلون و محیط کشت غیر معنی‌دار بود با توجه به بررسی سه نوع محیط کشت جامد MS ، 1/2 MS و MS + 0.2 mg/L NAA که هر سه محیط در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، مشاهده شد که ریشه‌های قرار داده‌شده در محیط کشت MS بیشترین طول را داشتند (شکل ۷)، که با نتایج Dini Torkamani و همکاران (۲۰۱۴) هم سو بود در مقابل ریشه‌های

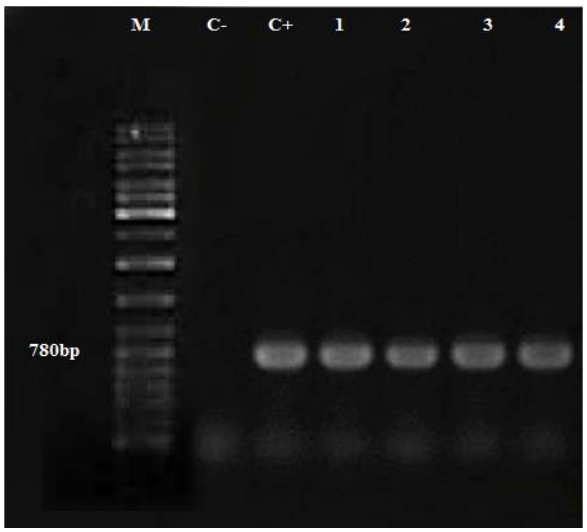
رشد کرده در محیط حاوی نفتالین اسید استیک (NAA) دارای کمترین میزان رشد بودند. که گزارش‌های Nilsson and Olsson (۱۹۹۷) مبنی بر استفاده از NAA نشان داد، که محرک‌های قند و اکسین موجب افزایش رشد ریشه‌های مویین شدند. عناصر معدنی مورد استفاده در محیط کشت‌های مختلف و اساساً نوع محیط کشت به‌عنوان مهم‌ترین عامل مؤثر در رشد ریشه‌های مویین و تجمع میزان زیست‌توده شناخته‌شده است. که این مطالعات با بررسی‌های Bensaddek و همکاران (۲۰۰۱) و Sivakumar و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد.

تأیید مولکولی ریشه مویین

اگرچه مورفولوژی خاص و رشد پلاژیوتروپیک ریشه‌های القایی توسط آگروباکتریوم رایزوژنز در محیط کشت فاقد هورمون، مؤید نفوذ T-DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی و تراریختگی این ریشه‌ها است، بااین‌وجود بررسی ماهیت تراریختگی ریشه‌ها با روش PCR الزامی است. به این منظور تکثیر قطعه‌ای از ژن *rolB* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن بر روی DNA استخراج‌شده از ریشه‌های القایی گیاه سنبل‌الطیب آلوده با آگروباکتریوم سویه A4 انجام پذیرفت (شکل ۸).



شکل ۷. اثر محیط کشت‌های پرآوری بر میانگین طول ریشه‌های مویین در گیاه سنبل‌الطیب.
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بر مبنای آزمون دانکن است.



شکل ۸. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تأیید حضور ژن *rolB* در ریشه‌های تراریخت گیاه سنبل‌الطیب
M: DNA نشانگر 10000 bp (cinna Gen)، C^-: ریشه‌های شاهد غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی، C^+: آگروباکتریوم سویه A4 به‌عنوان کنترل مثبت، لاین۱ تا ۴: ریشه‌های مویین القاشده در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه سنبل‌الطیب توسط آگروباکتریوم رایزوژنز

این نتایج با یافته‌های Banihashemi و همکاران (۲۰۱۵) در استخراج کومارین از ریشه‌های مویین گیاه دارویی شاه‌بیزک مطابقت دارد. هم‌چنین یافته‌های پژوهش حاضر منطبق با مطالعات Pakdin-Parizi و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه سنبل‌الطیب تراریخت‌شده با باکتری ATCC15834، Panday و همکاران (۲۰۱۴) در حسن یوسف و Zebarjadi و همکاران (۲۰۱۱) در گیاه سنبل‌الطیب توسط سویه‌های باکتریایی LBA9402 و AR15834 است.

در بررسی ۶ نوع سویه آگروباکتریوم سویه‌های GM و C58 در ایجاد تراریختگی ناموفق عمل کردند. این در حالی است که ۴ نوع سویه ATCC15834، LBA9402، R1000 و A4 قادر به القای ریشه در گیاه سنبل‌الطیب بودند. درصد تراریختگی ریزنمونه‌های تلقیح‌شده در مدت زمان ۲ دقیقه با هر دو روش غوطه‌وری و تزریق صفر شد و روش تزریق در ۱۵ دقیقه نیز باعث القای ریشه مویین در ریزنمونه‌ها نگردید. زمان ۱۵ دقیقه در روش غوطه‌وری سویه‌ها، باعث ایجاد تراریختگی در درصدهای متفاوت شدند به‌طوری‌که به‌کاربردن سویه A4 بر روی ریزنمونه برگی ۳۰ روزه بهترین عملکرد و بیشترین فراوانی تولید ریشه مویین به دست آمد. بیشترین میزان رشد از لحاظ طولی در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز بود که احتمال دارد به دلیل کامل بودن مواد مغذی موجود در محیط باشد. پتانسیل بالای سیستم ریشه‌های مویین برای تولید متابولیت‌ها باعث جلب‌توجه شرکت‌های خصوصی شده است. این موضوع شاخص مهمی است تا در آینده نزدیک محققان زیست‌فناوری از ریشه‌های مویین به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای دستیابی به منابع نهفته گیاهی استفاده نمایند.

REFERENCES

Ahlawat S, Saxena P, Ram M., Alam P, Nafis T, Mohd A, Abdin MZ (2012) Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots for enhanced production of artemisinin in *Artemisia annua* L. plants. African J Biotechnol. 11: 8684-91.

Banihashemi O, Khavari-Nejad RA, Yassa N, Najafi F (2015) Induction of hairy root in *Atropa komarovii* using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. Indian J Fundament. Appl. Life Sci. 5(4):22-31.

Bensaddek L, Gillet F, Nava-Saucedo JE, Fliniaux MA (2001) The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. J. Biotech. 85: 35-40.

Bensaddek L, Villarreal ML, Fliniaux MA (2008) Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Int. J. Integr. Biol. 3(1):2-9.

Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Lacoux J, Fliniaux MA JacquinDubreuil A (2000) Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rolA, B, C genes only. J. Biotech. 81(2): 151-158.

Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spano L, Capone I, Costantino P (1987) *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. Mol. Gen. Genet. 209(3): 475-480.

Chabaud M, Boisson-Dernier A, Zhang J, Taylor CG, Yu O, Barker DG (2006) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. The Medicago truncatula handbook, version November.

Dehghan E, Häkkinen ST, Oksman-Caldentey KM, Ahmadi FS (2012) Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and in

vitro hairy root cultures of *Egyptian henbane* (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 110(1): 35-44.

Dini Torkamani MR, Abas Pour N, Jafari M, Samadi A (2014) Induction and optimization of hairy root growth condition for *Valeriana officinalis* L. through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes.* J Cell Tissue 5(1): 23-30.

Filizadeh Y, Goodarzi G (2010) Essential Oils from Hairy Root Cultures and Field Cultivated Roots of

Valerian (Valeriana sisymbriifolium). J Med. Plants 9(35): 1-9.

Granicher F, Christen P, Kapetanidis I (1995) Essential oils from normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. sambucifolia. Phytochemistry 40(5): 1421-1424.

Guillon S, Guiller JT, Pati PK, Rideau M, Gantet P (2006) Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. J. Plant Biol. 9: 341-346.

Gutierrez- valdes N, Hakkinen ST, Lemasson C, Guillet M, Marja K, Caldenty O, Ritala A, Cardon F (2020) Hairy root culture-A versatile tool with multiple applications. Front. Plant Sci. 3: 165-172.

Ho ZB, Du M (2006) Hairy root and its application in plant genetic engineering. J. Integr. Plant Biol. 48(2): 121-127.

Ionkova I (2007) Biotechnological approaches for the production of Lignans. Pharmacogn. Rev. 1: 427-443.

Kabirnataj S, Nematzadeh G, Zolala J, Talebi AF (2016) High-efficient transgenic hairy roots induction in chicory: Re-dawn of a traditional herb. Acta Agric. Slov. 107(2): 321-332.

Khan S, Qureshi MI, Alam T, Abdin MZ (2007) Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. Afr. J. Biotechnol. 6(3): 175-183.

Mehrotra S, Kukreja AK, Khanuja SPS, Mishra BN (2008) Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. Electron. J. of Biotechn. 9(1):41-47.

Mi Y, Zhu Z, Qian G, Li Y, Meng X, Xue J, Chen Q, Sun W, Shi Y (2020) Inducing Hairy Roots by Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). J. Vis. Exp. 157: 67-75.

Morgan J, Barney C, Penn A, Shanks J (2000) Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 262-265.

Morton EL, Fuqua C (2012) Unit3D.1 Laboratory maintenance of agrobacterium. Curr. Protoc. Microbiol. 6:1-8.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Murthy HN, Dijkstra C, Anthony P, White DA, Davey MR, Power JB, Hahn EJ, Paek KY (2008) Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of Withanolide A. J. Integr. Plant Biol. 50: 975-981.

Nartop P (2018) Engineering of Biomass Accumulation and Secondary Metabolite Production in Plant Cell and Tissue Cultures. Plant metabolites and regulation under environmental stress. Academic Press, pp 169-194.

Nilsson O, Olsson O (1997) Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. Physiol. Plant. 100(3): 463-473.

Pakdin-Parizi A, Farsi M, Nematzade GA, Mirshamci A (2015) Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis* L. Acta Agric.Slov. 103(2): 299-305.

Pandey R, Krishnasamy V, Kumaravadivel N, Rajamani K (2014) Establishment of hairy root culture and production of secondary metabolites in Coleus (*Coleus forskohlii*). J. Med.

Plants Res. 8(1): 58-62.

Petersen SG, Stummann BM, Olesen P, Henningsen KW (1989) Structure and function of root-inducing (Ri) plasmids and their relation to tumor-inducing (Ti) plasmids. Physiol. Plant. 77(3): 427-435.

Pitta–Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme Microb. Tech. 26(2): 252-258.

Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó R, Palazon J (2016) Elicitation, an Effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. Molecules 21(2): 182-189.

Roychowdhary D, Majumder A, Jha S (2017) Biotechnology for medicinal plants. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges. Springer. pp. 29-68.

Shahzad A, Saeed T (2015). A review on Phytochemistry, Pharmacological properties and Biotechnological studies in *Valeriana officinalis* L., An important medicinal herb. Hippocratic J. Unani Medicine. 10(1): 53-71.

Sivakumar G, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2005) Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. Curr. Sci. 26: 641-649.

Sivanandhan G, Selvaraj N, Ganapathi A, Manickavasagam M (2014) An efficient hairy root culture system for *Withania somnifera*. African J. Biotech. 13: 4141-4147.

Soleimani T, Keyhanfar M, Piri KH, Hasanloo T (2012). Hairy root induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). J. Med Plants 3: 60-69.

Tamakawa T, Sekiguchi S, Kodama T, Smith S, Yeoman MM (1998) Transformation of *Chilli Pepper* (*Capsicum frutescens*) with a Phenylalanine Amonia-Lyase gene. J. Plant Biotech. 15: 189-193.

Thwe A, Valan Arasu M, Li X, Ha Park Ch, Kim SJ, Al-Dhabi NA, Un Park S (2016) Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). J. Microb. 7:318-327.

Weber RLM, Bodanese-Zanettini MH (2011) Induction of transgenic hairy roots in *soybean* genotypes by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. Pesqui. Agropecu. Bras. 46(9): 1070-1075.

Zebarjadi AR, Najafi Sh, Ghasempour HR, Motamedi J (2011) Establishment of a practical tissue culture for producing hairy roots of *Valeriana officinalis* L. via *Agrobacterium rhizogenes*. J. Med. Plants Res. 5(20): 345-355.