

ISSN: 3041-9638

<https://jrpsm.asnrkh.ac.ir/>

Open Access

Research Article

Study on the efficiency of *Agrobacterium* strains (*Agrobacterium rhizogenes*) and different types of explants on the transformation efficiency and antioxidant capacity of hairy roots of valerian (*Valeriana officinalis* L)

R. Biglari Farash¹, A. Kheiry¹ , Z. Ghahremani¹, Kh. Bagheri² and F. Razavi¹¹Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.²Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

Received: 04 Feb 2026

Accepted: 16 May 2026

Published: 19Jun2026

Corresponding Author:

Azizollah Kheiry

Email:
kheiry@znu.ac.ir

Keywords:

Molecular analysis,
Transformation,
Tissue culture,
Valeriana officinalis.

Citation:

R. Biglari Farash, A. Kheiry, Z. Ghahremani, Kh. Bagheri and F. Razavi. (2026). Study on the efficiency of *Agrobacterium* strains (*Agrobacterium rhizogenes*) and different types of explants on the transformation efficiency and antioxidant capacity of hairy roots of valerian (*Valeriana officinalis* L). *Journal of Research in Plant Metabolites*, 4(1), 35-47.

Doi:10.22034/jrpsm.2026.562414.1102

Extended Abstract

Background and objective: Production of hairy roots through *Agrobacterium rhizogenes* is an effective and sustainable method for the production of secondary metabolites in medicinal plants. Valerian (*Valeriana officinalis* L.) is a suitable candidate for biotechnology studies due to its valuable medicinal compounds such as valpotriates and valerenic acids. The aim of this study was to investigate the interaction effect of explant type and different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on the growth indices and antioxidant capacity of hairy roots of this plant.

Materials and Methods: The experiment was carried out as a factorial in a completely randomized design with two factors of explants (roots, stems and leaves) and bacterial strains (MSU), A4, A13 and ATCC. Standard seeds of the plant were cultured in MS medium. Bacterial strains were cultured in LB medium containing rifampicin and the final suspension was prepared with a concentration of 1×10^8 cells/ml in liquid MS medium. One-month-old explants were inoculated for 30 minutes in a bacterial suspension containing 100 mg/l of acetosyringone. After a 48-hour co-cultivation period on solid MS medium, excess bacteria were removed by washing in a medium containing cefotaxime. The parameters of induction percentage, root formation rate, number of roots per explant and dry weight of hairy roots were measured. Root transformation was confirmed by DNA extraction and amplification of the rolB gene by PCR using specific primers and a standard temperature program. Antioxidant activity Methanolic extracts of roots were measured by DPPH radical scavenging method. Data were analyzed with SAS software and means were compared by Duncan's multiple-range test.

Findings: The results showed that the interaction effect of explant and strain on all measured traits was significant. The highest percentage of hairy root induction (%99.3) was obtained in the combination of root explant and MSU strain and the lowest (%48.7) belonged to the stem inoculated with ATCC strain. The fastest emergence of hairy roots (5 days after inoculation) was observed in root explant and MSU strain and the slowest induction (average 26 days) belonged to stem and ATCC strain. MSU strain induced the highest number of roots (maximum 7 in each explant) in all organs. However, the highest dry weight of hairy roots (0.22 g) was in leaf explant and in all three strains MSU, A4 and A13 was obtained. Also, Hairy roots derived from leaves in all strains showed the highest antioxidant activity (64.08% inhibition) and roots derived from root explants showed the lowest activity (36.21%). The presence of a specific band of 780 bp of the rolB gene in the PCR product confirmed the successful transformation of all studied roots.

Conclusion: The results of this study showed that the optimal selection of the combination of explant and bacterial strain is a determining factor in the success of transformation and production of hairy roots in valerian. The MSU strain was identified as the most efficient strain in terms of induction percentage, formation rate and number of roots, while the leaf explant was superior in achieving maximum biomass and antioxidant activity. This study is an effective step towards standardizing the protocol for producing valerian hairy roots as a sustainable and cost-effective alternative for extracting medicinal compounds from this valuable plant.





دسترسی رایگان

مقاله پژوهشی

شماره شاپا: ۳۰۴۱-۹۶۳۸

بررسی کارایی سویه‌های آگروباکتریوم (*Agrobacterium rhizogenes*) و انواع ریز نمونه بر بازده تراریختی و ظرفیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های مویین گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.)

راضیه بیگلری فراش^۱، عزیزاله خیری^۱، زهرا قهرمانی^۱، خدیجه باقری^۲ و فرهنگ رضوی^۱

^۱گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

^۲گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۵

چکیده

سابقه و هدف: تولید ریشه‌های مویین از طریق آگروباکتریوم ریزوژن (*Agrobacterium rhizogenes*)، روشی مؤثر و پایدار برای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی است. گیاه دارویی سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) با دارا بودن ترکیبات دارویی ارزشمند همچون والپوتریات‌ها و اسیدهای والرنیک، کاندیدای مناسبی برای مطالعات بیوتکنولوژی است. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر متقابل نوع ریزنمونه و سویه‌های مختلف آگروباکتریوم ریزوژن بر شاخص‌های رشدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین گیاه دارویی سنبل الطیب است.

مواد و روش‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور ریزنمونه (ریشه، ساقه و برگ) و سویه باکتری (*MSU*، *A4*، *A13* و *ATCC*) انجام شد. بذورهای استاندارد گیاه، در محیط *MS* کشت شدند. سویه‌های باکتری در محیط *LB* حاوی ریفامپیسین کشت داده شدند و سوسپانسیون نهایی با غلظت $10^8 \times 1 \text{ CFU/ml}$ سلول در میلی‌لیتر در محیط *MS* مایع تهیه شد. ریزنمونه‌های یک‌ماهه به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری حاوی 10^8 میلی‌گرم در لیتر استوسیرینگون تلقیح شدند. پس از دوره هم‌کشتی ۴۸ ساعته بر روی محیط *MS* جامد، باکتری‌های اضافی با شستشو در محیط حاوی سفوتاکسیم حذف شدند. پارامترهای درصد القا، سرعت تشکیل ریشه، تعداد ریشه در هر ریزنمونه و وزن خشک ریشه‌های مویین اندازه‌گیری شدند. همچنین تراریختی ریشه‌ها با استخراج *DNA* و تکثیر ژن *rolB* به روش *PCR* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و برنامه دمایی استاندارد تأیید گردید. از سوی دیگر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی ریشه‌ها با روش مهار رادیکال *DPPH* سنجیده شد. داده‌ها با نرم‌افزار *SAS* تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد که اثر متقابل ریزنمونه و سویه بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. بیشترین درصد القای ریشه مویین (۹۹/۳ درصد) در ترکیب ریزنمونه ریشه و سویه *MSU* حاصل شد و کمترین میزان (۴۸/۷ درصد) متعلق به ساقه تلقیح‌شده با سویه *ATCC* بود. سریع‌ترین ظهور ریشه‌های مویین (۵ روز پس از تلقیح) در ریزنمونه ریشه و سویه *MSU* مشاهده شد و کندترین القا (میانگین ۲۶ روز) به ساقه و سویه *ATCC* تعلق داشت. سویه *MSU* در تمامی اندام‌ها بیشترین تعداد ریشه (حداکثر ۷ عدد در هر ریز نمونه) را القا نمود. با این حال، بیشترین وزن خشک ریشه‌های مویین (۰/۲۲ گرم) در ریزنمونه برگ و در هر سه سویه *MSU*، *A4* و *A13* به دست آمد. ریشه‌های مویین حاصل از برگ سنبل الطیب در تمامی سویه‌ها بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶۴/۰۸ درصد مهار) و ریشه‌های مشتق‌شده از ریزنمونه ریشه کمترین فعالیت (۳۶/۲۱ درصد) را نشان دادند. حضور باند اختصاصی ۷۸۰ جفت بازی ژن *rolB* در محصول *PCR*، تراریختی موفق تمامی ریشه‌های مورد مطالعه را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که انتخاب بهینه‌ی ترکیب ریزنمونه و سویه باکتری، عاملی تعیین‌کننده در موفقیت تراریختی و تولید ریشه‌های مویین در گیاه دارویی سنبل الطیب است. سویه *MSU* به عنوان کارآمدترین سویه از نظر درصد القا، سرعت تشکیل و تعداد ریشه شناخته شد، در حالی که ریزنمونه برگ برای دستیابی به حداکثر زیست‌توده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برتر بود. این مطالعه گامی مؤثر در جهت استانداردسازی پروتکل تولید ریشه‌های مویین سنبل الطیب به عنوان جایگزینی پایدار و مقرون‌به‌صرفه برای استخراج ترکیبات دارویی این گیاه ارزشمند است.

نویسنده مسئول:

عزیزاله خیری

ایمیل:

kheiry@znu.ac.ir

واژه‌های کلیدی: آنالیز مولکولی،

ترانسفورماسیون، کشت

بافت، *Valeriana*

officinalis

نحوه استناد:

بیگلری فراش، ر.، خیری، ع.، قهرمانی، ز.، باقری، خ.، رضوی، ف. (۱۴۰۵) بررسی کارایی سویه‌های آگروباکتریوم (*Agrobacterium rhizogenes*) و انواع ریز نمونه بر بازده تراریختی و ظرفیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های مویین گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.).

مجله پژوهش در متابولیت‌های گیاهی، دوره ۴، شماره ۱، صفحات: ۳۵-۴۷.

Doi:10.22034/jrpsm.2026.562414.1102

مقدمه

تولیدات طبیعی گیاهان دارویی منبع غنی برای درمان بسیاری از بیماریهای انسان و دام بوده که با اثبات عوارض خطرناک و اثرهای مخرب و جانبی داروهای شیمیایی، استفاده از آنها به طور چشمگیری در حال افزایش است (Fitzgerald et al., 2020). متابولیت های ثانویه گیاهی (PSM) متنوعی از جمله ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و ترکیبات مشتق شده از آلکالوئیدها شناسایی شده اند که برای اهداف دارویی، افزودنی های غذایی، طعم دهنده ها، کشاورزی و سایر مواد اولیه صنعتی مفید هستند (Dasari et al., 2020). این PSM ها در مقادیر کم موجود هستند و برداشت آنها در مقیاس تقاضای فعلی ممکن است از نظر زیست محیطی ناخوشایند و جبران ناپذیر باشد. بعلاوه پیچیدگی ساختاری متابولیت های ثانویه گیاهی سنتز شیمیایی آنها را عملاً غیر ممکن می کند (Marchev et al., 2020). کشت سلول های گیاهی مزیت بزرگی برای رفع این چالش ها، به ویژه برای تکثیر محصولات تجاری یا دارویی با ارزش بالا، ارائه می دهد (Jadid et al., 2024). انتخاب دقیق انواع سلول های گیاهی مولد و کنترل دقیق شرایط کشت می تواند منجر به سطوح بالاتر محصولات خاص در سلول های کشت شده شود. سنبل الطیب (Valeriana officinalis L) گیاهی چند ساله از خانواده سنبل الطیب (Valerianaceae) است که بیشتر در مناطق مرطوب اروپا و آسیا رشد می کند. این گیاه دارای گل های کوچک و معطر بوده و ریشه و ریزوم آن حاوی ترکیبات فعال دارویی از جمله روغن های فرار مانند بورنئول، کامفن، میرسن و لینالول هستند که سبب خواص آرام بخش و ضد تشنجی آن می شوند. بعلاوه ترپنوئیدها شامل مونوترپن ها و سزکویی ترپن ها مانند والرنال و والرئول در اثرات درمانی سنبل الطیب نقش دارند (Sezen Karaoglan, 2022). تحقیقات اخیر نشان می دهد که ترکیبات والرنیک اسید، والپوتریات ها در این گیاه به بهبود کیفیت خواب و کاهش اضطراب و افسردگی کمک کرده و در بهبود بیماری های تخریب عصبی مانند آلزایمر نیز مفید واقع می شوند (Wang et al., 2022). اسید والرنیک موجود در سنبل الطیب باعث افزایش سطح انتقال دهنده عصبی بازدارنده (GABA) در مغز می شود و اثرات آرام بخش دارد، همچنین به میزان قابل توجهی فعالیت فاکتور نورون زایی مشتق شده از مغز (BDNF) را افزایش میدهد، که در پیشگیری از افسردگی مؤثر است (Gonulalan et al., 2020). ریزوم های سنبل الطیب به دلیل داشتن سزکویی ترپن فعال دارویی اسید والرنیک، به طور سنتی به عنوان آرام بخش، ضد صرع و ضد تشنج مورد استفاده قرار گرفته اند (Sezen Karaoglan, 2022). با این حال، این گیاه به طور طبیعی فقط

مقادیر کمی از این ترکیب را تولید می کند. ریشه های موئین ظرفیت بیوسنتزی مشابه گیاه والد خود دارند و در طول تکثیر، پایداری ژنتیکی بالایی از خود نشان می دهند. این مزایا، آنها را به ابزاری ارزشمند برای تولید متابولیت هایی مانند اسید والرنیک تبدیل می کند، زیرا می توانند از گیاه والد تقلید کنند (Kaur et al., 2021). تحقیقات در زمینه تولید صنعتی سنبل الطیب نشان می دهد که استفاده از بیورآکتورهای حاوی ریشه های موئین تراریخته، امکان تولید پایدار و گسترده ترکیبات فعال دارویی آن را فراهم می کند (Folgado et al., 2021). ریشه های موئین از طریق سیستم تراریختی آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) القا می شوند. آگروباکتریوم رایزوژنز یک باکتری گرم منفی خاکری متعلق به خانواده (Rhizobiaceae) و مسئول تولید ریشه موئین در محل آلودگی می باشد (Desmet et al., 2020). آگروباکتریوم پس از اتصال به سلول های گیاهی در ناحیه زخم شده، ژن های ویروالانس (vir) خود را فعال می کند. این ژن ها بخشی از پلاسمید (Root- Ri (inducing) باکتری به نام T-DNA (Transfer DNA) را به سلول گیاهی منتقل می کنند. T-DNA پس از ادغام با ژنوم گیاه در هسته، ژن های *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* را در سلول های گیاهی بیان و باعث تغییر در تنظیم هورمون های گیاهی، به ویژه افزایش سطح اکسین و تشکیل ریشه های موئین می شود (Zhao and Tang, 2020). مطالعات نشان دادند که الحاق T-DNA به داخل ژنوم گیاه می تواند مرتبط با نوع سویه باکتریایی و تعداد نسخه های انتقال یافته باشد که این امر بر رشد و متابولیسم ثانویه ریشه های موئین تراریخته اثر می گذارد (Bandyopadhyay et al., 2007). محققان با بررسی تراریختی ریز نمونه های مختلف برگ، ساقه و ریشه گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز گزارش کردند که ریز نمونه برگ همراه با دم برگ در مقایسه با سایر ریز نمونه ها بیشترین درصد تراریختی را نشان دادند (Pirian, et al., 2012). در مطالعه القای ریشه موئین در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*)، گزارش شد که ریشه موئین در ریزنمونه گره تولید و در سایر ریزنمونه ها از جمله برگ و ساقه هیچگونه ریشه موئینی مشاهده نگردید (Zare Hasan Abadi et al., 2020). پژوهشگران در مطالعه انجام شده بر روی القای ریشه موئین در گیاه دارویی پریلا با سویه ATCC ۱۵۸۳۴ آگروباکتریوم رایزوژنز گزارش کردند که ریزنمونه برگ بیشترین درصد تولید ریشه های موئین را ایجاد نموده است (Phuong et al., 2021). پژوهشگران القای ریشه های موئین در ریحان مقدس (*Ocimum tenuiflorum*) را با آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ATCC ۱۵۸۳۴ مورد مطالعه قرار دادند

LB حاوی ریفامپسین (۵۰۰ میلی گرم بر لیتر) انجام گرفت. محیط LB شامل تریپتون، عصاره مخمر، کلرید سدیم و آگار بود که پس از اتوکلاو شدن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه، ریفامپسین (در دمای ۵۰ درجه محیط کشت) به آن افزوده شد. سپس ۲۰ میلی لیتر از محیط به پتری دیش منتقل و پس از جامد شدن، تلقیح با لوپ انجام و پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به صورت وارونه در تاریکی انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت کلونی منفرد به محیط LB مایع (pH=۷/۲) حاوی ریفامپسین منتقل شد و کشت به مدت ۲۴ ساعت با دور rpm ۱۲۰ شیک شد تا تراکم OD600=0.6 حاصل گردد. سپس باکتری‌ها با سرعت rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و رسوب باکتری با آب مقطر سه مرتبه شستشو داده شد. در ادامه، سوسپانسیون نهایی باکتریایی در محیط MS مایع (pH=۵/۸) حاوی ۲۰ میکرولیتر باکتری تهیه و به مدت ۳ ساعت با دور rpm ۱۲۰ شیک شد. غلظت نهایی سوسپانسیون باکتریایی به $10^8 \times 1 \text{ CFU/ml}$ تنظیم شد. ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه سنبل الطیب در شرایط استریل به قطعات کوچک برش و زخم سطحی داده شده و در سوسپانسیون باکتریایی به همراه (mg/L) ۱۰۰ استوسیرینگون قرار گرفتند. تلقیح در ارلن‌های جداگانه و بر روی شیکر انکوباتور با دور rpm ۸۰ و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از تلقیح، ریزنمونه‌ها به محیط MS جامد (حاوی ۸ گرم آگار، ۳۰ گرم ساکارز با pH=۵/۸) بدون باکتری منتقل و برای ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه شدند تا انتقال T-DNA صورت گیرد. در مرحله بعد، برای حذف باکتری باقی مانده، نمونه‌ها در محیط MS مایع استریل حاوی ۲۰۰ mg/L سفوتاکسیم به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر rpm ۸۰ شسته شدند. سپس به محیط MS جامد حاوی ۵۰۰ mg/L سفوتاکسیم منتقل و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. این مرحله تا حذف کامل باکتری‌ها چندین بار تکرار شد و در نهایت، لاین‌های پررشد ریشه‌های موئین انتخاب شدند.

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین: به منظور تأیید تراریختی ریشه‌های موئین و حضور ژن *ro/B*، استخراج DNA از ریشه‌های تیمار شده با *A. rhizogenes* به روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle, 1990). خلوص و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز بررسی گردید. برای شناسایی ژن *ro/B*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی (آغازگر رفت با توالی 5'-gctcttgacgtgctagatt-3' و آغازگر برگشت با توالی 3'-5'-gaaggtgcaagctacctc اجرا شد. تکثیر قطعات ۷۸۰ bp ژن *ro/B* با استفاده از آغازگرهای مورد اشاره انجام گرفت. جهت آماده سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش، از ۱

و گزارش نمودند که بیشترین میزان القای ریشه موئین در ریزنمونه برگ بوده است (Vyas and Mukhopadhyay, 2014). در گیاه شابیزک القای ریشه زایی با استفاده از آگروباکتریوم سویه ATCC15834 در ریزنمونه دیسک برگ‌ی بهترین نتیجه را نشان داد (Banihashemi et al., 2015). اگرچه فناوری تولید ریشه موئین سنبل الطیب در بیوراکتور از نظر علمی امکانپذیر است و ریشه این گیاه منبع اکثر ترکیبات فعال و با اهمیت دارویی آن است، ولی هنوز تولید انبوه تجاری آن در بیوراکتورها در مقیاس بزرگ گزارش نشده است، با این حال، تحقیقاتی در زمینه کشت ریشه‌های موئین این گیاه و بهینه سازی شرایط تولید متابولیت‌های دارویی آن در حال انجام است و لذا این آزمایش به منظور تعیین بهترین سویه باکتری جهت ریشه زایی و بهترین پاسخ ریز نمونه جهت تولید بهینه ریشه موئین در گیاه سنبل الطیب طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: بذر استاندارد گیاه سنبل الطیب دارویی با کد MPL SB ۰۱۵ VO ۶۷۴ از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد. برای شکستن خواب فیزیولوژیکی، بذرها به مدت ۲۴ ساعت در محلول اسید جیبرلیک با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر خیسانده شدند (Bhat and Sharma, 2015). به منظور ضدعفونی، ابتدا بذرها به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد غوطه‌ور گردیدند (هیپوکلریت سدیم تجاری (وایتکس) حاوی ۵٪ کلر فعال بود. که به نسبت ۵ به ۱ با آب استریل رقیق شد تا محلول نهایی با ۱٪ کلر فعال بدست آمد. پس از آن، بذرها در سه مرحله (به مدت ۵، ۷ و ۲۰ دقیقه) با آب مقطر استریل شسته شدند. بذرها استریل شده در محیط کشت جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، حاوی ۸ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم ساکارز کشت داده شدند. pH محیط کشت بر روی ۵/۸ تنظیم گردید. سپس ظروف کشت در اتاقک رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و چرخه نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به منظور جوانه‌زنی نگهداری شدند. القای ریشه‌های موئین در سه نوع ریزنمونه برگ و ریشه و ساقه از گیاهان درون شیشه ای سنبل الطیب، یکماه پس از جوانه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت.

کشت باکتری، تلقیح و هم کشتی ریزنمونه: در این تحقیق، چهار سویه آگروباکتریوم رایزوژنز (A4 و A13، MSU440 و ATCC15834) حاوی ژن مقاومت به ریفامپسین از گروه ژنتیک و به نژادی دانشگاه زنجان تهیه شد. کشت تازه باکتری در محیط جامد

نتایج و بحث

درصد القای ریشه موئین: شکل ۱ درصد القای ریشه موئین را در اندام های مختلف گیاه و تحت تأثیر سویه های مختلف آگروباکتریوم نشان می دهد. نتایج نشان داد بین اندام ها و سویه های مختلف تفاوت قابل توجهی در میزان القای ریشه موئین وجود دارد. به طور کلی، اندام ریشه در تمام سویه ها بالاترین درصد القای ریشه موئین را نشان داد، بطوریکه بیشترین درصد القاء ریشه موئین در ریشه و به میزان ۹۹/۳٪ بود. در حالی که ساقه کمترین درصد القا را در تمامی سویه ها داشت. این نتیجه می تواند به دلیل تفاوت در ساختار بافتی، ترکیب فیتوشیمیایی و میزان حساسیت سلول های هر اندام به عفونت باکتریایی باشد. در بین سویه های مورد بررسی، سویه MSU بیشترین درصد القا در اندام ریشه (حدود ۹۹/۳٪) و همچنین در برگ (۸۹/۷٪) را نشان داد، در حالی که سویه ATCC درصد القای کمتری (۴۸/۷٪) به ویژه در ساقه ها داشت. همچنین مشاهده شد که در تمام سویه ها، القای ریشه موئین در اندام برگ نسبتاً بالا بود (حدود ۸۰٪ تا ۹۰٪)، که نشان دهنده قابلیت بالای این اندام در پذیرش ژن های *rol* و شروع تمایز ریشه های موئین است. به طور کلی، نتایج نشان می دهد که نوع سویه باکتری تأثیر معنی داری بر درصد القای ریشه موئین دارد و سویه MSU در این پارامتر مؤثرتر از سایر سویه ها بود، در حالی که در پارامتر سرعت القا (نمودار قبلی) عملکرد برتر از آن سویه ATCC بود. این یافته ها بیانگر آن است که انتخاب سویه مناسب *A. rhizogenes* بسته به هدف آزمایش (سرعت در برابر درصد القا) باید به دقت انجام گیرد. این اختلاف می تواند ناشی از تفاوت در پایداری انتقال ژن های پلاسمید Ri، سطح بیان ژن های *rol* و سازگاری سویه با نوع بافت میزبان باشد. درصد القای ریشه موئین به وضوح تحت تأثیر نوع اندام و سویه قرار گرفت. اندام ریشه بالاترین درصد القا (حدود ۱۰۰٪) در سویه MSU و ساقه پایین ترین درصد (کمتر از ۵۰٪) را نشان داد. نتایج مشابهی در گیاه جین سینگ (*Panax ginseng*) (Vanek *et al.*, 2005) و در نعنا فلفلی (*Mentha piperita*) (Farhadi *et al.*, 2021) گزارش شده است، که در آن ها نیز درصد القا در اندام های زیرزمینی بیش از اندام های هوایی بود.

سرعت تشکیل ریشه (تعداد روز تا القای ریشه موئین): نتایج اثر متقابل (شکل ۲) نشان داد که در سطوح مختلف ریزنمونه در هر سطح از باکتری مورد مطالعه از نظر سرعت تشکیل ریشه موئین تفاوت معنی داری وجود دارد، به طوری که سریعترین تظاهر ریشه های موئین (۵ روز) در ترکیب تیماری ریزنمونه ریشه و سویه MSU مشاهده شد.

میکرولیتزر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومول در لیتزر، ۱۲/۵ میکرولیتزر از کیت آماده PCRm master mix شرکت دنا زیست (حاوی بافر ۱۰X pcr، انزیم Taq DNA Polymerase، $MgCl_2$ (۴ میلی مول بر لیتزر) و dNTPs (۱۰ میکرومول بر لیتزر)، ۱ میکرولیتزر (۲۵ نانوگرم) DNA ژنومی و ۹/۵ میکرولیتزر آب مقطر استریل دیونیزه استفاده گردید. برنامه ترموسایکلر (مدل T100 Thermal Cycler شرکت Bio-Rad) شامل دناتوراسیون اولیه در $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر $58^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در $72^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و در نهایت بسط نهایی در $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵ سیکل انجام شد. محصولات PCR شامل مارکر ۱۰۰ جفت باز (CinnaGen)، کنترل منفی (DNA غیرتراریخت)، کنترل مثبت (DNA تراریخت) و نمونه های DNA روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE 0.5X الکتروفورز (۸۰ ولت، ۱ ساعت) بارگذاری شدند و پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، باندهای تشکیل شده، در دستگاه ژل داک (مدل Compact Pro ساخت ATP شرکت پدیده نو ژن پارس) مشاهده و با مارکر مقایسه گردیدند (Banihashemi *et al.*, 2015).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH: نیم گرم از ریشه های موئین حاصل از هر تیمار در هاون چینی با ازت مایع پودر شد. ۱ میلی لیتر متانول خالص به پودر ریشه افزوده و ترکیب به اپندروف ۱۵ میلی لیتری منتقل شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک نگهداری شد. سپس مخلوط عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محلول رویی را با سمپلر برداشته و در فریزر جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی نگهداری شد (Saha *et al.*, 2004). مخلوط هر واکنش پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر UV/Vis در برابر بلانک حاوی متانول خوانده شد.

درصد مهار اکسیداسیون هر نمونه از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$AI = (A - A_0 / A_0) \times 100$$

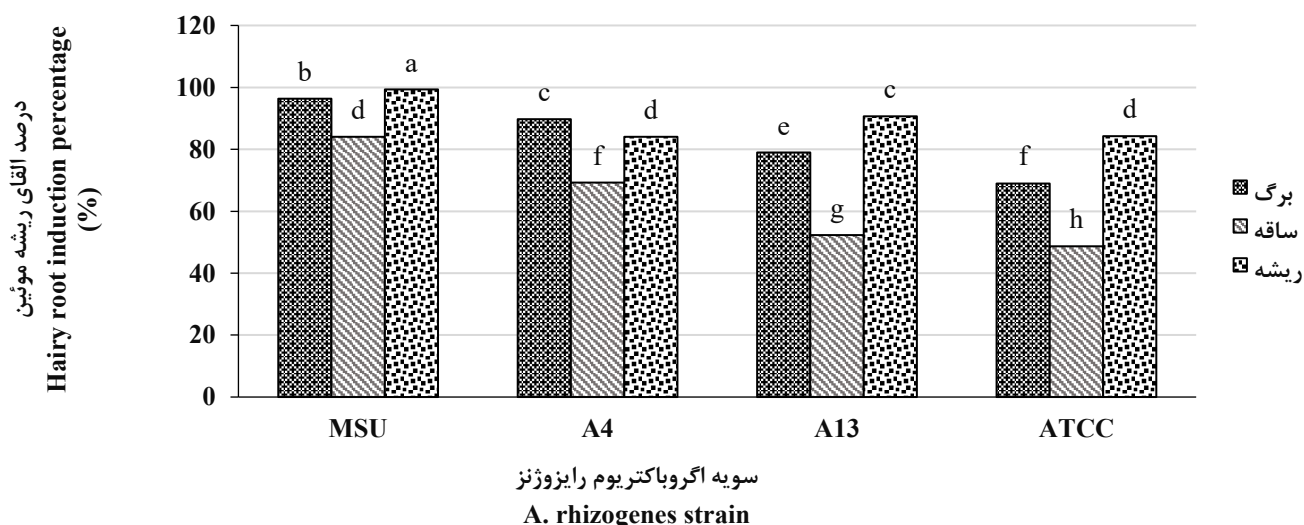
رابطه ۱:

AI: درصد مهار اکسیداسیون

A0: جذب محلول کنترل

A: جذب محلول حاوی مهار کننده ی اکسیداسیون

آنالیز آماری: آزمایش بر اساس فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار (SAS v 9.1) انجام گرفت و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گردید. نمودارها با استفاده از نرم افزار (Excel 2016) ترسیم شدند.



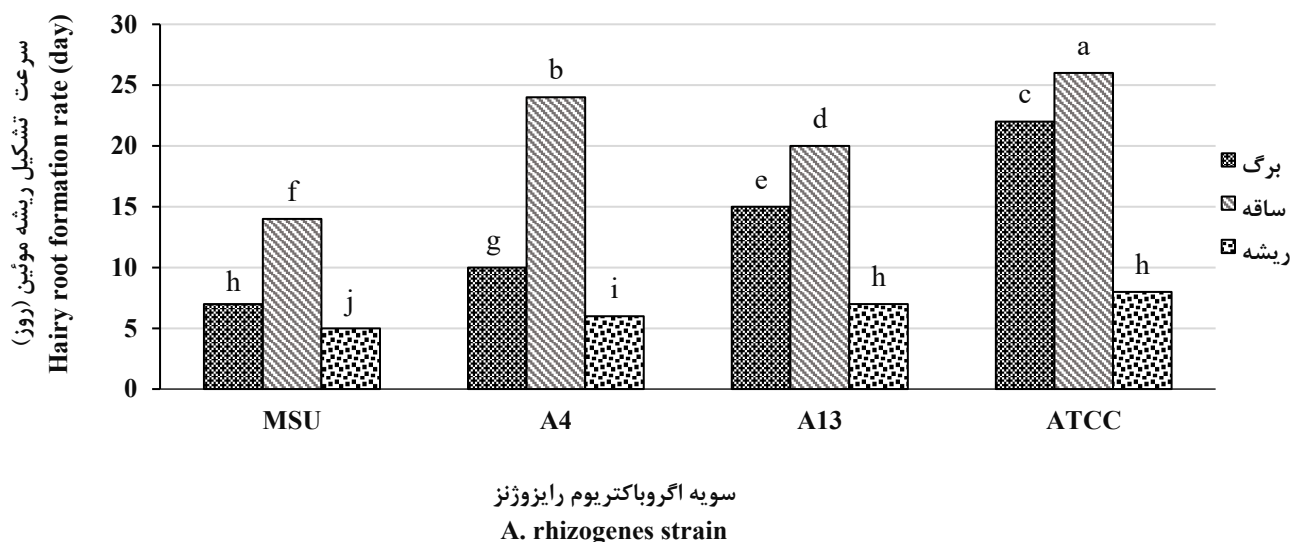
شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه و نوع سویه آگروباکتریوم بر درصد القای ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب
Figure 1- Comparison of the average effect of explant type and Agrobacterium strain type on the percentage of hairy root induction of valerian plant

اندام گیاهی اثر معنی‌داری بر میزان ریشه‌زایی داشتند (شکل ۳). در بین اندام‌ها، ریزنمونه ریشه بیشترین تعداد ریشه موئین القا شده را در تمامی سویه‌ها نشان داد، در حالی که برگ کمترین میزان القا را داشت. در بین سویه‌های مختلف، سویه MSU بیشترین تعداد ریشه موئین در هر ریزنمونه (حدود ۷ عدد) را تولید کرد که تفاوت معنی‌داری با سایر سویه‌ها داشت. این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در قابلیت باززایی بافت‌ها، تراکم سلول‌های مریستمی و سطح بیان ژن‌های مرتبط با ریشه‌زایی مانند *rolB* و *rolC* باشد.

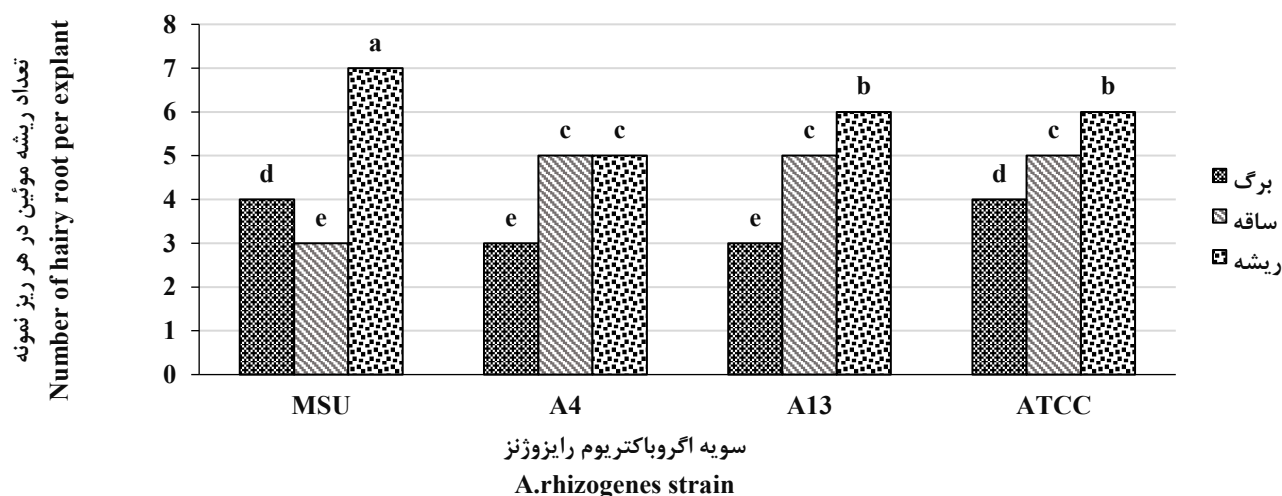
بافت‌های ریشه معمولاً حساسیت بیشتری به القای ژن‌های پلاسمید Ri داشته و محیط فیزیولوژیکی مناسب‌تری برای تمایز ریشه‌های موئین فراهم می‌کنند. به‌طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که سویه MSU بیشترین توانایی را در القای تعداد بالای ریشه موئین در گیاه مورد مطالعه دارد. در مطالعات پیشین تأثیر سویه باکتری بر درصد القای ریشه موئین در گونه‌های گیاهی مختلف اثبات شده است (Zehra et al., 1999). این نتایج با گزارش‌های قبلی در گیاهان دارویی نظیر تاتوره تماشایی (*Datura innoxia*) (Ghadermazi et al., 2016) و یونجه (*Medicago sativa*) (Mirazayi Delbari et al., 2022) مطابقت دارد، که در آن‌ها نیز تفاوت سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در تعداد و تراکم ریشه‌های موئین تأیید شده است. نتایج نشان داد که تعداد ریشه‌های موئین به‌طور معنی‌داری به نوع سویه و اندام بستگی دارد. بنابراین انتخاب سویه موثر آگروباکتریوم برای تولید ریشه‌های موئین، به نوع گونه گیاهی بستگی دارد و باید به دقت صورت گیرد (Lee et al., 2010).

در حالی که اندام ساقه تلقیح شده با سویه ATCC با میانگین حدود ۲۶ روز، پایین‌ترین سرعت القا را نشان داد. در کل در بین باکتری‌ها، سویه MSU بیشترین سرعت تشکیل ریشه موئین را در تمامی اندام‌ها نشان داد و پس از آن به ترتیب A13، A4 و ATCC قرار گرفتند. در مقابل در بین تمامی ریزنمونه‌ها ابتدا اندام ریشه سپس اندام‌های برگ و ساقه سریع‌ترین واکنش را به تشکیل ریشه موئین از خود نشان دادند. این امر می‌تواند به تفاوت در سطح حساسیت سلول‌های پارانشیمی و میزان توانایی باکتری در نفوذپذیری به بافت‌های مختلف مربوط باشد. تفاوت در سرعت القا احتمالاً ناشی از کارایی متفاوت پلاسمید Ri در انتقال ژن‌های *rolA*، *rolB* و *rolC* و نیز نفوذپذیری و ساختار بافتی متفاوت اندام‌ها است. این یافته‌ها نتایج گزارش‌شده در گیاه گیلاس زمستانی (*Withania somnifera*) (Kumar et al., 2005) و ریحان (*Ocimum basilicum*) (Ganjali et al., 2019) مطابقت دارد، که در آن‌ها نیز سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* تفاوت معنی‌داری در سرعت القا نشان دادند. پژوهشگران معتقدند که مدت زمان لازم جهت ظهور ریشه موئین حایز اهمیت است، از منظر کاربردی و اقتصادی نیز زمان کمتر القاء تنها به کوتاه شدن دوره کشت محدود نمی‌شود، بلکه با کاهش مراحل کشت و احتمال آلودگی، صرفه‌جویی در هزینه‌های نیروی کار، انرژی و نگهداری، امکان دستیابی سریع‌تر به بیوماس مولد متابولیت فراهم شده و کارایی و مقرون‌به‌صرفه بودن فرآیند تولید را در مقیاس بزرگ افزایش می‌دهد (Dehghan et al., 2012).

تعداد ریشه: نتایج حاصل از بررسی تعداد ریشه‌های موئین القا شده در هر ریزنمونه نشان داد که هم نوع سویه باکتریایی و هم نوع



شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه و نوع سویه آگروباکتریوم بر سرعت تشکیل ریشه های موئین گیاه سنبل الطیب
Figure 2- Comparison of the average effect of explant type and Agrobacterium strain type on the rate of hairy root formation of valerian plant



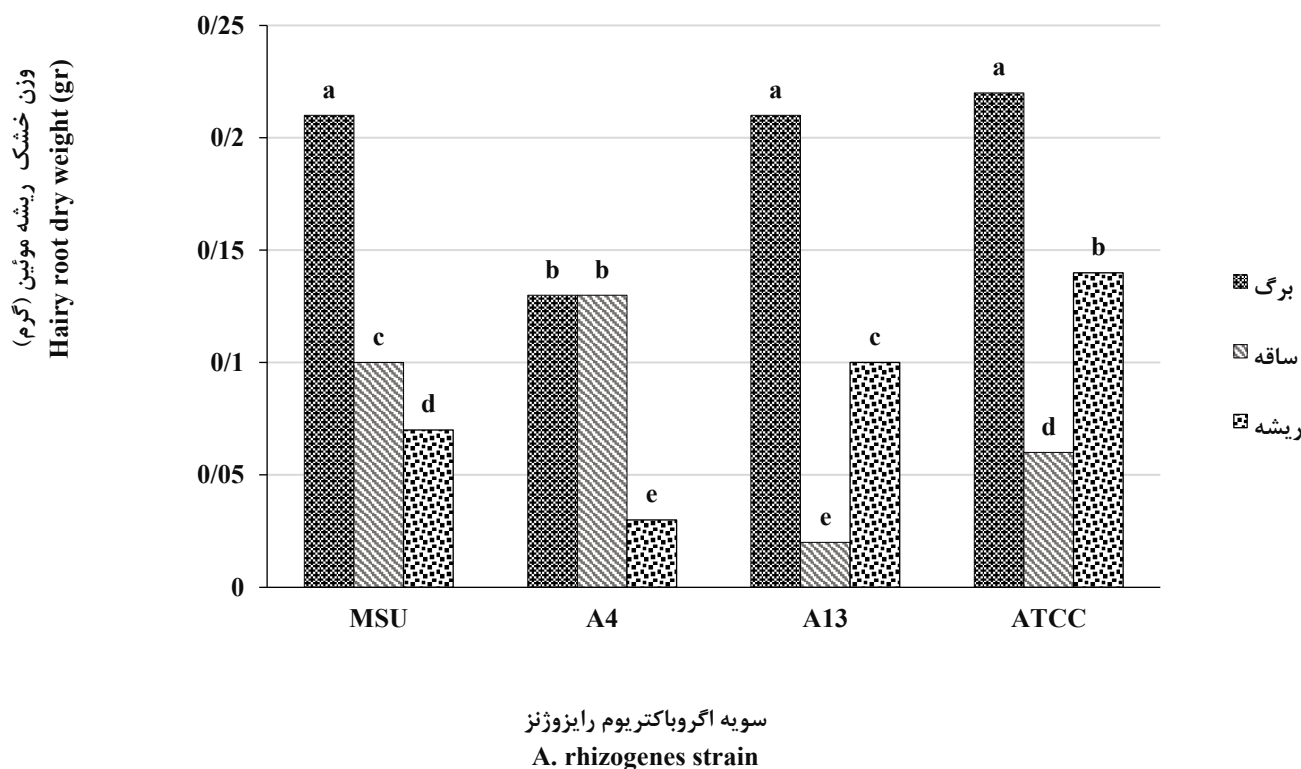
شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه و نوع سویه آگروباکتریوم بر تعداد ریشه های موئین گیاه سنبل الطیب
Figure 3- Comparison of the average effect of explant type and Agrobacterium strain type on the number of hairy roots of valerian plant

رشد سریع تر و زیست توده بالاتری برخوردارند، که احتمالاً ناشی از فعالیت بالاتر متابولیسمی، تراکم بیشتر تارهای ریشه، و سطح بیان قوی تر ژن های *rolA* و *rolB* در این اندام است. در میان سویه های مختلف آگروباکتریوم، سویه های MSU، A4 و A13 بیشترین وزن خشک (در حدود ۰/۲ گرم در هر ریزنمونه) را ایجاد کردند، در حالی که سویه ATCC وزن خشک کمتری (حدود ۰/۱۵ گرم) تولید کرد. اندازه گیری وزن خشک نشان داد که اندام برگ در تمامی سویه ها بیشترین زیست توده ی ریشه موئین را تولید کرد، در حالی که ساقه کمترین مقدار را داشت. رابطه

وزن خشک ریشه موئین: وزن خشک ریشه های موئین پس از دو ماه، به طور معنی داری متأثر از اثر متقابل ریزنمونه گیاهی و سویه باکتری بوده است. نتایج به دست آمده از اندازه گیری وزن خشک ریشه های موئین نشان داد که تفاوت معنی داری بین سویه های مختلف باکتری و اندام های گیاهی از نظر تولید زیست توده وجود دارد (شکل ۴). در میان اندام های گیاهی، بیشترین وزن خشک ریشه های موئین در تمامی سویه ها مربوط به اندام برگ (۰/۲۲ گرم) بود، در حالی که ساقه کمترین مقدار (۰/۰۲ گرم) را نشان داد. این نتیجه بیانگر آن است که ریشه های القا شده از بافت برگ از

somnifera (Tiwari et al., 2019) که افزایش تعداد ریشه‌های موئین با افزایش زیست‌توده و میزان متابولیت‌های ثانویه همراه بود هم‌خوانی ندارد.

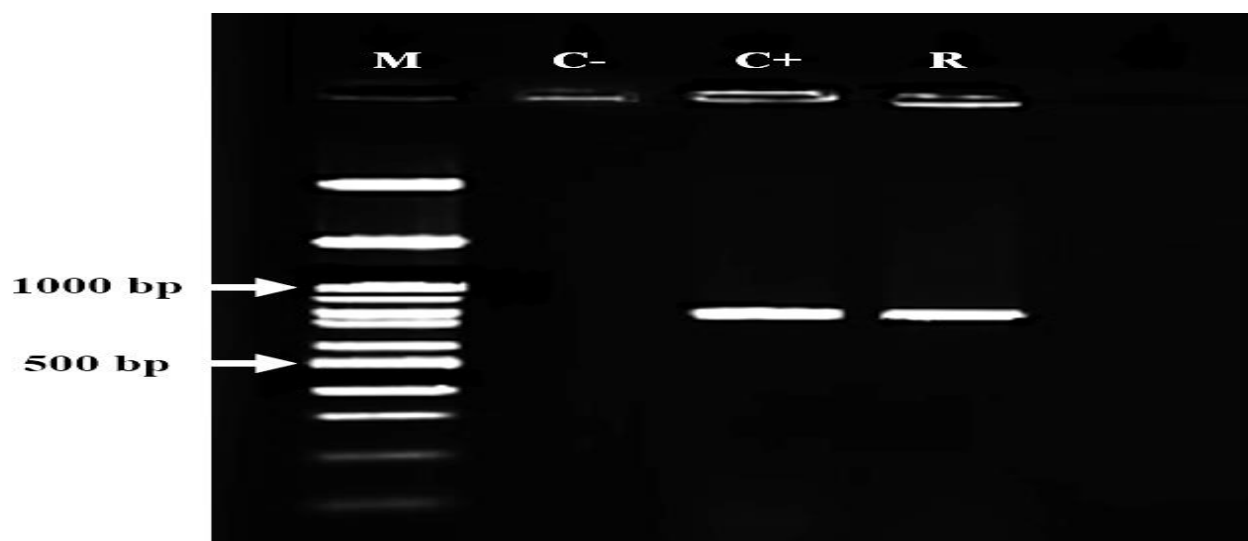
معکوس بین تعداد ریشه‌های موئین و وزن خشک نهایی در این مطالعه نشان‌دهنده‌ی همبستگی منفی بین کارایی القا و رشد زیست‌توده است. این یافته‌ها با نتایج گزارش‌شده در مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*) (Su et al., 2018) و در گیلاس زمستانی (*Withania*)



شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه و نوع سویه آگروباکتریوم بر وزن خشک ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب
Figure 4- Comparison of the average effect of explant type and Agrobacterium strain type on the dry weight of valerian hairy roots

القای ریشه موئین دارد، در حالی که ژن‌های *rolA*، *rolC* و *rolD* نقش تکمیلی ایفا می‌کنند (Sujatha et al., 2013). در مطالعه‌ای بر روی ریحان (*Ocimum basilicum*)، تراریختی ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و تکثیر یک قطعه ۷۰۰ جفت بازی تأیید گردید. این قطعه در نمونه‌های باکتری و ریشه‌های موئین مشاهده شد، اما در ریشه‌های طبیعی تکثیر نشد (Srivastava et al., 2016). همچنین در پژوهش‌های دیگر، تراریختی ریشه‌های موئین گیاهان دارویی بابا آدم (*Arctium lappa*) (Soleimani et al., 2012) و ساج سفید (*Gmelina arborea* Roxb) (Dhakulkar et al., 2005) با مشاهده باند مربوط به ژن *rolB* به تأیید رسیده است. پژوهشگران بر این باورند که توانایی سنتز متابولیت‌های دارویی در ریشه‌های موئین با سطح بیان ژن *rolB* همبستگی مستقیم دارد (Georgiev et al., 2007).

تأیید تراریختی ریشه‌های موئین: اگرچه رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت فاقد هورمون، نشان‌دهنده نفوذ و انتقال DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی است، اما تأیید قطعی تراریختی این ریشه‌ها با استفاده از روش PCR ضروری می‌باشد. در شکل ۵ وجود باند اختصاصی ژن *rolB* در نمونه ریشه‌های موئین (لاین R) و عدم مشاهده این باند در کنترل منفی (C-)، به وضوح نشان می‌دهد که انتقال ژن‌های T-DNA از پلاسمید Ri آگروباکتریوم به ژنوم گیاه میزبان با موفقیت انجام شده است. همچنین در لاین کنترل مثبت (C+) یک باند واضح در محدوده اندازه مورد انتظار برای ژن *rolB* مشاهده می‌شود. این باند مربوط به پلاسمید Ri آگروباکتریوم رایزوزنز است و صحت عملکرد آغازگرها و شرایط PCR را تأیید می‌کند. این نتیجه، تراریختی موفق ریشه‌های موئین را تأیید می‌کند. در این زمینه، پژوهشگران معتقدند که در میان ژن‌های *rol* پلاسمید Ri آگروباکتریوم رایزوزنز، ژن *rolB* نقش اصلی و ضروری در



شکل ۵- بررسی تراریختی ریشه های موئین از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و تایید حضور ژن *rolB*
 M: DNA مارکر ۱kbp، C-: ریشه های غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی، C+: پلاسمید Ri از *Agrobacterium rhizogenes*، R: ریشه های
 موئین القا شده از ریزنمونه ها

Figure 5- Investigation of hairy root transformation by polymerase chain reaction (PCR) and confirmation of the presence of the *rolB* gene

M: DNA of the kbp1 marker, C-: DNA of non-transgenic roots as a negative control, C+: Ri plasmid from *Agrobacterium rhizogenes*, R: DNA of hairy roots induced from explants

این مطالعه با چندین گزارش مقایسه‌ای پیشین تطابق دارد (Tavassoli *et al.*, 2018). مقایسه سویه‌ها در گیاهان مختلف نشان می‌دهد که انتخاب سویه مناسب باید بر پایه هدف (بیشینه‌سازی بیوماس در مقیاس یا بیشینه‌سازی تولید متابولیت خاص) انجام شود. یعنی سویه‌ای که بیشترین نرخ القا را دارد لزوماً بالاترین تولید ترکیب هدف را نخواهد داشت (Sathasivam *et al.*, 2022). به عبارت دیگر، سویه‌ای که بیشترین نرخ یا سریع‌ترین سرعت القای ریشه موئین را نشان می‌دهد، لزوماً مولدترین سویه از نظر تولید ترکیبات ثانویه ارزشمند نخواهد بود. این امر بر اهمیت ارزیابی جداگانه شاخص‌های رشدی و متابولیتی در مراحل بعدی کشت تأکید دارد.

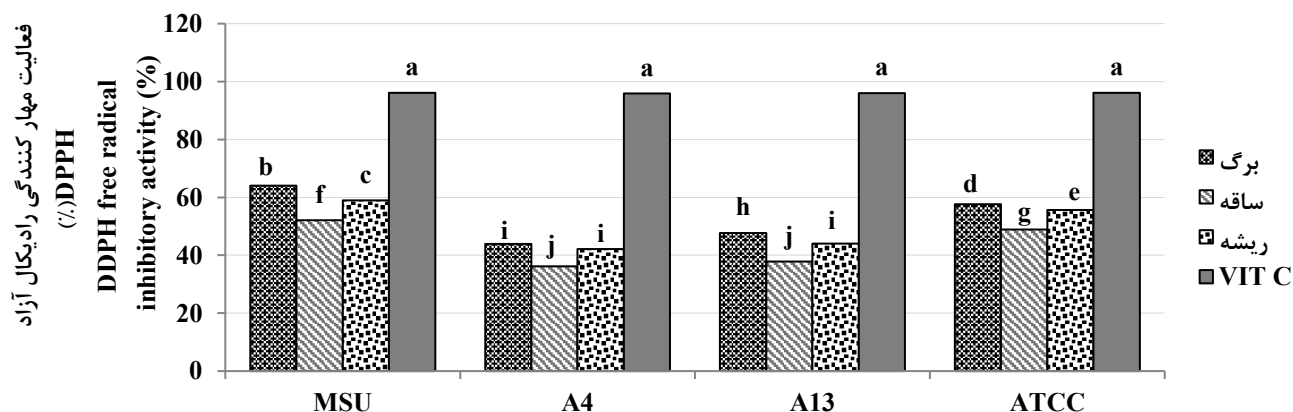
نتیجه گیری

در این مطالعه اثر متقابل ریزنمونه و سویه باکتری بر روی القای ریشه موئین در گیاه دارویی سنبل الطیب مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه ATCC بیشترین سرعت القا را دارد و برای مطالعاتی که هدف آن تسريع در فرآیند تراریختی یا تولید سریع ریشه‌های موئین اولیه در گیاه سنبل الطیب است، گزینه‌ی مناسبی است. سویه MSU بالاترین درصد، تعداد و وزن خشک ریشه‌های موئین را تولید کرد و برای مطالعات بیوتکنولوژی متابولیت‌های ثانویه و تولید پایدار زیست‌توده کارا تر است. اندام ریشه از نظر درصد القا و تعداد ریشه بهترین پاسخ را داشت، اما اندام برگ بیشترین

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی: نتایج آزمایش در شکل ۶ نشان داد که در همه سویه‌های مورد بررسی ریشه‌های موئین حاصل از ریز نمونه برگ بیشترین (۶۴/۰۸) فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) را نشان می‌دهد و ریشه‌های موئین حاصل از ریز نمونه ریشه کمترین (۳۶/۲۱) مقدار را دارد. همچنین ویتامین C (شاهد مثبت) بالاترین مقدار مهار را ارائه نمود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که گونه‌های دارویی تراریخته غالباً تولید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را افزایش می‌دهند و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی در آنها بالاتر از ریشه غیرتراریخته است. El-Esawi *et al.* (2017) افزایش ۳۱-۵۰٪ فعالیت آنتی اکسیدانی در ریشه‌های موئین را گزارش کردند (El-Esawi *et al.*, 2017). برگ‌ها معمولاً محل تجمع بالاتری از پلی فنول‌ها، فلاونوئیدها و سایر آنتی اکسیدان‌ها هستند و محتوای فنولی و فلاونوئیدی برگ ارتباط مثبت و قوی با مهار DPPH دارد (Choi *et al.*, 2023). بنابراین نتایج این تحقیق که برگ‌ها بیشترین مهار را نشان داده‌اند، با پیشینه پژوهشی موجود سازگار است. توانایی القا و کیفیت ریشه موئین و الگوی متابولیتی به شدت وابسته به سویه *A. rhizogenes* است. برخی سویه‌ها در برخی میزبان‌ها رشد و تولید متابولیت بهتری نشان داده‌اند، همان‌طور که در نتایج این مطالعه نیز تفاوت سویه‌ها مشخص است. این امر احتمالاً به تفاوت در مجموعه ژن‌های *rol/aux* موجود در ژنوم باکتری و نیز تفاوت در تعامل مولکولی با میزبان مرتبط است. نتایج

گردد. علاوه بر ژنوتیپ گیاهی عوامل دیگری از جمله سن، نوع و وضعیت فیزیولوژی ریزنمونه می‌توانند در تعیین سازگاری ژنوتیپ و سویه باکتری حائز اهمیت باشند. این مطالعه نشان داد که رشد و عملکرد ریشه‌های موئین متأثر از ریزنمونه و سویه باکتری است و در مطالعات آینده کشت ریشه‌های موئین سنبل الطیب می‌تواند یک جایگزین مناسب برای تولید سریع متابولیت‌های دارویی در آن تحت شرایط درون شیشه‌ای محسوب گردد.

زیست‌توده را تولید کرد، که ممکن است به تفاوت در مسیرهای رشد و تنظیم هورمونی مرتبط باشد. به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که انتخاب بهینه‌ی سویه و اندام برای تراریختی از عوامل کلیدی موفقیت در القای ریشه‌های موئین محسوب می‌شود. ماهیت برهمکنش میان آگروباکتریوم و سلول‌های گیاهی هنوز به طور کامل درک نشده، بنابراین به منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه مجموعه‌ای از سویه‌های باکتری بر روی ژنوتیپ‌های گیاهی باید آزمون

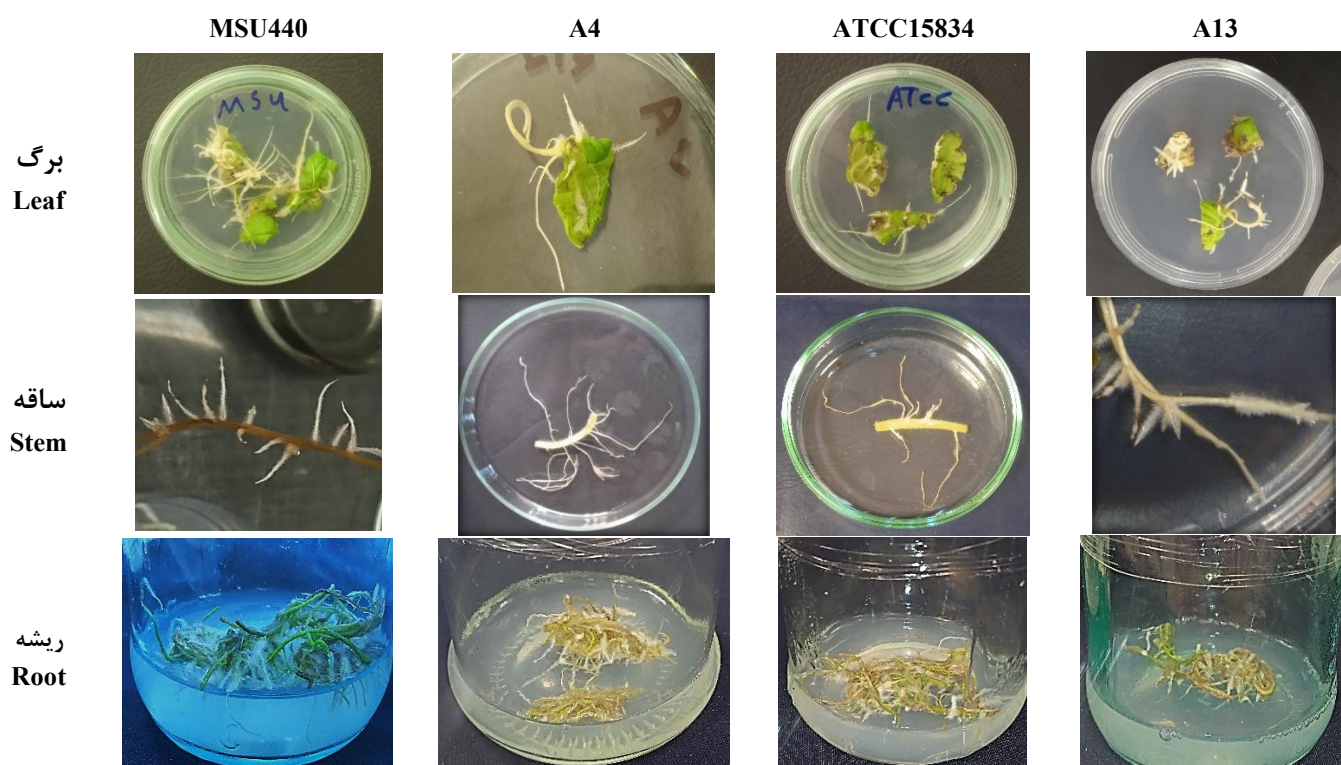


سویه آگروباکتریوم

A. rhizogenes strain

شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه و نوع سویه آگروباکتریوم بر میزان آنتی اکسیدان کل در ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب

Figure 6- Comparison of the average effect of explant type and Agrobacterium strain type on the amount of total antioxidants in the hairy roots of valerian



شکل ۷- ریز نمونه‌های تلقیح یافته با سویه‌های باکتری و ظهور ریشه‌های موئین

Figure 7- Micro-samples inoculated with bacterial strains and the appearance of hairy roots

منابع

- Bandyopadhyay, M., Jha, S., & Tepfer, D. (2007).** Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. *Plant Cell Reports*, 26 (5), 599–609. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0260-0>
- Banihashemi, O., Khavari-Nejad, R. A., Yassa, N., & Najafi, F. (2015).** Induction of hairy root in *Atropa komarovii* using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 5 (4), 22–31.
- Bhat, B., & Sharma, V. D. (2015).** *In vitro* propagation of the Garden Heliotrope, *Valeriana officinalis* L.: Influence of pre chilling and light on seed germination. *Plant Biology*, 17 (2), 211–216. <https://doi.org/10.1111/plb.12236>
- Choi, M., Yoon, J., Yang, S. H., Kim, J. K., & Park, S. U. (2023).** Production of phenolic compounds and antioxidant activity in hairy root cultures of *Salvia plebeia*. *Plants*, 12 (22), 3840. <https://doi.org/10.3390/plants12223840>
- Dasari, R., Gopu, C., Vankudoth, S., Dharavath, S., & Taduri, S. (2020).** Enhancement of production of pharmaceutically important anti-cancerous compound; cucurbitacin E via elicitation and precursor feeding of *in vitro* culture of *Citrullus colocynthis* (L.) Schard. *Vegetos*, 33 (2), 323–334. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00110-z>
- 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.
- Desmet, S., Dhooghe, E., De Keyser, E., Van Huylenbroeck, J., Müller, R., Geelen, D., & Lütken, H. (2020).** Rhizogenic agrobacteria as an innovative tool for plant breeding: Current achievements and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (6), 2435–2451. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10350-3>
- Dhakulkar, S., Ganapathi, T. R., Bhargava, S., & Bapat, V. A. (2005).** Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science*, 169 (5), 812–818. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.014>
- El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witczak, J., & Ahmad, M. (2017).** Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, Article 2494721. <https://doi.org/10.1155/2017/2494721>
- Farhadi, N., & Moghaddam, M. (2024).** Application of Recent Advanced Technologies for the Improvement of Medicinal and Aromatic Plants. In A.K. Hvostlef-Eide & W. Preil (Eds.), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 539–546). Springer.
- Fitzgerald, J. A., Könnemann, S., Krümpelmann, L., Županič, A., & Vom Berg, C. (2020).** Approaches to test the neurotoxicity of environmental contaminants in the zebrafish model: From behavior to molecular mechanisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40 (4), 989–1006. <https://doi.org/10.1002/etc.4959>
- Folgado, A., Serra, A. T., Prazeres, I., Bento-Silva, A., Bronze, M. R., & Abranches, R. (2021).** Hairy root cultures of *Cynara cardunculus* L. as a valuable source of hydroxycinnamic acid compounds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146 (2), 245–256. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02063-w>
- Ghadermazi, S., Masoud Tohidfar, M. and Miri, S.M. (2016).** The Production of Hairy Roots from (*Datura innoxia* L.) by *Agrobacterium rhizogenes* and Effects of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Biological Elicitors on Atropine and Scopalamine Content. *Journal of Medicinal Plants*, 16(10): 141-156. (In Persian)
- Ganjali, A., Zare Hassanabadi, M., Elhoti, M., and Moshtaghi, N. (2019).** Evaluation of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* in inducing hairy roots and producing secondary metabolites in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Horticultural Sciences* 34 (2), 273–284.
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007).** Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (6), 1175–1185. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5>
- Jadid, N., Ramadani, M. R. N., Widodo, A. F., Sa'adah, N. N., Ermavitalini, D., Rahmawati, M., Sari, S. A., Soleha, I. D., & Mas'ud, F. (2024b).** *In silico* characterization of GbPAL, GbCHS, GbDFR and GbANS structural genes involved in the biosynthesis of flavonoids in *Gynura bicolor* DC. *South African Journal of Botany*, 165, 428–442. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.01.011>
- Jadid, N., Soleha, I. D., Rahayu, A. E., Puspaningtyas, I., Sari, S. A., Rahmawati, M., & Hidayati, D. (2024).** Exogenous methyl jasmonate (MeJA) altered phytochemical composition and enhanced the expression of PataACT gene of *in vitro* culture-derived patchouli var. Sidikalang (*Pogostemon cablin* Benth.). *Journal of King Saud University - Science*, 103301. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103301>
- Kaur, G., Prakash, P., Srivastava, R., & Verma, P. C. (2021).** Enhanced secondary metabolite production in hairy root cultures through biotic and abiotic elicitors. In T. S. (Ed.), *Plant Cell Tissue Differentiation and Secondary Metabolites: Fundamentals and Applications* (pp. 625–660). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9_25
- Kumar, V., Murthy, K. N. C., Bhamid, S., Sudha, C. G., & Ravishankar, G. A. (2005).** Genetically modified hairy roots of *Withania somnifera* Dunal: A potent source of rejuvenating principles. *Rejuvenation Research*, 8 (1), 37–45. <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.37>
- Lee S.U., Kimi S.U., Song W.S., Kim Y.K., Park N.I., and Park S.U. (2010).** Influence of different strains of 282 *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in Rubiaakane Nakai. *Romanian Biotechnological Letters* 15(4): 5405-5409.
- Marchev, A. S., Yordanova, Z. P., & Georgiev, M. I. (2024).** Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Arabian Journal of Chemistry*, 17 (9), 105904. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105904>

- Mirazayi Delbari, E., Vatandoust, J., Jami Moeini, M., & Kuhban Bagheirkhira, E. (2022). The effect of *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction in different explants of alfalfa. *The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology*, 35 (3), 127–142.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Phuong, T. D., Le Thi Mong, V., & Phuong, Q. N. D. (2021). Antioxidant, anti-bacterial activity of *Perilla frutescens* ethanol extract and induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*. *VNUHCM Journal of Natural Sciences*, 5 (1), 975–983. <https://doi.org/10.32508/stdjns.v5i1.917>
- Pirian, K., Piri, K. H., & Ghiyasvand, T. (2012). Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3 (3), 642–649.
- Saha, K., Lajis, N. H., Israf, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S., & Syahida, A. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3), 263-267
- Sathasivam, R., Choi, M., Radhakrishnan, R., Kwon, H., Yoon, J., Yang, S. H., Kim, J. K., Chung, Y. S., & Park, S. U. (2022). Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 983776. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.983776>
- Sezen Karaoglan, E. (2022). *Valeriana officinalis* L. In *Novel Drug Targets With Traditional Herbal Medicines: Scientific and Clinical Evidence* (pp. 565–568). Springer.
- Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, K. H., & Hasanloo, T. (2012). Hairy root induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 11 (44), 73–83. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.2717204.2012.11.44.17.9>
- Srivastava, S., Conlan, X. A., Adholeya, A., & Cahill, D. M. (2016). Elite hairy roots of *Ocimum basilicum* as a new source of rosmarinic acid and antioxidants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125 (1), 107–119. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0933-x>
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2016). Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172 (5), 2286–2297. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0664-6>
- Su, Y., Lin, C., Zhang, J., Hu, B., Wang, J., Li, J., Wang, S., Liu, R., Li, X., Song, Z., & Wang, J. (2022). One-step regeneration of hairy roots to induce high tanshinone plants in *Salvia miltiorrhiza*. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.913985>
- Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Čalić, D., Flamini, G., & Kumari, B. R. (2013). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis. *Industrial Crops and Products*, 44, 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.007>
- Tavassoli, P., & Afshar, A. S. (2018). Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *3 Biotech*, 8 (8), 351. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1375-z>
- Tiwari, R. K., Trivedi, M., Guang, Z. C., Guo, G. Q., & Zheng, G. C. (2007). Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: Growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 26 (2), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0236-0>
- Vanek, T., Langhansova, L., & Marsik, P. (2005). Cultivation of root cultures of *Panax ginseng* in different bioreactors and in temporary immersion Comparison of growth and saponin production. In A.K. Hvoslef-Eide & W. Preil (Eds.), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 539-546). Springer.
- Vyas, P., & Mukhopadhyay, K. (2014). Development of a rapid and high frequency *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation protocol for *Ocimum tenuiflorum*. *Biologia*, 69 (6), 765–770. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0375-7>
- Zare Hasan Abadi, M., Ganjeali, M., Lahouti, M., & Moshtaghi, N. (2020). Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction and secondary metabolites production in *Ocimum basilicum* L. *Journal of Horticultural Science*, 34 (2), 273–284. <https://doi.org/10.22067/jhorts4.v34i2.82167>
- Zehra M., Banerjee S., Sharma S., and Kumar S. (1999). Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on biomass and alkaloid productivity in hairy root lines of *Hyoscyamus muticus* and *H. albus*. *Planta Medica* 64: 60–63.
- Zhao, S., & Tang, H. (2020). Enhanced production of valtrate in hairy root cultures of *Valeriana jatamansi* Jones by methyl jasmonate, jasmonic acid and salicylic acid elicitors. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48 (2), 839–848. <https://doi.org/10.15835/nbha48211872>