Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 41, No. 1, Page 96-111 (2025)

DOI:10.22092/ijmapr.2025.352320.2886

Determination of different growth media and *Agrobacterium rhizogenes* strains on the hairy root growth of Valerian (Valeriana officinalis L.)

Mehdi Heydari-Rahni[1], Yousef Filizadeh[2*] and Mohammad Nasri[1]

1- Department of Agronomy, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2*- Corresponding author, Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural College, Shahed University, Tehran, Iran, E-mail: y.filizadeh@scu.ac.ir

Received: Octobrt 2020 Revised: July 2024 Accepted: September 2024

Abstract

Background and Objectives: Valeriana, a genus in the Caprifoliaceae family, includes several species, notably *Valeriana officinalis* L. (valerian). Valerian root extract contains various bioactive compounds, including valerenic acid, valeranone, valepotriates, and gamma-aminobutyric acid, which have been widely used as sedatives to treat sleep disorders such as insomnia. This study aimed to evaluate the induction of valerian hairy roots using three different strains of Agrobacterium rhizogenes (A13, R1601, and LBA9402) under four different growth media compositions: (1) MS full strength, (2) MS supplemented with KH_2PO_4, NH_4NO_3, and KNO3, (3) MS supplemented with KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, and $CaCl_2$, and (4) a medium containing MgSO4, microelements, Na2EDTA, FeSO4, and vitamins.

Methodology: This study was a factorial experiment based on a completely randomized design with eight replications under laboratory conditions. Seeds of *V. officinalis* were obtained from a commercial supplier (Pakan Seed Company, Isfahan, Iran) and germinated under greenhouse conditions. Before sowing, seeds were washed with tap water and distilled water. Seeds that settled at the bottom of the washing vessel were selected as they were expected to be the most viable. They were soaked overnight in water before being washed with a 10% detergent solution for 10 minutes, followed by surface disinfection with 70% ethanol for 30 seconds and 6% NaOCl for 5 minutes. After rinsing four times with sterile water, the seeds were germinated on solid Schulz medium, without growth regulators, at 25°C under a 16-hour light/8-hour dark photoperiod (45 µE m^{-2} S^{-1}). Hairy root induction was performed using spray and leaf disc methods, and transformation was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) analysis for the presence of rolB and virD genes. Hairy root induction rate, lateral branches per centimeter, number of hairy roots per explant, and dry weight of hairy roots were measured after 60 days. Essential oil was extracted by hydro-distillation and analyzed using gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS).

Results: The study confirmed that the tested A. rhizogenes strains could induce hairy roots in valerian. The fastest hairy root emergence was observed in explants inoculated with strain A13, occurring within 10 days. The highest induction rate (92%), hairy root dry weight (272 mg), and number of hairy roots per explant (19.2) were obtained in leaf explants inoculated with the A13 strain and cultured in MS medium supplemented with KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, and $CaCl_2$. No significant differences were observed in the morphological traits of hairy roots induced by different A. rhizogenes strains.

Conclusion: The findings indicate that growth media composition, appropriate A. rhizogenes

Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

strain, and optimized growth conditions enhanced hairy root biomass production. The A13 strain was the most effective in promoting mass hairy root production, particularly in MS medium supplemented with KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, and $CaCl_2$. Given the complex physiological processes involved, valerian hairy root cultures can preserve valeric acid found in vegetative tissues. Future research should focus on identifying the optimal growth media conditions that maximize vegetative growth and secondary metabolite production in valerian.

Keywords: *Valeriana officinalis*, *Agrobacterium rhizogense*, culture media, hairy root dry weight

تأثیر نوع محیط کشت پایه و سویه‌های مختلف باکتریایی بر رشد ریشه‌های موئین گیاه دارویی سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.)

مهدی حیدری رهنی[۱]، یوسف فیلی‌زاده*[۲] و محمد نصری[۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری زراعت، دانشکده تحصیلات تکمیلی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد، تهران، ایران، پست‌الکترونیک: y.filizadeh@scu.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زراعت و آگرواکولوژی، دانشکده تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۹ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: ریشه گیاه دارویی سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) به دلیل داشتن ترکیبات والپوتریات، والرنون و اسید والرنیک، به عنوان مسکن قوی، تسکین‌دهنده اعصاب، آرام‌بخش، ضد اضطراب و بی‌خوابی استفاده می‌شود. کشت ریشه‌های موئین گیاهان چندساله به دلیل کوتاه کردن زمان تشکیل متابولیت‌های ثانویه همراه با حفظ خصوصیات زیستی و نژادی، روشی کارآمد در تولید ترکیبات مؤثر گیاهی محسوب می‌شود. بر همین اساس، بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های موئین گیاه دارویی سنبل‌الطیب با استفاده از ۳ سویه مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (A13، R1601، LBA9402)، روش‌های مختلف تلقیح و چهار نوع محیط کشت (MS Full Strength; MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3; MS- KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$; $MgSO_4$, microelements, Na2EDTA, $FeSO_4$ and Vitamins) در آزمایشی بررسی شد.

مواد و روش: این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصافی با ۸ تکرار در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. بذر سنبل‌الطیب بعد از کشت در ظروف آزمایشگاهی محتوی محیط کشت پایه MS، برای جوانه‌زنی به اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۲۰ درصد و ۴۵ میکرومول متر مربع در ثانیه در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردید. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای به‌منظور تلقیح با باکتری از گیاهچه‌های استریل ۴ هفته‌ای تهیه شدند. القای ریشه‌های موئین از سویه‌های آگروباکتریوم به دو روش اسپری و دیسک برگی و تأیید تراریختی و عدم آلودگی با واکنش PCR برای تکثیر اختصاصی ژن *rol*-B و *Vir*D انجام شد. ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و هیپوکوتیل بعد از ۱۰ روز شروع به ظاهر شدن کردند و تعداد انشعاب فرعی ریشه موئین در طول یک سانتی‌متر و تعداد ریشه‌های موئین ریزنمونه‌ها به صورت روزانه و وزن خشک آنها بعد از ۶۰ روز اندازه‌گیری گردید.

نتایج: نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های آزمایشی باکتری *A. rhizogenes* قادر به القای ریشه موئین در گیاه سنبل‌الطیب هستند. نتایج تجزیه واریانس آزمایش ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای نشان داد که سویه‌های مختلف، محیط کشت و انتخاب روش تلقیح تأثیر معنی‌داری بر تولید ریشه موئین ایجاد کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که ریزنمونه برگ در سویه باکتریایی A13 و محیط کشت MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$ بهترین ترکیب تحریک رشد ریشه موئین در گیاه دارویی سنبل‌الطیب بود. بیشترین درصد تراریختی ریزنمونه‌ها (۹۲ درصد)، وزن خشک ریشه‌های موئین (۲۷۲ میلی‌گرم) و تعداد ریشه‌های موئین ریزنمونه‌ها (۱۹/۲۰ عدد) نیز مربوط به همین ترکیب تیماری بود. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در خصوصیات ظاهری ریشه‌های موئین تولید شده بوسیله سویه‌های مختلف باکتریایی مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری کلی: این آزمایش نشان داد که تولید ریشه‌های موئین در گیاه دارویی سنبل‌الطیب به‌طور چشمگیری بستگی به انتخاب سویه مناسب باکتریایی، محیط کشت مطلوب و شرایط رشد بهینه دارد. از آنجایی که سیستم ریشه‌های موئین سنبل‌الطیب در فرایندهای پیچیده فیزیولوژیکی قادر به حفظ اسید والرنیک موجود در بافت‌های رویشی است، بنابراین، یافتن محیط رشدی منطبق با

بیشترین رشد رویشی و تولید مطلوب متابولیت‌های ثانویه در گیاه در تحقیقات آینده ضروریست. از سوی دیگر، بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید ریشه‌های مویین گیاه دارویی سنبل‌الطیب و بالا بردن متابولیت‌های دارویی با ارزش از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: سنبل‌الطیب، اگروباکتریوم رایزوژنز، محیط کشت، وزن خشک ریشه‌های مویین

مقدمه

گیاهان دارویی با پذیرش فرهنگی بیشتر، سازگاری بالاتر با بدن و عوارض کمتر، داروی اصلی ۸۰–۷۵ درصد از جمعیت جهان محسوب می‌شوند (Bauer & Brönstrup, 2014؛ Kwiatkowski, 2010؛ WHO, 2008). 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 به‌طور چشمگیری در حال افزایش است (Fitzgerald *et al.*, 2020). از سوی دیگر، ترکیبات شیمیایی گیاهان دارویی، محصول بخشی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاهان زنده هستند که سازگاری بالاتری با بدن انسان دارند (Sen *et al.*, 2009). مواد طبیعی مشتقات دارویی گیاهان به دلیل ارتقاء سلامتی و آرام‌بخشی، قابل رقابت با داروهای شیمیایی هستند که برگشت به درمان‌های طبیعی و رفع مشکلات سلامتی با آنها، نیاز حیاتی در شرایط کنونی است (Kamboj, 2000).

مواد مؤثره گیاهان دارویی شامل فنل‌ها، تانن‌ها، آلکالوییدها، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها و برخی دیگر از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند (Jugran *et al.*, 2015؛ Damnjanović *et al.*, 2010؛ Fernandez *et al.*, 2007). گیاه دارویی سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) به دلیل داشتن ترکیبات والپوتریات، والرنال و اسید والرنیک در ریشه آن، به عنوان مسکن قوی، تسکین‌دهنده اعصاب، آرام‌بخش، ضد اضطراب و بی‌خوابی استفاده می‌شود (Hobbs, 1989؛ Akhondzadeh & Daliri, 2004؛ Bent *et al.*, 2006). مهمترین ماده مؤثره سنبل‌الطیب اسید والرنیک بوده که از ریشه و ریزوم بدست می‌آید که همراه با اثرهای آرام‌بخشی و خواب‌آوری باعث آرامش طبیعی اعصاب می‌شود (Houghto, 1999؛ Filizadeh & Goodarzi, 2010؛ Rezaie *et al.*, 2010؛ Bhatt *et al.*, 2012؛ Penzkofer *et al.*, 2014).

از آنجایی که ساخت شیمیایی ترکیبات طبیعی و متابولیت‌های ثانویه برای بعضی گیاهان سخت، آهسته، غیراقتصادی و نیاز به زمان طولانی دارد، استفاده از فناوری کشت بافت گیاهی برای تولید سریع و انبوه این متابولیت‌ها ضروریست (Hu & Alferman, 1993؛ Namdeo, 2007). کشت ریشه‌های موئین فرایندی مؤثر در مسیر تولید ترکیبات ثانویه بدون جذب مواد مضر از طریق آب و خاک می‌باشد (Verpoorte *et al.*, 2002). تولید ترکیبات ثانویه در اندام‌های گیاهی با وجود موفقیت‌آمیز بودن در بسیاری موارد، بدلیل رشد محدود و بازده پایین باعث توجه به تحریک تراریختگی با موجود زنده دیگر مانند آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) گردید (Geier *et al.*, 1996). ریشه‌های موئین تولید شده از انتقال ژن باکتری، دارای رشد سریع با انشعاب و تراکم بالا بوده که قادر به ساختن ترکیبات ثانویه در دوره‌ای طولانی با پایداری ژنتیکی در رشد می‌باشند (Jenifer *et al.*, 2012). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که افزایش رشد و تراکم ریشه‌های موئین به عوامل مختلفی مانند ترکیب محیط کشت، قدرت تغییرپذیری میزبان و انتخاب نژاد مناسب آگروباکتریوم بستگی دارد (Akasaka *et al.*, 1998؛ Baron *et al.*, 2001؛ Chabaud *et al.*, 2003؛ Kim *et al.*, 2004).

پژوهش‌های مختلف در مهندسی ژنتیک، تولید ریشه‌های موئین با کمک فناوری استفاده از باکتری آگروباکتریوم

رایزوژنز را در چندین گیاه نشان دادند (Baron *et al*., 2001؛ Chabaud *et al*., 2003؛ Kim *et al*., 2004). Granicher و همکاران (۱۹۹۲)، Baron و همکاران (۲۰۰۱)، Chabaud و همکاران (۲۰۰۳)، Kim و همکاران (۲۰۰۴) و Filizadeh و Goodarzi (۲۰۱۰) در تحقیقات جداگانه‌ای تولید ریشه‌های موئین با فناوری استفاده از باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز و مهندسی ژنتیک را در گیاهان مختلف در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه بررسی کردند. تحقیقات دیگر در زمینه ریزازدیادی ناشی از کشت بافت تراریخته با باکتری نشان داد که سن ریزنمونه عامل مهمی در رشد ریشه‌های موئین و انباشت ترکیبات ثانویه در آنها محسوب می‌شود (Lee *et al*., 1998؛ Ohara *et al*., 2000؛ Barik, 2005).

Yoshimatsu و Shimomura (۱۹۹۲) و Park و Facchini (۲۰۰۰) در تحقیقات جداگانه‌ای موفقیت‌آمیز بودن تراریختی گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.) را با نژادهای مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز اعلام کردند. نتایج آنان نشان داد که نژادهای LBA9402 و 15834 باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز دارای بالاترین درصد القای تراریختگی (۵۵ درصد) بودند. نتایج تحقیقات Shirazi و همکاران (۲۰۱۲) روی گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) و Piran و همکاران (۲۰۱۲) در گیاه خرفه (*Portulaca Oleracea* L.) در مورد میزان تراریختگی بعد از تلقیح با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز نشان داد که انتخاب ریزنمونه، نوع باکتری و محیط کشت بر موفقیت درصد القاء تأثیر دارد. Solemani و همکاران (۲۰۱۲) در مورد تأثیر سن ریزنمونه در میزان تراریختگی گیاه درمنه (*Artemisia aucheri* Boiss.)، نشان دادند که ریزنمونه‌های جوان (۲ هفتگی) تأثیر بالاتری نسبت به ریزنمونه‌های بالغ‌تر ایجاد کردند. Rahnama و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهشی نشان دادند که روش تزریق باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز روی گیاه میزبان تأثیر بالاتری در میزان تراریختگی دارد. تحقیقات دیگر نشان داد که افزایش میزان مواد غذایی در محیط کشت با رشد و تراکم ریشه‌های موئین رابطه مستقیم و با ترکیبات ثانویه رابطه عکس دارد (Bensaddek *et al*., 2001؛ Gitz *et al*., 2004؛ Saravanakumar *et al*., 2012).

بررسی‌های مختلف نشان داده است که محیط‌های کشت باکتری با توجه به ترکیب مواد غذایی آنها، نقش چشمگیری در تولید ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی ایفا می کنند (Sharifi *et al*., 2014). همچنین ترکیب محیط‌های کشت براساس نسبت‌های مختلف عناصر غذایی نقش مؤثری بر رشد ریشه‌های موئین دارند. بر همین اساس، بهینه‌سازی این محیط‌ها قادر به افزایش رشد و بالا بردن مقدار متابولیت‌های ثانویه است. آلکالوییدهای تروپانی ساخته شده در ریشه گیاه دارویی شابیزک (*Atropa belladonna* L.) با افزایش غلظت آمونیوم در محیط کشت ریشه‌های موئین به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، اگرچه نیترات منجر به افزایش زیتوده و بیوسنتز آلکالویید گردید (Kamada *et al*., 1986؛ Bensaddek *et al*., 2001). Saravankumar و همکاران (۲۰۱۲) در آزمایشی یافتند که بیشترین میزان رشد ریشه‌های موئین گیاه دارویی پنیرباد (*Withania somnifera* L.) در محیط کشت ½MS نسبت به سایر محیط‌های کشت بدست آمد.

در این تحقیق با هدف بهینه‌سازی تولید و رشد ریشه موئین، چهار محیط کشت شامل (MS Full Strength; MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3; MS- KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$; $MgSO_4$, microelements, Na2EDTA, $FeSO_4$ and Vitamins) همراه با سه سویه مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (A13، R1601، LBA9402) تحت تأثیر ریزنمونه‌های حاصل از برگ‌های لپه‌ای و هیپوکوتیل و روش‌های تلقیح پاششی و دیسک برگی بر رشد ریشه‌های موئین گیاه دارویی سنبل‌الطیب بررسی شد.

مواد و روش‌ها

ترکیب محیط کشت و طرح آماری

محیط کشت اصلی پایه در این تحقیق موراشیگ و

اسکوگ شامل عناصر ریز و درشت مغذی و ترکیبات آلی و ویتامین‌ها بود (Murashige & Skoog's, 1962). ترکیبات عناصر درشت مغذی شامل نیترات پتاسیم (KNO_3) به نسبت ۱۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر، نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) به نسبت ۱۶۵۰ میلی‌گرم در لیتر، کلرید کلسیم ($CaCl_2$, $2H_2O$) به نسبت ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر، مونوپتاسیم فسفات (KH_2PO_4) به نسبت ۱۷۰ میلی‌گرم در لیتر، سولفات آهن II ($FeSO_4$. $7H_2O$) به نسبت ۲۷/۸ میلی‌گرم در لیتر، سولفات منیزیوم ($MgSO_4.4H_2O$) به نسبت ۱/۴۸ میلی‌گرم در لیتر، NaFe-EDTA به نسبت ۵ میلی‌لیتر در لیتر و ویتامین میواینوزیتول ($C_6H_{12}O_6$) به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شدند. اسیدیته محیط کشت آزمایشی حدود ۶ با غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز برای همه محیط‌های کشت ثابت نگه داشته شد.

بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های موئین گیاه دارویی سنبل‌الطیب تحت تأثیر ریزنمونه‌های حاصل از برگ‌های لپه‌ای و هیپوکوتیل با ۳ سویه مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز در چهار محیط کشت و روش‌های مختلف تلقیح در آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصافی با ۸ تکرار بررسی گردید.

جوانه‌زنی بذر سنبل‌الطیب

بذر گیاه دارویی سنبل‌الطیب از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. برای شکستن خواب و تسریع در جوانه‌زنی، بذرها در ۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس بذرها در ظروف آزمایشگاهی با غلظت‌های مختلف جیبرلین (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و اسید سولفوریک (۱۰ درصد) براساس دستورالعمل (Wiśniewski *et al*., 2016) آغشته گردیدند. فرایند ضدعفونی بذرهای آزمایشی در چهار مرحله با شستن در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، شستن در آب مقطر، قرار دادن در هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و در نهایت شستن در آب مقطر در زیر هود لامینار در آزمایشگاه (دانشگاه آزاد واحد ورامین کشاورزی) انجام شد. تعداد ۵۰ بذر آزمایشی بعد از کشت در ظروف آزمایشگاهی محتوی محیط کشت پایه MS (۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار) برای جوانه‌زنی به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۲۰ درصد و ۴۵ میکرومول متر مربع در ثانیه در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردید. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای به‌منظور تلقیح با باکتری از گیاهچه‌های استریل ۴ هفته‌ای تهیه شدند.

آماده‌سازی باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز برای تلقیح

سویه‌های باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (A13، R1601، LBA9402) از آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه آزاد اسلامی تهیه گردید. هر سویه باکتری در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB مایع و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی به مدت ۴۸ ساعت کشت و رشد داده شد. با توجه به مقاوم بودن سویه باکتری رایزوژنز به آنتی‌بیوتیک ریفامپسین و برای جلوگیری از رشد سایر باکتری‌ها، مقدار۵۰ میلی‌گرم در لیتر از این آنتی‌بیوتیک به محیط کشت اضافه شد. پس از رسیدن OD_{600} باکتری به ۰/۶-۰/۴، عملیات جداسازی کشت باکتری در ۴ درجه سانتی‌گراد با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از تشکیل رسوب باکتری، محیط LB مایع حذف و به رسوب باکتری ۷ میلی‌لیتر محیط تلقیح آگروباکتریوم اضافه گردید (Zhou *et al*., 2011). این محلول به مدت ۲ ساعت در دستگاه شیکر انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و شرایط تاریکی نگهداری شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای گیاهچه‌های ۱۲-۱۰ روزه در روش دیسک برگی در اندازه‌های ۱-۰/۵ سانتی‌متر تهیه گردیدند. نمونه‌ها به‌طور تصادفی با تیغ اسکالپل زخمی و به‌مدت ۱۸ دقیقه در سوسپانسیون سویه‌های باکتریایی A13، R1601 و LBA9402 شناور

شدند. سپس در شیکر انکوباتور با ۸۰ دور در دقیقه در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شدند. عملیات تلقیح در تاریکی، در محیط کشت MS و ½MS در روش پاشش (اسپری) با محلول سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز بوسیله سرنگ استریل روی انجام شد و ریزنمونه‌ها برای خشک شدن به کاغذ صافی منتقل گردیدند. ظروف آزمایشگاهی محتوی ریزنمونه‌ها در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. برای حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS مایع حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxime) منتقل و در شیکر انکوباتور با ۸۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شدند. سپس ریزنمونه‌های شستشو شده، در شرایط استریل در محیط کشت ۱۰ حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم کشت شدند. عمل واکشت تا حذف کامل باکتری در چند مرحله انجام شد. ریزنمونه‌ها در فواصل ۱۲-۱۰ روز یکبار کشت گردیدند و ظهور ریشه‌های موئین در جایگاه‌های زخم از روز نهم ثبت گردید. برای انجام تجزیه‌های مقایسه‌ای، از کشت ریزنمونه‌های بدون تلقیح به عنوان شاهد استفاده شد.

آنالیز مولکولی ریشه‌های موئین با استفاه از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):

تشکیل ریشه‌های موئین با انتقال ژن‌های T-DNA پلاسمید Ri باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز به سلول‌های ریزنمونه گیاه سنبل‌الطیب انجام شد. تراریختی ریشه‌های موئین با ردیابی ژن‌های موجود روی T-DNA این باکتری انجام شد (Królicka *et al*., 2001). به همین منظور، اثبات تراریختی ریشه‌های موئین و عدم آلودگی آنها با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C و virD انجام گردید. توالی‌های آغازگر اختصاصی ژن *vir*B و *vir*D به‌ترتیب زیر استفاده شدند.

5'-GTTCTCGCGAGAAGATGCA -3′
5'-CAGTTTCGCATCTTGACAG-3'
5'- ATGCCCGATCGAGCTCAAGT -3'
5'-CCTGACCCAAACATCTCGGCT-3'

پلاسمید القاکننده ریشه‌های موئین (Ri) باکتری آگروباکتریوم سویه A13 به‌عنوان کنترل مثبت در این تحقیق استفاده گردید. شرایط دمای PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه DNA به‌مدت ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته‌سازی DNA الگو به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک‌رشته‌ای به‌مدت ۸۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و گسترش آغازگر توسط آنزیم Taq polymerase ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای بررسی تولیدات تکثیر شده، از الکتروفورز افقی (Bio-Rad) با ژل آگارز ۱ درصد حاوی gel read (برای رنگ‌آمیزی) به‌مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت استفاده گردید. سپس از ژل بدست آمده با استفاده از نور UV و دستگاه ژل داکیومنت عکس‌برداری شد (Dini Torkamani *et al*., 2014).

بررسی اثر محیط‌های کشت مختلف بر میزان رشد ریشه‌های موئین

پس از ظهور اولین ریشه از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای گیاه سنبل‌الطیب، ۰/۱۵ گرم ریشه موئین در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر دارای ۵۰ میلی‌لیتر از ۴ محیط کشت آزمایشی (MS Full Strength; MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3; MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$; $MgSO_4$, microelements, Na2EDTA, $FeSO_4$ and Vitamins) روی دستگاه لرزانک اتاقک رشد با دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند. وزن تر و خشک ریشه‌ها، با ترازوی دیجیتال توزین گردید.

تجزیه آماری

فاکتورهای آزمایشی شامل ۲ نوع ریزنمونه (هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای)، سویه باکتریایی در ۳ سطح (A13، R1601 و LBA9402)، محیط کشت با ۴ سطح (MS Full

Strength; MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3; MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$; $MgSO_4$, microelements, Na2EDTA, $FeSO_4$ and Vitamins) و روش تلقیح در ۲ سطح (دیسک برگی و غبارپاشی) بود. ثبت داده‌های مربوط به درصد تحریک ریشه‌های موئین، تعداد انشعابات فرعی ریشه موئین در طول یک سانتی‌متر و تعداد ریشه‌های موئین ریزنمونه‌ها به‌صورت روزانه انجام شد. میانگین داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار سیستم تجزیه آماری (SAS, 2002) مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. میانگین صفات اندازه‌گیری شده به حداقل اختلاف معنی‌دار (L.S.D) در سطح ۵ درصد مقایسه گردید.

نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های آزمایشی باکتری *A. rhizogenes* قادر به القای ریشه موئین در گیاه سنبل‌الطیب هستند. نتایج تجزیه واریانس آزمایش ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ‌های لپه‌ای نشان داد که سویه‌های مختلف، محیط کشت و انتخاب روش تلقیح تأثیر معنی‌داری بر تولید ریشه موئین داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر برخی تیمارها بر تولید درون‌شیشه‌ای ریشه موئین از گیاه دارویی سنبل‌الطیب

Tabel 1. ANOVA of some treatments effects on *in vitro* hairy root production from *Valeriana officinalis*

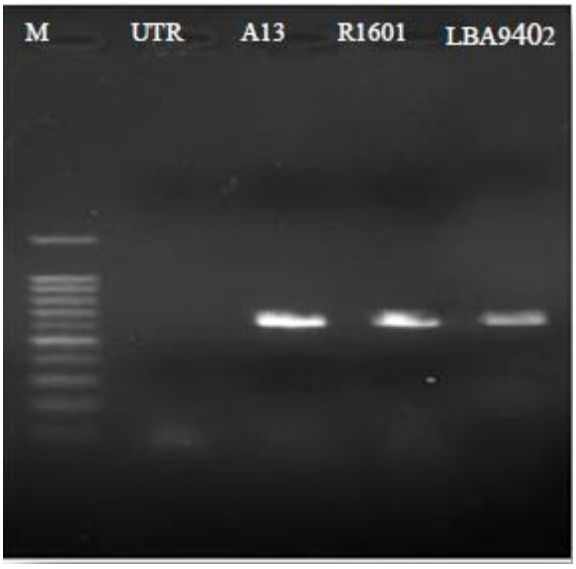
S.O.V.	d.f.	M.S.				
		Hairy root dry weight	Hairy root induction percentage from cotyledon explant	Hairy root induction percentage from hypocotyl explant	Number of lateral branches	Number of hairy roots
Replication	7	258.07^{ns}	0.0420^{ns}	0.068^{ns}	0.008^{ns}	1679.5^{ns}
Culture medium (CM)	3	232.27**	3.0515**	798**	4.50*	2.42**
Bacterial strain (S)	2	465.74**	13.280**	1322**	9.6**	1.89**
S×CM	6	1688.7**	17.305**	1604**	12.44**	1.99**
Induction method (IM)	1	121.88**	6.2160**	319**	3.45**	1.09**
CM×IM	3	66.32**	1608.7**	2345**	1907**	3089**
S×IM	2	341.53**	1009.9**	845**	1408**	3356**
S×CM×IM	6	2567.9**	3122.6**	1008**	2311**	1987**
Explant (E)	1	190.86**	20.060**	390.46**	173.51**	417.28**
E×CM	3	49.430**	68.530**	37.281*	44.670**	102.35**
E×S	3	32.850**	87.350**	34.128*	52.770**	100.35**
E×IM	1	32.805**	103.12**	37.91*	88.23**	78.25**
E×CM×S×IM	6	41.940**	68.530**	40.920*	57.607**	78.530**
Experimental error	336	74.55	0.00618	3.7536	0.007	142
C.V. (%)		55.90	0.02	17.90	5.90	16.20

n.s., *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

اثبات توانایی سویه‌ها در ریشه‌زایی آزمایشی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *rol*B و *vir*D در سویه‌های باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز به ترتیب منجر به تکثیر قطعه‌ای

به‌طول تقریبی bp780 و bp338 گردید. شکل‌گیری باندهای روشن از ژن *rolB* در ژنوم ریشه‌های موئین حکایت از تراریخته شدن ریزنمونه‌های گیاهی با سویه‌های باکتریایی دارد. فقدان حضور ژن *vir*D در ریشه‌های موئین (UTR) نشان از عدم وجود تلقیح باکتریایی ریشه‌های موئین دارد (شکل ۱).



شکل ۱- **PCR** با استفاده از پرایمرهای ژن‌های ***rolB*** برای تأیید تلقیح ریشه‌های موئین سنبل‌الطیب با سویه باکتریایی

Figure 1. PCR by *rolB* genes primers to confirm *Valeriana officinalis* hairy roots inoculation with bacterial strains

تأثیر نوع محیط کشت بر وزن خشک ریشه‌های موئین

نتایج این تحقیق نشان داد که محیط کشت تأثیر معنی‌داری ($P<0.01$) بر مقدار وزن خشک ریشه‌های موئین دارد (جدول ۱). بیشترین (۲۷۲ میلی‌گرم) وزن خشک ریشه‌های موئین گیاه دارویی سنبل‌الطیب در محیط کشت MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$، در روش تلقیح دیسک برگی و ریزنمونه برگ لپه‌ای مشاهده گردید. در مقابل، کمترین (۱۰۵ میلی‌گرم) در محیط کشت MS Full Strength، تلقیح پاشش و ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$ و KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3 مشاهده نگردید (جدول ۲).

درصد تحریک ریشه موئین در ریزنمونه‌ها

بیشترین و کمترین میزان تحریک ایجاد ریشه موئین در گیاه سنبل‌الطیب به ترتیب در سویه A13 و محیط کشت MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$ (۹۲ درصد) و سویه LBA9402 و محیط کشت MS Full Strength (۳۹ درصد) اندازه‌گیری شد (شکل ۲). همچنین بیشترین میانگین درصد تلقیح حاصل از روش دیسک برگی و پاشش مربوط به ریزنمونه‌های برگ‌های لپه‌ای (۸۰ درصد) و کمترین درصد تلقیح مربوط به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۳۹ درصد) بود (جدول ۲). نتایج این تحقیق نشان داد که انتقال T-DNA در روش دیسک برگی بعد از تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری *A. rhizogenes* به‌طور معنی‌داری بیش از روش پاشش بود.

تعداد انشعاب فرعی ریشه موئین در طول یک سانتی‌متر از ریزنمونه برگ لپه‌ای

نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین (۷/۵ عدد) تعداد

انشعابات فرعی در سویه A13، محیط کشت $MS\text{-}KH_2PO_4$, $NH_4NO_3KNO_3$, $CaCl_2$، روش تلقیح دیسک برگی و ریزنمونه برگ لپه‌ای اندازه‌گیری گردید. در مقابل، کمترین (۲/۱۰ عدد) انشعاب فرعی در سویه LBA9402، محیط کشت MS Full Strength، روش تلقیح پاشش و ریزنمونه هیپوکوتیل بدست آمد (جدول ۲).

تعداد ریشه موئین در ریزنمونه

نتایج این تحقیق نشان داد که بالاترین (۱۹/۲۰) تعداد ریشه موئین در سویه A13، محیط کشت $MS\text{-}KH_2PO_4$, NH_4NO_3 KNO_3, $CaCl_2$، روش تلقیح دیسک برگی و ریزنمونه برگ لپه‌ای اندازه‌گیری گردید. همچنین، کمترین (۱۰/۱۵ عدد) ریشه فرعی در سویه LBA9402، محیط کشت MS Full Strength، روش تلقیح پاشش و ریزنمونه هیپوکوتیل اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر برخی تیمارها بر تولید درون‌شیشه‌ای ریشه موئین از گیاه دارویی سنبل‌الطیب

Table 2. Means comparison of some treatments effects on *in vitro* hairy root production from *Valeriana officinalis*

E	IM	BS	CM	Hairy root dry weight ($mg.l^{-1}$)	Hairy root induction from cotyledon explant (%)	Hairy root induction from hypocotyl explant (%)	Number of lateral branches	Number of hairy roots
C	S	*A13*	1	185± 5.7^{a}	66± 4.2^{ae}	56± 5.3^{a}	3.75± 0.20^{a}	12.25± 1.8ad
			2	230± 5.3^{b}	75± 4.6^{b}	73± 6.1^{b}	5.45± 0.27^{b}	14.15± 2.1^{bd}
			3	260± 6.1^{c}	91± 3.9^{c}	87± 4.9^{c}	6.50± 0.42^{c}	18.25± 2.7^{c}
			4	210± 4.9^{d}	67± 4.8^{ae}	60± 4.7^{d}	4.15± 0.24^{d}	13.15± 1.8^{d}
		R1601	1	155± 4.7^{e}	57± 3.5^{dg}	46± 3.7^{e}	3.25± 0.19^{a}	11.10± 1.5^{ar}
			2	215± 5.2^{d}	63± 2.9^{a}	52± 4.5^{f}	4.30± 0.25^{cd}	12.85±1.9 ^{e}
			3	228± 5.1^{b}	78± 4.1^{bn}	68± 5.7^{g}	5.15± 0.42^{b}	14.55± 2.9 ^{b}
			4	180± 5.8^{a}	69± 3.7^{e}	55± 4.2^{a}	3.25± 0.30^{a}	13.17±1.9^{d}
		LBA9402	1	114± 3.9^{f}	49± 5.1^{f}	41± 7.1^{i}	2.50± 0.18^{e}	10.15± 1.2^{f}
			2	177± 4.7^{a}	58± 3.4^{d}	50± 6.3^{f}	3.75± 0.28^{a}	11.50± 1.4^{fg}
			3	205± 3.7^{di}	63± 1.9^{a}	54± 2.4^{a}	4.50± 0.35^{c}	13.10± 1.2^{d}
			4	188± 6.9^{ag}	54± 2.3^{g}	47± 4.9^{e}	3.25± 0.22^{a}	12.35± 1.8^{adg}
	LD	*A13*	1	194± 6.5^{g}	70± 3.7^{e}	63± 4.1^{d}	4.15± 0.38^{d}	13.15± 2.1^{d}
			2	241± 6.4^{n}	81± 3.9^{n}	69± 2.8^{g}	5.75± 0.42^{b}	14.45± 2.3^{b}
			3	272± 5.9^{i}	92± 4.1^{c}	80± 5.3^{n}	7.50± 0.52^{f}	19.20± 3.1^{c}
			4	225± 4.4^{b}	72± 3.6^{b}	66± 4.7^{g}	5.10± 0.38^{b}	14.75± 2.3^{b}
		R1601	1	172± 4.9^{a}	61± 2.4^{a}	54± 3.3^{a}	3.50± 0.26^{a}	12.15± 1.7^{ad}
			2	235± 4.6^{b}	69± 3.2^{e}	62± 4.1^{d}	4.70± 0.32^{c}	13.45± 2.1^{d}
			3	242± 5.7^{n}	83± 3.9^{n}	72± 3.6^{b}	5.35± 0.35^{b}	15.25± 2.8^{b}
			4	212± 7.2^{d}	72± 3.5^{b}	64± 4.5^{d}	3.75± 0.28^{a}	14.30± 2.3^{b}
		LBA9402	1	155± 5.5^{e}	53± 4.2^{g}	45± 3.9^{e}	2.75± 0.15^{e}	11.25±1.4^{ar}
			2	193± 6.8^{ag}	61± 3.6^{a}	50± 4.6^{f}	4.10± 0.25^{d}	12.82± 1.6^{e}
			3	215± 6.1^{d}	66± 2.2^{ae}	57± 3.4^{a}	5.15± 0.35^{b}	14.55± 2.2^{b}
			4	210± 6.4^{d}	57± 3.2^{dg}	49± 4.4^{e}	3.40± 0.25^{a}	13.70± 2.4^{d}
	S	*A13*	1	177± 4.8^{a}	61± 3.5^{a}	54± 5.3^{a}	3.15± 0.20^{a}	11.05± 1.5^{ar}
			2	219± 5.2^{d}	69± 4.2^{e}	60± 3.8^{d}	4.05± 0.33^{d}	12.85± 2.1^{e}
			3	248± 5.7^{n}	80± 3.7^{n}	73± 3.1^{b}	5.75± 0.42^{b}	15.75± 2.6^{b}
			4	200± 3.8^{i}	60± 5.2^{a}	54± 2.9^{a}	3.80± 0.28^{a}	11.70± 1.8^{fg}
		R1601	1	147± 3.5e	56± 2.1^{dg}	50± 3.2^{f}	3.10± 0.25^{a}	10.75± 1.2^{ar}
			2	205± 6.5^{di}	59± 2.7^{g}	55± 4.1^{a}	4.10± 0.35^{d}	11.10± 1.4^{ar}
			3	221± 5.3^{b}	70± 5.3^{e}	63± 3.7^{d}	4.55± 0.35^{c}	13.45± 2.2^{d}
			4	172± 6.1^{a}	62± 4.1^{a}	56± 3.4^{a}	2.95± 0.21^{ae}	12.30± 1.8^{adg}
		LBA9402	1	105± 5.8^{j}	43± 6.2^{i}	39± 5.7^{i}	2.10± 0.19^{f}	11.05± 1.1^{ar}
			2	158± 5.2^{e}	55± 3.9^{dg}	50± 3.3^{f}	3.35± 0.21^{a}	11.25± 1.3^{ar}
			3	198± 3.2^{g}	60± 1.8^{a}	53± 2.4^{a}	4.15± 0.32^{d}	12.85± 1.6^{e}

E	IM	BS	CM	Hairy root dry weight ($mg.l^{-1}$)	Hairy root induction from cotyledon explant (%)	Hairy root induction from hypocotyl explant (%)	Number of lateral branches	Number of hairy roots
H			4	168± 7.3^{e}	49± 2.1^{j}	44± 3.2^{e}	3.05± 0.27^{a}	11.50± 1.4^{fg}
	LD	*A13*	1	180± 5.8^{a}	66± 2.9^{ae}	61± 3.1^{d}	3.45± 0.33^{a}	12.90± 1.9^{e}
			2	228± 5.4^{b}	77± 4.4^{bn}	70± 3.5^{g}	4.55± 0.49^{c}	13.55± 2.2^{d}
			3	258± 5.5^{c}	85± 3.9^{k}	78± 4.1^{n}	6.10± 0.51^{g}	14.30± 2.4^{b}
			4	210± 3.9^{d}	66± 2.8^{ae}	57± 4.7^{a}	3.95± 0.27^{a}	12.95± 1.8^{e}
		R1601	1	164± 4.7^{e}	58± 3.1^{d}	54± 3.3^{a}	3.40± 0.41^{a}	10.85± 1.3^{ar}
			2	219± 5.2^{d}	60± 3.5^{a}	58± 2.7^{a}	4.45± 0.38^{c}	11.15± 1.5^{ar}
			3	228± 6.8^{b}	76± 2.7^{bn}	71± 3.1^{b}	4.90± 0.43^{b}	13.11± 1.9^{d}
			4	190± 6.1^{g}	68± 3.1^{e}	58± 2.9^{a}	3.15± 0.29^{a}	12.05± 1.6^{ad}
		LBA9402	1	147± 4.1^{e}	50± 3.8^{r}	41± 2.5^{i}	2.35± 0.19^{r}	10.80± 1.2^{ar}
			2	177± 5.9^{a}	56± 2.9^{ag}	49± 1.9^{r}	3.75± 0.40^{a}	11.25± 1.7^{ar}
			3	205± 7.2^{d}	59± 2.7^{g}	50± 3.1^{r}	4.55± 0.36^{c}	12.90± 1.8^{e}
			4	195± 5.8^{ag}	51± 3.1^{j}	44± 4.2^{e}	3.15± 0.31^{a}	11.65± 15^{rg}

E: explant (C: cotyledon and H: hypocotyl), IM: induction method (S: spray and LD: leaf disc), BS: bacterial strain, CM: culture medium (1: MS full strength, 2: MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, 3: MS-KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$, and 4: $MgSO_4$, microelements, Na_2EDTA, $FeSO_4$, and vitamins)
In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

بحث

تولید ریشه‌های مویین از طریق تلقیح گیاه با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز روشی کارآمد برای تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه گیاهیست (Namdeo, 2007). این روش به دلیل رشد سریع ریشه‌های مویین، تولید پیوسته متابولیت‌ها و امکان کشت در شرایط ساده‌تر نسبت به گیاه کامل، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (Ozyigit *et al*., 2013). در این فرایند، ترکیبات محیط کشت، نوع ریزنمونه گیاهی و سویه آگروباکتریوم به کار رفته از مهمترین عوامل در تعیین کارایی القای ریشه‌های مویین و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه هستند (Park & Facchini 2000).

نوع ریزنمونه گیاهی به‌طور قابل توجهی بر توانایی القای ریشه‌های مویین و ویژگی‌های آنها تأثیر می‌گذارد (Joubert *et al*., 2002). عوامل مختلفی مانند سن ریزنمونه، فیزیولوژی و ژنوتیپ گیاه بر پاسخ به تلقیح باکتری تأثیرگذار هستند و ریزنمونه‌های جوان و فعال‌تر معمولاً پاسخ بهتری به تلقیح نشان می‌دهند (Palazon *et al*., 1997؛ Prasad *et al*., 2020). همچنین، برخی از ریزنمونه‌ها به دلیل وجود ترکیبات فنلی و دیگر ترکیبات بازدارنده، ممکن است مقاومت بیشتری در برابر تلقیح از خود نشان دهند، اگرچه برهم‌کنش بین نوع ریزنمونه و سویه آگروباکتریوم بسیار پیچیده است (Rao & Ravishahnkar, 2002). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که میزان سازگاری سویه‌ها با ریزنمونه‌ها و تولید ریشه‌های مویین با ویژگی‌های مطلوب متفاوت می‌باشد (Tariverdizadeh *et al*., 2018). از سوی دیگر، شرایط و محیط کشت بر میزان و کیفیت ریشه‌های تولیدی تأثیرگذار است (Thwe *et al*., 2016). شناخت دقیق برهم‌کنش بین سویه‌های باکتریایی، نوع ریزنمونه، ترکیبات مغذی و تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌های کشت، نقشه راهی مناسب برای مهندسی متابولیک ریشه‌های موئین می‌باشد. با دستکاری این عوامل، شاید بتوان تولید متابولیت‌های ثانویه خاص را افزایش داد (Vamenani *et al*., 2020). این تحقیق و یافته‌های Khalili و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که تلقیح نامناسب و تولید ریشه‌های مویین کمتر در ریزنمونه هیپوکوتیل به دلیل قهوه‌ای شدن این اندام در محیط کشت و فقدان گره در آن بود.

نتایج این آزمایش و تحقیقات دیگر (Lee *et al*., 2010, 2012) نشان داد که نژاد سویه باکتریایی بر میزان رشد، تقسیم سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه ریشه‌های لقاح یافته تأثیر دارد. این تحقیق مانند یافته‌های (Granicher *et*

Ooi ؛Panda *et al*., 2017 ؛Giri *et al*., 2001 ؛*al*., 1992 *et al*., 2013) نشان داد، سویه A13 آگروباکتریوم رایزوژنز بسیار بیشتر از سویه‌های دیگر آزمایشی قادر به تحریک ریشه‌زایی، تولید انبوه ریشه‌های موئین و متابولیت‌های ثانویه گیاه سنبل‌الطیب و بعضی دیگر از گیاهان می‌باشد. گیاه سنبل‌الطیب بدون آغازگر ژن *rol*B به انتقال سویه باکتری آگروباکتریوم A13 حساس بوده و وجود این آغازگر برای تحریک ریشه‌زایی ضروریست. این تحقیق و یافته‌های دیگر (Lei *et al*., 2012) نشان داد بعد از القاء باکتریایی، تولید ریشه‌های موئین به شرایط عناصر غذایی محیط کشت بستگی دارد.

سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز حاوی پلاسمیدهای Ri با ژن‌های مختلفی هستند که بر توانایی القای ریشه‌های مویین و ویژگی‌های آنها تأثیر می‌گذارند. دو دسته مهم از این ژن‌ها، ژن‌های بیماری‌زایی (vir) و ژن‌های موجود در T-DNAهستند. تفاوت جزئی توالی این ژن‌ها می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر کارایی و موفقیت فرایند انتقال ژن و ایجاد ریشه مویین تأثیر بگذارد. ژن‌های *rol* بخشی از T-DNAپلاسمید Ri در آگروباکتریوم رایزوژنز هستند که نقش بسیار مهمی در القای رشد ریشه‌های مویین در گیاهان دارند. این ژن‌ها با تأثیر بر هورمون‌های گیاهی و تنظیم بیان ژن‌های دیگر، باعث تغییرات فیزیولوژیکی در سلول‌های گیاهی شده که منجر به رشد نامحدود و تشکیل ریشه‌های مویین می‌گردد. ژن‌های *rol*A، *rol*B و *rol*C با کد پروتئین‌های مشابه با ساختار و عملکرد هورمون اکسین در سلول‌های گیاهی، باعث فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی اکسین می‌شوند (Rao & Ravishahnkar, 2002). همچنین ژن‌های *rol* با افزایش حساسیت سلول‌های گیاهی به اکسین درونزا باعث افزایش رشد سلولی و تقسیم سلولی شده که در نهایت منجر به تشکیل ریشه‌های مویین می‌شود (Vamenani *et al*., 2020). ژن‌های *rol* با تأثیر بر عوامل رونویسی و تغییر بیان ژن‌های دیگر، بر رشد سلول، تقسیم سلولی و سنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارند. بنابراین، تعیین سویه مناسب آگروباکتریوم برای هر گیاه و ریزنمونه‌های مختلف، اهمیت زیادی دارد.

ریشه‌های مویینی که با استفاده از ژن‌های *rol* ایجاد می‌شوند، رشد سریع و پایداری دارند. این ریشه‌ها به دلیل رشد سریع و فعالیت متابولیکی بالا، مقدار زیادی متابولیت ثانویه تولید می‌کنند. همچنین ریشه‌های مویین حاصل از انتقال ژن‌های *rol*، از نظر ژنتیکی بسیار پایدار هستند. این ریشه‌ها برای مطالعه مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه و مهندسی متابولیک گیاهان بسیار مفید هستند. ریشه‌های مویین حاوی ژن‌های *rol* به عنوان یک سیستم مدل برای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس بزرگ استفاده می‌شوند (Giri *et al*., 2001؛ Mehrota *et al*., 2008؛ Hagel & Facchini, 2013؛ Ozyigit *et al*., 2013).

موفقیت انتقال T–DNA اگروباکتریوم به ژنوم گیاه میزبان و تراریختگی ریشه‌های موئین با وجود پیچیدگی‌های فراوان به عواملی مانند انتخاب سویه و تراکم سوسپانسیون باکتریایی، انتخاب مناسب ریزنمونه، محیط کشت و شرایط دوره رشد بستگی دارد (Park & Facchini 2000؛ Joubert *et al*., 2002؛ Prasad *et al*., 2020؛ Vamenani *et al*., 2020). از آنجایی که تشکیل ریشه‌های موئین با انتقال ژنهای *rol*A، *rol*B و *rol*C از پلاسمید باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز به گیاه میزبان انجام می‌شود، این تحقیق و یافته‌های دیگر (Giri *et al*., 2001؛ Mehrota *et al*., 2008؛ Hagel & Facchini, 2013؛ Ozyigit *et al*., 2013) نشان داد که پاسخ‌های متفاوت گیاه میزبان به انتقال محتویات ژنتیکی و انتخاب سویه باکتریایی مناسب نقش چشمگیری در تولید موفقیت‌آمیز ریشه‌های موئین ایفا می‌کند. نتایج این بررسی و تحقیقات دیگر (Dini Torkamani *et al*., 2014) نشان داد که سویه‌های باکتریایی در القای ریشه موئین گیاه دارویی سنبل‌الطیب دارای عملکردی از دامنه متوسط تا خیلی خوب می‌باشند. مشابه این تحقیق، بالاترین میزان انتقال ژنوم باکتریایی با زمان انتقال یکسان در کوتاه‌ترین مدت در گیاهان بادام زمینی (*Arachis hypogaea*)، برگ بیدی (*Tradescantia*

virginiana)، کنف بنگالی (*Crotalaria juncea*) و کاسنی (*Cichorium intybus*) تلقیح شده با سویه A13 نسبت به سویه‌های دیگر باکتریایی مشاهده گردید (Geier and Sangwan, 1996؛ Lee *et al*., 1998؛ Gitz *et al*., 2004؛ Kim *et al*., 2004). همچنین، نتایج این تحقیق و یافته‌های پیشین (Baron *et al*., 2001؛ Sharifi *et al*., 2013) نشان داد که کیفیت محیط رشد و ترکیبات غذایی آن قادر به تأثیرگذاری بر میزان تلقیح با سویه‌های باکتریایی است. از سوی دیگر، عوامل متعددی مانند ژنوتیپ، سویه باکتریایی، مولکول‌های پیام‌رسان، شرایط فیزیولوژیکی بافت گیاه میزبان و محیط کشت بر میزان تراریختگی، تلقیح و تولید ریشه موئین بوسیله باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز مؤثر هستند. با توجه به اینکه محیط کشت با تأمین عناصر غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد، بر نمو، خصوصیات فیزیولوژیکی و ظرفیت سنتز DNA و توانایی تقسیم سلولی گیاه میزبان تأثیر دارد، القای تشکیل ریشه‌های موئین، رشد و فراوانی آنها تحت تأثیر ترکیب و کیفیت محیط رشد می‌باشد (Baskaran & Jayabalan, 2009).

نتایج این تحقیق هم‌راستا با یافته‌های Bensaddek و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که نوع ریزنمونه و محیط کشت، نقش چشمگیری در افزایش زیست توده ریشه‌های موئین، تسریع در جذب عناصر غذایی و کوتاه شدن طول دوره رشد دارد. بیشترین میزان تحریک ریشه موئین در کمترین زمان ممکن در ریزنمونه برگ لپه‌ای مشاهده شد (۹۲ درصد)، اگرچه ریزنمونه هیپوکوتیل هم پاسخی مثبت به تلقیح باکتریایی نشان داد (۳۹ درصد). نتایج نشان داد که ظهور ریشه‌های موئین بر ریزنمونه هیپوکوتیل با تأخیری ۲ هفته‌ای نسبت به ریزنمونه برگ لپه‌ای انجام شد که همین باعث کاهش تولید ریشه موئین گردید. از آنجایی که تفاوت‌های فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی اندام‌های گیاهی در تولید و ذخیره هورمونی زیاد است، برگ‌های جوان لپه‌ای منبع اکسین هستند که در رشد، تقسیم سلولی و تشکیل ریشه‌های موئین نسبت به سایر اندام‌ها مانند هیپوکوتیل مستعدتر هستند.

این آزمایش و نتایج Yoshimatsu و Shimomura (۱۹۹۲) نشان داد که میزان رشد کلون‌های تلقیح شده بستگی معنی‌داری با انتخاب نوع باکتری و انتقال ساختار ژنتیکی به گیاه میزبان دارد. دلیل این تنوع، ورود مقادیر مختلفی از T-DNA باکتری در سلول‌های تراریخته اولیه و بیان متفاوت ژن‌های باکتری ارزیابی می‌گردد.

نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از تلقیح باکتریایی در رشد ریشه‌های موئین به دلیل کوتاه شدن طول دوره رشد، جانشین مناسبی به جای کشت‌های مزرعه‌ای محسوب می‌شود. از سوی دیگر، انتخاب محیط کشت و سویه باکتریایی در فرایند انتقال ژن به سلول گیاهی، میزان رشد و کیفیت ترکیبات ثانویه نیز دارای اهمیت چشمگیری است.

نتایج این تحقیق، تأثیر معنی‌دار ترکیب محیط کشت و انتخاب سویه باکتری برای تحریک ریشه‌زایی و تولید ریشه‌های موئین گیاه دارویی سنبل‌الطیب را نشان داد. از سوی دیگر، مشخص گردید که ترکیب و غلظت محیط کشت در ایجاد شرایط بهینه رشد ریشه‌های موئین ضروریست. از آنجایی که سیستم ریشه‌های موئین سنبل‌الطیب در فرایندهای پیچیده فیزیولوژیکی قادر به حفظ اسید والرنیک موجود در بافت‌های رویشی است، بنابراین، یافتن محیط رشدی منطبق با بیشترین رشد رویشی و تولید مطلوب متابولیت‌های ثانویه در گیاه، در تحقیقات آینده ضروریست.

References

- Akasaka, Y., Mii, M. and Daimon, H., 1998. Morphological alterations and root nodule formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Annals of Botany, 81: 355-362.
- Akhondzadeh, S. and Daliri, A., 2004. Herbal medicine in sleep disorders. Journal of Medicinal Plants, 3(9): 79-86.
- Barik, D.P., Mohapatra, U. and Chand, P.K., 2005.

Transgenic grass pea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing Agrobacterium-mediated transformation and regeneration. Plant Cell Reports, 24: 523-531.
- Baron, C., Domke, N., Beinhofer, M. and Hapfelmeier, S., 2001. Elevated temperature differentially affects virulence, vir*B* protein accumulation, and t-pilus formation in different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. Journal of Bacteriology, 183: 6852-6861.
- Baskaran, P. and Jayabalan, N., 2009. Psoralen production in hairy roots and adventitious roots cultures of *Psoralea coryfolia*, Biotechnology Letters, 31: 1073-1077.
- Bauer, A., Brönstrup, M., 2014. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. Natural Product Reports, 31: 35-60.
- Bensaddek, L., Gillet, F., Nava-Saucedo, J.E. and Fliniaux, M.A., 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. Journal of Biotechnology, 85: 35-40.
- Bent, S., Padula, A., Moore, D., Patterson, M. and Mehling, W., 2006. Valerian for Sleep: A Systematic Review and Meta-Analysis. The American Journal of Medicine, 119(12): 1005-1012.
- Bhatt, I.D., Dauthal, P., Rawat, S., Gaira, K.S., Jugran, A., Rawal, R.S. and Dhar, U., 2012. Characterization of essential oil composition, phenolic content, and antioxidant properties in wild and planted individuals of *Valeriana jatamansi* Jones. Science Horticulture, 136: 61-68.
- Chabaud, M., Carvalho-Niebel. F. and Barker, D.G., 2003. Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hyper virulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. Plant Cell Reports, 22(1): 46-51.
- Damnjanović, I., Kitić, D., Zlatković-Guberinić, S., Milosavljević, J. and Conic, I., 2010. 'Contemporary aspects of using *Valeriana Officinalis'*. Acta Medica Medianae, 49: 65-70.
- Dini Torkamani, MR., Abaspour, N., Jafari, M. and samadi, A., 2014. Induction and Optimization of Hairy Root Growth Condition for *Valeriana officinalis* L. Through Inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Cell & Tissue, 5(1): 23-30
- Fernandez, S., Wasowski, C., Paladini, A. and Mariel, M., 2007. Sedative and Sleep-enhancing Properties of Linarin, a Flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis* L. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 77(2): 399-404.
- Filizadeh, Y. and Goodarzi, G., 2010. Essential Oils from Hairy Root Cultures and Field Cultivated Roots of Valerian (*Valeriana sisymbriifolium*). Journal of Medicinal Plants, 35: 120-128.
- Fitzgerald, J.A., Könemann, S., Krümpelmann, L., Županič, A. and 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.
- Geier, T. and Sangwan, R.S., 1996. Histology and chimera segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria internode* explants. Plant Cell Reports, 15: 386-390.
- Giri, A., Ravindra, S.T., Dhingra, V., and Narasu, M. L., 2001. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. Current Science, 81: 378-382.
- Granicher, F., Christen, P. and Kapetandis, I., 1992. High yield production of valepotriates by hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Miken. Plant Cell Reports, 11(7): 339-342.
- Gitz, D.C., Gitz, L.L., Mcclure, J.W. and Huerta, A.J., 2004. Effects of a PAL inhibitor on phenolic accumolation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia*. Journal of Experimental Botany, 55: 919-927.
- Hagel, J.M. and Facchini, P.J., 2013. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism–a century of discovery and a brave new world. Plant and Cell Physiology, 54(5): 647-72.
- Hobbs, C., 1989. Valerian: a literature review. Herbalgram, 21(3):19-34.
- Hu, Z.B. and Alferman, A.W., 1993. Diterpenoid production in hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza*. Phytochemistry, 32: 699-703.
- Houghto, P.J., 1999. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5: 505-12.
- Jenifer, U., Francina Cecilia, K., and Ravindhran, R., 2012. In vitro adventitious root and hairy root cultures in Boerhaavia diffusa L., International Journal of oral care Research, 4(1): 65 –7.
- Jugran, A.K., Bahukhandi, A., Dhyani, P., Bhatt, I.D., Rawal, R.S., Nandi, S.K. and Palni, L.M.S., 2015. The effect of inoculation with mycorrhiza: AM on growth, phenolics, tannins, phenolic composition and antioxidant activity in *Valeriana jatamansi* Jones. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 15(4):1036-1049.
- Kamada, H., Okamura, N., Sataka, M., Harada, H. and Shimomura, K., 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Reports, 5(4): 523-531.
- Kamboj, VP., 2000. Herbal medicine. Current Science, 78: 35–7.

- Khalili S., Moieni, A. and Abdoli, M., 2014. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes*, culture medium, age and type of explant on hairy root induction in *Echinacea angustifolia*. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 3(1): 49-56.
- Kim, K.H., Lee, Y.H., Kim, D. and Park, YH., 2004. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports, 23: 386-390.
- Kwiatkowski, C., 2010. 'Evaluation of yield quality and weed infestation of common valerian (*Valeriana officinalis* L.) in dependence on weed control method and forecrop'. Acta Agribotanica. 63:179-188.
- Królicka, A., Staniszewska, I., Bielawski, K., Maliński, E., Szafranek, J. and Łojkowska, E., 2001. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. Plant Science, 160: 259-264.
- Lee, SK., Cui, B., Mehta, R. and Kinghorn, AD., 1998. Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1H-cyclopenta[b]benzofuran lignans isolated from *Aglaia elliptica*. Chemico-Biological Interactions. 115: 215–228.
- Lee, S.Y., Kim, S.G., Song, W.S., Kim, Y.K., Park, N.I. and Park, S.U., 2010. Influence of different strains of Agrobacterium *rhizogenes* on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in Rubia akane Nakai, Romanian Biotechnology, 15: 5405-5409.
- Lei, C., Zhen-Yu W. and Xiu-Hua, Z., 2012. Optimization of elicitors and precursors to enhance valerate production in adventitious roots of *Valeriana amurensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 108: 411–420.
- Mehrota, T., Kukreja, AK., Khanuja, S. and Mishra, B.N. 2008. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyyhiza glabra* in bioreactor. Electronic Journal of Biotechnology, 11:2: 1-7.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviews, 11: 69-79.
- Ooi, J., Li, Y., Rogers, C. and Cantorna, M., 2016. Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate-induced colitis. The Journal of Nutrition, 143(10):1679-86.
- Ohara, A., Akasaka, Y., Paimon, H. and Mii, M., 2000. Plant regeneration from hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Crotalaria Juncea* L. Plant Cell Reports, 56: 563-568.
- Ozyigit, I.I., Dogan, I. and Tarhan, E.A., 2013. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and its biotechnological applications in crops. In Crop Improvement. pp: 1-48.
- Palazon, J., Pinol, M.T., Cusido, R.M., Morales, C. and Bonfill, M., 1997. Application of transformed root technology to the production of bioactive metabolites. Recent development in Plant Physiology, 1: 125-143.
- Panda, M., Mehta, U., and Hazra, S., 2017. Optimizing culture conditions for establishment of hairy root culture of *Semecarpus anacardium* L. Biotechnology, 7(1):21
- Park, S.U. and Facchini, P.J., 2000. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. Journal of Experimental Botany, 51: 1005-1016.
- Penzkofer, M., Ziegler, E. and Heuberger, H., 2014. 'Contents of essential oil, valerenic acids and extractives indifferent parts of the rootstock of medicinal valerian (*Valeriana officinalis* L)'. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 1: 98–106.
- Prasad, A., Patel, P., Pandey, S., Niranjan, A. and Misra, P., 2020. Growth and alkaloid production along with expression profiles of biosynthetic pathway genes in two contrasting morphotypes of prickly and prickleless Solanum viarum Dunal. Protoplasma, 257(2): 561-572.
- Rahnama, H., Hasanloo, T., Shams, M.K. and Sepehrifar, R., 2008. Silymarin production in hairy root culture of *Silybum marianum* Gearth. Iranian Journal of Biotechnology, 6: 113-118.
- Rao, R.S. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20: 101-153.
- Rezaie, A., Pashazadeh, M., Ahmadizadeh, Ch., Jafari, B. and Jalilzadeh, H.M., 2010. Study of Sedative and Anxiolytic Effect of Herbal Extract of *Nardostachys jatamansi* in Comparison with Dizepam in Rats. Journal of Medicinal Plants, 9(36):169 -74.
- Saravankumar, A., Aslam, A. and Shajahan, A., 2012. Development and optimization of hairy root culture systems in *Withania somnifera* (L.) Dunal for withaferin-A production. African Journal of Biotechnology, 11(89):16412-16420.
- SAS Institute, 2002. JMP statistics and graphics guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Sen, C., Gordillo, G., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, K, Gottrup, F., Gurtner, G. and Longaker, M., 2009. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. Wound Repair Regeneration, 17(6): 763-71.
- Shirazi, Z., Piri, K., Mirzaie, A. and Hasanloo, T., 2012. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra*. Journal of Medicinal Plants Research, 6(31): 4640-4646.
- Solemani, T., Keyanfar, M., Piri, H., and Hasanloo, T., 2012. Morphological Evaluation of hairy roots induced in *Artemisia annua* L and investigating elicitation effects on the hairy roots biomass production. International Journal of Agriculture: Research and Review, 2: 1005-1013.
- Tariverdizadeh, N., Mohebodini, M., Chamani E. and Ebadi, A., 2018. Effects of explant age and strain of Agrobacterium rhizogenes on hairy root induction in Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.). Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 7(1): 50-58.
- Thwe, A., Valan Arasu, M., Li, X., Park, C.H., Kim, S.J., Al-Dhabi, N.A. and Park, SU., 2016. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* gaertn). Frontiers in Microbiology, 7: 1-10
- Vamenani, R., Pakdin-Parizi, A., Mortazavi, M. and Gholami, Z., 2020. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Trachyspermum ammi* L. for the efficient production of thymol. Biotechnology and Applied Biochemistry, 67(3): 389-395.
- Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites, Phytochemistry Reviews, 1: 13-25.
- Wiśniewski, J., Szczepanik, M., Kołodziej, B. and Król, B., 2016. Plantation methods effects on common valerian (*Valeriana officinalis*) yield and quality. The Journal of Animal & Plant Sciences, 26(1): 177-184.
- World Health Organization (WHO), 2008. "Traditional medicine" Fact sheet number: 134 (December) ".http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/.
- Yoshimatsu, K. and Shimomura, K., 1992. Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724. Plant Cell Reports, 11: 132-136.
- Zhou, M.L., Zhu, X.M., Shao, J.R., Tang, Y.X. and Wu, Y.M., 2011. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. Applied Microbiol Biotechnology, 90: 1229-1239.