تولید گیاهان کامپوزیت تراریخت خارج شیشه‌ای در گیاه دارویی شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) به واسطه اگروباکتریوم رایزوژنز به عنوان روشی نوین

علیرضا زبرجدی[1*]، معصومه صفری[2]، کیانوش چقامیرزا[1]

۱- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی و عضو گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۲- کارشناس ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
* آدرس مکاتبه: کرمانشاه، دانشگاه رازی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات
تلفن: ۰۹۱۸۱۳۲۱۸۰۹، نمابر: ۳۸۳۲۱۰۸۳ (۰۸۳)
پست الکترونیک: zebarjadiali@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۲ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۳/۹

چکیده

مقدمه: شیرین‌بیان با نام علمی ***Glycyrrhiza glabra*** از خانواده لگومینوز می‌باشد که از مشهورترین گیاهان دارویی در جهان است و به شکل گسترده‌ای در پزشکی، داروسازی، صنایع قنادی و بهداشتی مصرف می‌شود. قسمت‌های مورد استفاده آن ساقه‌های زیرزمینی و ریشه‌های گیاه است که دارای ترکیبات مختلفی است، از جمله مهم‌ترین این مواد، ترکیبی به نام گلیسریزین است.

هدف: پژوهش حاضر با هدف انتقال ژن ریشه‌زایی از طریق آگروباکتریوم رایزوژنز به روش خارج شیشه‌ای و به منظور تولید انبوه ریشه‌های مویی در شیرین‌بیان اجرا شد.

روش بررسی: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار در سه تکرار اجرا شد. ابتدا ریشه‌ی گیاهچه‌های جوان حاصل از کشت بذور حذف شده و گیاهچه‌های برش داده شده از قسمت هیپوکوتیل داخل پشم‌سنگ حاوی سوسپانسیون باکتری قرار گرفتند. پس از ۱۰ تا ۱۴ روز از تلقیح با اگروباکتریوم رایزوژنز ریشه‌ها از داخل مکعب خارج شدند. درصد القای ریشه توسط چهار سویه باکتری (**ATCC15834**، **GMI 9534**، **A4** و **A13**) همراه با شاهد بررسی شد.

نتایج: نتایج تست **PCR** با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بر روی ریشه‌های حاصل از گیاهان کامپوزیت (تراریخت احتمالی) نشان داد که سه سویه **A4**، **A13** و **GMI 9534** به میزان ۱۰۰ درصد و سویه **ATCC 15834** به میزان ۶۶/۶۶ درصد ریشه تراریخت تولید نموده‌اند.

نتیجه‌گیری: لذا تولید گیاه کامپوزیت شیرین‌بیان به دلیل کم هزینه، سریع و ساده بودن مورد توجه می‌باشد.

گل‌واژگان: شیرین‌بیان، اگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه موئین، گیاه کامپوزیت

www.SID.ir

مقدمه

خانواده لگومینوز یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهان گلدار با ۱۸۰۰۰ گونه و حدود ۶۵۰ جنس است [۱]. شیرین‌بیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی این تیره است که از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است و از ۴۰۰۰ سال پیش برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده شده است [۲]. از ریشه شیرین‌بیان در اکثر فارماکوپه‌ها به عنوان دارو یاد شده است. ریشه‌ها و ریزوم‌های این گیاه منبعی غنی از ترکیبات طبیعی و فعال از نظر زیستی می‌باشد. مهم‌ترین ترکیب مؤثره آن ماده‌ای به نام گلیسریزین است که گلیکوزیدی از دسته ساپونین‌ها است و ۵۰ برابر شیرین‌تر از قند است [۶-۳] و محصول هیدرولیز آن گلیسریزیک اسید دارای بسیاری از فعالیت‌های مهم دارویی از جمله فعالیت ضد التهابی [۸، ۷]، ضد باکتری [۹]، ضد حساسیت [۱۱، ۱۰]، آنتی‌اکسیدانی [۱۲]، ضد قارچی [۱۳]، ضد توموری [۱۴] و همچنین ضد ویروسی [۱۵] است.

با توجه به اهمیت دارویی گیاه شیرین‌بیان، ایران در زمره صادرکنندگان مهم این گیاه در دنیا قرار دارد. از آنجا که استان فارس، کرمان و کرمانشاه از مهم‌ترین قطب‌های تولید و صادرات این محصول هستند، سالیانه صدها تن از این گیاه از مناطق رویش آن به صورت وحشی، برداشت می‌شود به طوری که در قسمت‌های جنوبی کشور بخصوص استان‌های فارس و کرمان گیاه در خطر انقراض قرار دارد. بنابراین لازم است از روش‌های دیگری غیر از برداشت مستقیم از مراتع به تولید این محصول اقدام کرد. در این رابطه تولید ریشه‌های تراریخت به منظور تولید سریع و فراوان متابولیت‌های ثانویه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد اما از آنجا که برای تولید این ریشه‌ها از مراحلی استفاده می‌شود که در آن باید از مرحله کشت بافت برای بسیاری از گونه‌های گیاهی عبور کرد و کشت بافت نیاز به زیرساخت‌های تخصصی، پرسنل آموزش دیده و هزینه بالا دارد [۱۶]، تکنیک کشت گیاهان کامپوزیت پیشرفتی قابل توجه می‌باشد که در گیاهانی که به کشت بافت سخت پاسخ می‌دهند باعث کاهش زمان مورد نیاز برای تولید بافت گیاهی تراریخت می‌شود، این گیاهان بعد از تلقیح با باکتری به صورت کشت خارج شیشه‌ای نگهداری می‌شوند [۱۷]. این تکنیک جایگزین مناسبی برای ترانسفورماسیون بدون استفاده از کشت بافت است [۱۸]. گیاهان کامپوزیت دارای اندام هوایی طبیعی (غیر ترانسژنیک) با ریشه‌های ترانسژنیکی هستند که بوسیله اگروباکتریوم رایزوژنز ترانسفورم شده‌اند [۲۱ - ۱۹]. سیستم گیاهان کامپوزیت پتانسیل زیادی برای بررسی بیان ژن و فنوتیپ ریشه دارد، می‌توان از آن در مطالعه جذب مواد غذایی، انتقال هورمون و فعل و انفعالات با باکتری‌های ایجاد کننده گره ریشه و نماتدها استفاده کرد [۲۲]. به عنوان مثال برای مطالعه تعامل گیاه لوبیا چشم بلبلی با ریشه‌های انگلی بازدانگان از گیاهان کامپوزیت خارج شیشه‌ای استفاده شد [۲۳]، همچنین این روش در بررسی تشکیل گره در لوبیا مورد استفاده قرار گرفت [۲۴]. این سیستم برای اولین بار توسط هانسن (Hansen) و همکاران (۱۹۸۹) ابداع شد [۲۵]. روش درون شیشه‌ای (*in vitro*) هانسن و همکاران توسط تورگروسا (Torregrosa) و بواکیوت (Bouquet) (۱۹۹۷) توسعه پیدا کرد [۲۶] و سال‌های اخیر روش‌های خارج شیشه‌ای (*ex vitro*) تولید گیاهان کامپوزیت توسط تویلور (Taylor) و همکاران (۲۰۰۶) و کولیر (Collier) و همکاران (۲۰۰۵) توسعه یافته است [۲۶، ۲۲]. گیاهان کامپوزیت برای تولید بیش از ۲۰ گونه مختلف به کار رفته که روش‌های به کار رفته نتایج مشابهی داشتند [۲۸، ۲۷، ۲۴]. در سال ۲۰۰۶، آلپیزار (Alpizar) و همکارانش با استفاده از تولید کارآمد ریشه‌های ترانسفورم شده با اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه کامپوزیت قهوه، بیان ژن مقاومت به نماتد در ریشه‌ها را مورد بررسی قرار دادند [۲۹]. با استفاده از روش تولید گیاهان کامپوزیت مطالعاتی در مورد RNAi silencing در ریشه توسط کوماجای (Kumagai) و کوچی (Kouchi) در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت [۳۰] و همچنین تلاشی برای روشن کردن ماهیت سیستمیک RNAi silencing توسط لیمپنس (Limpens) و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد [۳۱]. در گیاهان کامپوزیت زمان تولید ریشه‌های تراریخت از چند ماه به چند هفته کاهش می‌یابد [۳۲، ۳۱]. اطلاعات در سطح گیاه کامل جهت آنالیز عملکرد به دست می‌آید که به شرایط طبیعی نزدیک‌تر است [۲۹]. محدودیت عمده این روش این است که،

Archive of SID
www.SID.ir

به دلیل تراریخت نبودن اندام هوایی نگهداری پایدار گیاهان کامپوزیت بوسیله تکثیر رویشی یا خود لقاحی امکان‌پذیر نیست، با این حال اخیراً در گونه *M. truncatula*، گیاهان باززا شده از ریشه به دست آورده‌اند [۳۳].

پژوهش حاضر با هدف تولید گیاهان کامپوزیت از طریق انتقال ژن ریشه‌زایی به واسطه آگروباکتریوم رایزوژنز و به منظور تولید انبوه ریشه‌های مویین در شیرین بیان اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه

بذرهای گیاه شیرین‌بیان، گونه *Glycyrrhiza glabra* از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری و تا زمان استفاده در ۴°C نگهداری شدند. ابتدا بذور با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه به صورت سطحی استریل شدند، سپس به مدت ۱۵ دقیقه بوسیله هیپوکلریت سدیم (NaOCl) ۱/۵ درصد استریل شدند. پس از این مرحله بذرها با آب مقطر استریل در سه زمان ۵ دقیقه‌ای شستشو داده شدند. سپس بذرها در خاک اتوکلاو شده کشت داده شدند.

تهیه باکتری

سویه‌های اگروباکتریوم رایزوزنز در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB به علاوه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت و درون شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ °C و سرعت ۱۸۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۳ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm رسوب داده شدند. رسوب حاصله در ۴۰ ml آب مقطر استریل حل شد و pH محلول روی ۵/۴ تنظیم شد. سوسپانسیون حاصل برای تلقیح نمونه‌ها به کار رفت.

تلقیح گیاه بوسیله اگروباکتریوم رایزوژنز

مکعب‌های پشم‌سنگ در ابعاد ۳ سانتی‌متر برش داده شدند و داخل آن یک حفره ایجاد شد. ۴ مکعب در هر پتری قرار گرفت و ۲ ml سوسپانسیون باکتری (۰/۲-۰/۴ = OD600) داخل هر مکعب تزریق شد. بعد از جوانه‌زنی بذور، ریشه‌ی گیاهچه‌های حاصله حذف شده و گیاهچه‌های برش داده شده از قسمت هیپوکوتیل داخل پشم‌سنگ قرار گرفتند. جهت حفظ رطوبت، روی پتری‌ها پوشش شفاف قرار گرفت (شکل شماره 1a) و به مدت ۲۴ ساعت داخل اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ °C و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پوشش پتری‌ها برداشته شد و یک ساعت استرس رطوبتی به گیاه اعمال شد. سپس ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هر مکعب اضافه شد و پوشش پتری‌ها مجدد روی آن قرار گرفت. بعد از ۱۰ تا ۱۴ روز، ریشه‌ها از داخل مکعب خارج شدند، طی این مدت در صورت لزوم ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هر مکعب اضافه شد. دستور فوق برای تولید گیاه کامپوزیت، از پروتکل استفاده شده بوسیله کولیر و همکاران (۲۰۰۵) اقتباس شده است [۲۲]. به منظور رفع آلودگی باکتریایی از محلول ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتاکسیم جهت شستشویی ریشه‌ها استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، به منظور تأیید ریشه‌های تراریخت

با توجه به اینکه ژن *rol*B در T-DNA اگروباکتریوم رایزوژنز قرار دارد، برای اثبات انتقال T-DNA به ژنوم گیاه می‌توان حضور این ژن را ثابت کرد. بدین‌منظور یک جفت پرایمر اختصاصی به شرح زیر برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol*B به طول ۴۳۰ bp طراحی شد:

Forward Primer 5'-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3'
Reverse Primer 5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3'

برنامه مورد استفاده به شرح جدول شماره ۱ می‌باشد.

جدول شماره ۱- برنامه PCR برای ژن *rolB*

سیکل	مرحله واکنش	دما (°C)	زمان
سیکل اول	واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه
	واسرشته‌سازی	۹۴	۳۰ ثانیه
سیکل دوم (۳۵بار)	دمای اتصال پرایمر	۵۳	۳۰ ثانیه
	بسط	۷۲	۶۰ ثانیه
سیکل سوم	بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه

Archive of SID
www.SID.ir

برای اطمینان از عدم حضور باکتری در بافت‌های تراریخت، از یک جفت پرایمر اختصاصی جهت تکثیر قطعه‌ای به طول ۷۳۰bp از ژن *virC* استفاده شد. برای کنترل مثبت، از باکتری‌های مذکور به عنوان الگو استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر بخشی از ژن *virC* به شرح زیر است:

Forward Primer 5'-ATCATTTGTAGCGACT-3'
Reverse Primer 5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3'

برنامه مورد استفاده به شرح جدول شماره ۲ می‌باشد.

جدول شماره ۲- برنامه PCR برای ژن *virC*

سیکل	مرحله واکنش	دما (°C)	زمان
سیکل اول	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۳۰۰ ثانیه
	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه
سیکل دوم (۳۵ بار)	دمای اتصال پرایمر	۴۳	۳۰ ثانیه
	بسط	۷۲	۹۰ ثانیه
سیکل سوم	بسط نهایی	۷۲	۳۰۰-۶۰۰ ثانیه

طرح آزمایشی مورد استفاده

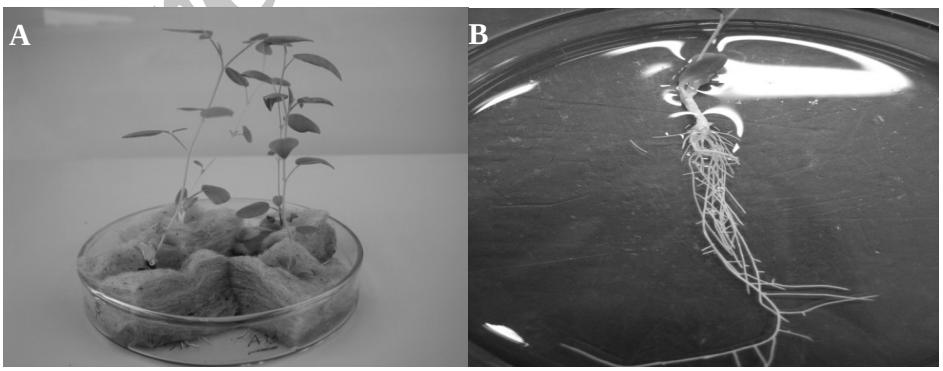
آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با پنج تیمار (شاهد و سویه‌های A4، ATCC15834، A13 و GMI 9534) در سه تکرار اجرا شد.

نتایج

ریشه‌های موئین تراریخت احتمالی (Putative) حاصل از تلقیح توسط اگروباکتریوم رایزوژنز پس از حدود ۱۴ روز ظاهر شد (شکل شماره ۱ b و c).

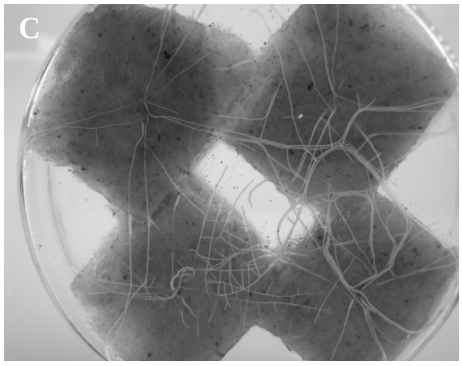
در این آزمایش از نمونه شاهد استفاده شد (بدون استفاده از باکتری) که در این نمونه‌ها ریشه‌ای تولید نشد. نتایج نشان داد که همه‌ی سویه‌های باکتری دارای درصد القای ریشه مشابه بودند. بنابراین به منظور مقایسه درصد القای ریشه توسط سویه‌های باکتری و همچنین تأیید ماهیت تراریختی ریشه‌ها و اثبات ژن منتقل شده از آگروباکتریوم رایزوژنز به ژنوم گیاه، آنالیز PCR صورت گرفت. آزمایش‌ها شامل استخراج DNA به روش CTAB و PCR برای تأیید حضور ژن *rolB* به طول ۴۳۰bp انجام گرفت و حضور این ژن در ژنوم سلول‌های ریشه گیاهان تراریخت تأیید شد (شکل شماره ۲). بر اساس این نتایج سه سویه A4، A13 و GMI 9534، ۱۰۰ درصد و سویه ATCC 15834 به میزان ۶۶/۶۶ درصد تراریخت بودند.

همچنین واکنش PCR برای قطعه‌ی ۷۳۰ bp مربوط به ژن *virC* انجام گرفت که در هیچ‌کدام از ریشه‌های تراریخت احتمالی باندی تولید نشد شکل شماره ۲ و این بدان معنا است که T-DNA باکتری در ژنوم گیاهی وارد شده است و آلودگی باکتریایی وجود ندارد.

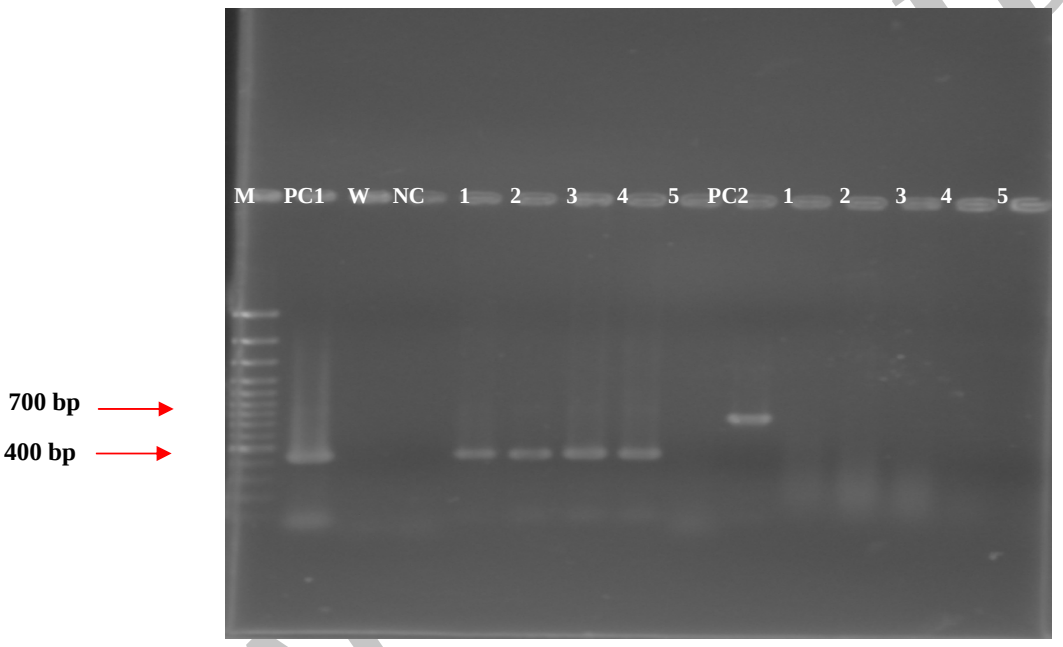


شکل شماره ۱-

Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱- شمایی از گیاهان کامپوزیت تولید شده. (A): بخش‌های هوایی گیاهان کامپوزیت. (B): گیاه کامپوزیت کامل دارای بخش‌های هوایی و ریشه و (C): ریشه‌های تراریخت



شکل شماره ۲- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR برای ژن *rolB* و ژن *virC*. M: مارکر DNA، PC1: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن rolB)، W: آب (کنترل آلودگی)، NC: کنترل منفی (نمونه برگی گیاه)، 1,2,3,4,5: گیاهان تراریخت احتمالی، PC2: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن *virC*)، 1,2,3,4,5: گیاهان تراریخت احتمالی

بحث

در مورد القای ریشه موئین از طریق اگروباکتریوم رایزوژنز بوسیله تکنیک تولید گیاهان کامپوزیت، در گیاهان مختلف گزارش‌هایی وجود دارد از جمله گزارش کاظم (۱۳۹۱) که در مورد گیاه باباآدم انجام شد [۳۴]. ایشان درصد القای ریشه موئین را بین ۵۵/۷ تا ۱۰۰ درصد گزارش داد. بین ۲۰ تا ۶۰ درصد از گیاهان کامپوزیت به دست آمده توسط کولیر و همکارانش (۲۰۰۵) تراریخت بودند [۲۲]. با استفاده از تولید گیاه کامپوزیت ذرت و تولید ریشه‌های موئین تراریخت روانو (Runo) و همکاران (۲۰۱۲) فعل و انفعالات گیاه با انگلی به نام

www.SID.ir

Striga hermonthica را بررسی کردند، در این تحقیق ۸۵ درصد از گیاهان ذرت، ریشه‌های موئین تراریخت ژن گزارشگر GFP (Green Fluorescent Protein) را بیان کردند [۳۵].

نتایج تحقیق حاضر نیز بین ۶۶/۶۶ تا ۱۰۰ درصد تراریختگی را در ریشه گیاه شیرین بیان نشان داد و این نشان‌دهنده کارایی مناسب این روش برای ایجاد ریشه‌های تراریخت می‌باشد.

مطالعات زیادی بر روی گیاهان کامپوزیت انجام شده است به عنوان مثال در تحقیقی که بر روی گیاه کامپوزیت کدو انجام شد به این نتیجه رسیدند که الگوی پاسخ اکسین در رأس ریشه کدو مشابه ریشه‌های آرابیدوپسیس است، اِلینا (Ilina) و همکاران (۲۰۱۲) عنوان کردند که گیاهان کامپوزیت به دست آمده از تلقیح با اگروباکتریوم رایزوژنز یک ابزار خوب برای بررسی ریشه، توسعه مریستم انتهایی ریشه و انشعابات ریشه می‌باشد [۳۶].

بر اساس گزارش وِنا (Veena) و تیلور (2007) مزیت عمده گیاهان کامپوزیت تولید شده این است که با موفقیت می‌توان آنها را در خاک و یا به صورت هیدروپونیک کشت نمود [۳۷]. این مورد در این آزمایش با کشت گیاه کامپوزیت در خاک تأیید شد.

نتیجه‌گیری

تولید موفقیت‌آمیز گیاهان کامپوزیت شیرین‌بیان در این تحقیق نشان داد که پتانسیل استفاده از این روش نوین می‌تواند به صورت بالفعل جهت تولید انبوه ریشه‌های موئین تراریخت به کار رود. در نهایت از این مورد می‌توان برای افزایش بازده تولید متابولیت‌های مهم ثانویه از جمله گلیسریزین استفاده کرد. از طرف دیگر ساده، کم هزینه بودن به واسطه عدم استفاده از شرایط کاملاً استریل و تولید سریع از ویژگی‌های عمده این روش محسوب می‌شود. با توجه به اینکه تا بحال گزارشی از تولید کامپوزیت گیاه شیرین‌بیان وجود ندارد لذا مطالعه حاضر اولین گزارش در این زمینه می‌باشد که قادر است زمینه استفاده از آن را در سایر گیاهان دارویی مهیا نماید.

منابع

1. Polhill RM and Raven PH. Advances in legume systematics. Parts 1 and 2. 1981, pp: 1049.

2. Zarghari A. Medicinal Plants. Tehran University Press. 1997, 647-655. (In Persian).

3. Shibata S. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Pharmaceutical Society of Japan* 2000; 120: 849 - 62.

4. Hanrahan C. Gale Encyclopedia of Alternative Medicine: Licorice [book on CD-ROM]. Farmington Hills, Thomson Gale. 2001.

5. Mousa N A, Siaguru E, Wiryowidagdo S and Wagih M E. Rapid clonal propagation of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) by *in vitro* shoot culture. *Sugar Tech.* 2006; 8 (4): 292 - 98.

6. Mousa NA, Siaguru E, Wiryowidagdo S and Wagih ME. Establishment of regenerative callus and cell suspension system of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) for the production of the sweetener glycyrrhizin *in vitro*. *Sugar Tech*. 2007; 9: 72 - 82.

7. Gibson MR. Glycyrrhiza in old and new perspectives. *Lloydia* 1987, 41: 348 - 54.

8. Capasso F, Mascolo N and Duraccio M. Glycyrrhetinic acid, leucocytes and prostaglandins. *Journal of Pharmacy and Pharmacol.* 1983; 35: 332 - 35.

9. Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chem*. 2007; 42: 125 - 37.

10. Brown D. The herb national society of America encyclopedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley Publishing Inc. New York. 1995, p: 135.

Archive of SID
www.SID.ir

11. Wang ZY and Nixon DW. Licorice and cancer. *Nutrition and Cancer* 2001; 39: 1 - 11.

12. Hong Y-K, H-T Wu, T Ma, W-J Liu and X-J He. Effects of *Glycyrrhiza glabra* polysaccharides on immune and antioxidant activities in high-fat mice. *International Journal of Biological Macromolecules* 2009; 45: 61 - 4.

13. Fatima A and et al. Antifungal activity of Glycyrrhiza glabra extracts and its active constituent glabridin. *Phytotherapy Res*. 2009; 23: 1190 - 93.

14. Chung J and et al. Inhibition of N-acetyltransferase activity and DNA–2-aminofluorene adducts by glycyrrhizic acid in human colon tumour cells. *Food and Chemical Toxicol*. 2000; 38: 163 - 72.

15. Asl MN and Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Res*. 2008; 22: 709 - 24.

16. Taylor NJ and Fauquet CM. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biol*. 2002; 21: 963 - 77.

17. Torregrosa L and Bouquet A. and co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1997; 1: 53 - 62.

18. Chabaud M, Boisson-Dernier A, Zhang, J Taylor C G, Yu O and Barker D G. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. *The Samuel Roberts Noble Foundation* 2006; 11: 1 - 8.

19. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C and Barker DG. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of Medicago truncatula for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2001; 14: 695 - 700.

20. Colpaert N, Tilleman S, Van Montagu M, Gheysen G and Terryn N. Composite Phaseolus vulgaris plants with transgenic roots as research tool. *African Journal of Biotechnol*. 2008; 7 (4): 404 - 8.

21. Clemow SR, Clairmont L, Madsen L H and Guinel FC. Reproducible hairy root transformation and spot-inoculation methods to study root symbioses of pea. *Plant Methods* 2011; 7 (46): 2 - 15.

22. Collier R, Fuchs B, Walter N, Kevin Lutke W and Taylor CG. *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J*. 2005; 43: 449 - 57.

23. Mellor KE, Hoffman AM and Timko MP. Use of *ex vitro* composite plants to study the interaction of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) with the root parasitic angiosperm Striga gesnerioides. *Plant Methods* 2012; 8 (1): 1 - 12.

24. Estrada-Navarrete G and et al. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of Phaseolus spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* 2007; 2: 1819 - 24.

25. Hansen J, Jørgensen J-E, Stougaard J and Marcker K A. Hairy roots—a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Reports* 1989; 8: 12 - 15.

26. Taylor C G, Fuchs B, Collier R and Kevin Lutke W. Generation of composite plants using *Agrobacterium rhizogenes.* Springer. 2006, pp: 155 - 68.

27. Estrada-Navarrete G and et al. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2006; 19: 1385 - 93.

28. Kereszt A and et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols* 2007; 2(4): 948 - 52.

29. Alpizar E and et al. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports* 2006; 25: 959 - 67.

Archive of SID

www.SID.ir

30. Kumagai H and Kouchi H. Gene silencing by expression of hairpin RNA in Lotus japonicus roots and root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2003; 16: 663 - 68.

31. Limpens E and et al. RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago* truncatula. *Journal of Experimental Botany* 2004; 55: 983 - 92.

32. Deng Y, Mao G, Stutz W and Yu O. Generation of composite plants in *Medicago truncatula* used for nodulation assays. *Journal of Visualized Experiments* 2011; 49: 1 - 4.

33. Crane C, E Wright, Dixon R A and Wang Z-Y. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 2006; 223: 1344 - 54.

34. Kazem S. Optimization of tissue culture and gene transformation in *Arctium Lappa*. Razi University. 2012, MSc Thesis of Biotechnology: (In Persian).

35. Runo S, Macharia S, Alakonya A, Machuka J, Sinha N and Scholes J. Striga parasitizes transgenic hairy roots of *Zea mays* and provides a tool for studying plant-plant interactions. *Plant Methods* 2012; 8: 1.

36. Ilina EL, Logachov AA, Laplaze L, Demchenko NP, Pawlowski K and Demchenko KN. Composite *Cucurbita pepo* plants with transgenic roots as a tool to study root development. *Annals of Botany* 2012; 110: 479 - 89.

37. Veena V and Taylor CG. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2007; 43: 383 - 403.

Archive of SID

www.SID.ir