



Effects of basal culture medium and non-living elicitors on biomass production and anthraquinone content of hairy roots in Runas (*Rubia tinctorum* L.)

Ebrahim Dorani^{1*} and Sanaz Hemmati Asl²

1*- Corresponding author, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran,

E-mail: uliae@yahoo.com

2- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received: October 2023

Revised: November 2024

Accepted: November 2024

Abstract

Background and objectives: Anthraquinones are secondary plant metabolites that play a significant role in the treatment of certain diseases, such as hepatitis and cancer. Anthraquinones are utilized not only in textiles and food production but also in the cosmetics, perfume, and pharmaceutical industries due to their high antioxidant levels. In vitro culture of plants has provided a suitable alternative method for producing medicinal compounds under controlled conditions, not affected by environmental factors. The hairy root culture system, based on inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*, has become an influential approach for producing secondary metabolites in plant roots, such as ginseng, over the last two decades. One of the advantages of in vitro production of these compounds is the possibility of increasing their yield through the use of influential nutrient elements, as well as inducing the production process and biosynthesis of secondary substances with various biological and non-biological elicitors. The objective of this research was to investigate the effect of salt concentration in the culture medium and sucrose levels on increasing hairy root biomass, and to examine the influence of different abiotic elicitors on enhancing anthraquinone production in madder hairy roots.

Methodology: For this purpose, in the first experiment, after inducing hairy roots, the effect of sucrose concentration (30, 45, and 60 g/L) in combination with basal medium salt strength (1/2 MS and MS) on root biomass enhancement was studied in a factorial experiment with a completely randomized design and four replications. In the second experiment, the effects of different elicitors, including titanium dioxide (50 and 100 mg/L), chitosan (100 and 150 mg/L), silver nitrate (50 and 100 mg/L), proline (250 and 500 mg/L), gibberellic acid (1 and 2 mg/L), and naphthalene acetic acid (1 and 2 mg/L), were investigated for their role in increasing anthraquinone (alizarin) production in hairy roots.

Results: In the first experiment, the 1/2 MS medium containing 45 g/L sucrose produced the highest biomass, followed by MS containing 45 and 60 g/L sucrose, MS with 30 g/L sucrose, and 1/2 MS containing 60 g/L sucrose. The best medium for biomass production from this experiment was selected for the subsequent experiment, in which the effect of different elicitor treatments for two days on the accumulation of the secondary metabolite (alizarin) was assessed. The results showed that the accumulation of the secondary metabolite in the medium



containing 250 mg/L of proline exhibited a significant increase compared to other elicitors, followed by 50 mg/L of silver nitrate and 2 mg/L of gibberellic acid, respectively. The secondary metabolite content in media supplemented with two different levels of naphthalene acetic acid did not differ significantly from that of the control.

Conclusion: Overall, this study demonstrated that the optimal root biomass production was achieved in 1/2 MS culture medium containing 45 g/L of sucrose, while the highest anthraquinone content was obtained in the presence of proline.

Keywords: *Rubia tinctorum* L., anthraquinone, elicitor, hairy root, secondary metabolite.

اثر محیط کشت پایه و محرکهای غیرزنده بر تولید زیست توده و محتوای آنتراکینون ریشه موین در روناس (*Rubia tinctorum* L.)

ابراهیم دورانی^{۱*} و ساناز همتی اصل^۲

^{۱*} - دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، پست الکترونیک: uliae@yahoo.com

^۲ - دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: آنتراکینون‌ها از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که نقش مهمی در درمان برخی از بیماری‌ها از جمله هپاتیت و سرطان دارند. آنتراکینون‌ها نه تنها در منسوجات و مواد غذایی بلکه به دلیل وجود بالای آنتی‌اکسیدان، در ساخت وسایل آرایشی، صنعت عطرسازی و صنعت داروسازی استفاده می‌شوند. کشت درون شیشه‌ای گیاهان یک روش جایگزین مناسب و عاری از عوامل محیطی را برای تولید ترکیبات دارویی در یک شرایط کنترل شده فراهم کرده است. سیستم کشت ریشه موین مبتنی بر تلقیح با آگروباکتریوم رایزوزنز در دو دهه گذشته به عنوان روش مؤثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های گیاهی مانند جینسینگ تبدیل شده است. یکی از مزیت‌های تولید این ترکیبات در شرایط درون شیشه‌ای، امکان افزایش تولید آنها با بکارگیری ترکیبات غذایی مؤثر و القای فرایند تولید و بیوسنتز مواد ثانویه با محرک‌های مختلف زیستی و غیر زیستی می‌باشد. هدف از این تحقیق، مطالعه اثر غلظت نمکی محیط کشت و غلظت ساکارز در افزایش تولید زیست‌توده ریشه موین و مطالعه اثر محرک‌های مختلف غیرزیستی در افزایش تولید آنتراکینون در ریشه موین روناس بود.

مواد و روش‌ها: برای این منظور، در آزمایش اول پس از القای ریشه موین ابتدا اثر ساکارز (۳۰، ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر) در ترکیب با محیط‌های پایه ۱/۲MS و MS در افزایش زیست‌توده ریشه موین در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با ۴ تکرار مطالعه شد. در آزمایش دوم، اثر محرک‌های مختلف در دو سطح و سه تکرار با غلظت‌های مختلف، دی‌اکسید تیتانیوم (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، کیتوزان (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، نیترات نقره (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، پرولین (۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، اسید جیبرلیک (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین‌استیک اسید (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در افزایش آنتراکینون (آلیزارین) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: در آزمایش اول محیط ۱/۲MS شامل ۴۵ گرم بر لیتر ساکارز بالاترین افزایش زیست توده را داشت و محیط‌های پایه MS حاوی ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز، MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱/۲MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز در رتبه‌های بعدی تولید زیست توده ریشه بودند. بهترین محیط در تولید زیست توده از این آزمایش انتخاب شد و برای آزمایش بعدی مورد استفاده قرار گرفت، به‌طوری‌که در این آزمایش اثر محرک‌های مختلف به مدت ۲ روز در افزایش ماده ثانویه (آلیزارین) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که انباشت ماده ثانویه در محیط حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین افزایش چشمگیری نسبت به بقیه محرک‌ها داشت و محرک‌های ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره و ۲ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک، به ترتیب در رده‌های بعدی قرار داشتند. محتوای متابولیت ثانویه در دو سطوح مختلف نفتالین استیک اسید تفاوت قابل توجهی نسبت به شاهد نداشت. نتیجه گیری: به طور کلی این مطالعه نشان داد که بیشترین تولید زیست توده ریشه در محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۴۵ گرم در لیتر ساکارز به دست آمد، در حالی که بالاترین میزان آنتراکینون در حضور پرولین حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: روناس (*Rubia tinctorum* L.)، آنتراکینون، محرک، ریشه موین، متابولیت ثانویه.

مقدمه

روناس با نام علمی *Rubia tinctorum* L. متعلق به خانواده Rubiaceae است که شامل ۴۵۰ جنس و ۶۵۰۰ گونه از درختان، درختچه‌ها و گیاهان می‌باشد (Singh & Chauhan, 2004). گونه‌های روناس دارای ارزش تجاری، اقتصادی و دارویی بالایی هستند و فعالیت‌های ضد میکروبی علیه برخی از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای از خود نشان داده‌اند (Perassolo et al., 2022). این گیاه حاوی مقادیر قابل توجهی از مولکول‌های رنگی آنتراکینون‌ها می‌باشد (Derksen & Van Beek, 2002). آنتراکینون‌ها به دلیل خواص ضد میکروبی، حشره‌کشی، ضد توموری، ضد انسداد، تنظیم فشارخون بالا و خاصیت آرام‌بخشی ظرفیت بالقوه درمانی دارند. علاوه بر این ویژگی‌های درمانی، آنتراکینون‌ها به دلیل محتوای آلزارین‌شان در رنگ‌آمیزی منسوجات استفاده می‌شوند (Oliveira et al., 2007). آنتراکینون‌ها نه تنها در منسوجات و فراوری مواد غذایی، بلکه به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت بیولوژیکی آن در ساخت وسایل آرایشی، عطرسازی و صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

رویکردهای بیوتکنولوژی به‌ویژه کشت سلول و بافت گیاهی نقش حیاتی در تولید ترکیبات دارویی مطلوب از گیاهان دارد (Lee et al., 2010). به دلیل پیشرفت‌های قابل توجهی که در زمینه استخراج متابولیت ثانویه از سلول گیاهی انجام شده، استفاده از فناوری کشت بافت و سلول در تولید ترکیبات ارزشمند دارویی از گیاهان بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Vanisree et al., 2004).

در دو دهه اخیر استفاده از کشت اندام به جای سوسپانسیون سلولی به دلایلی مانند ثبات ژنتیکی و سنتز بالای محصولات توسعه یافته است. در برخی موارد، به دلیل ناپایداری ژنتیکی و تولید کم متابولیت ثانویه در کشت‌های سلولی، استفاده از کشت ریشه موئین به دلیل رشد سریع و پایداری ژنتیکی و ظرفیت بیوسنتزی بالا، یک راه حل جدید برای افزایش تولید متابولیت ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. کشت ریشه‌های تراریخته حاصل از آگروباکتریوم

رایج‌ترین از مهمترین این سیستم‌ها می‌باشد (Karuppusamy, 2009). مهمترین عامل محدود کننده در تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای محتوای غیراقتصادی این ترکیبات به دلیل زیست‌توده پایین گیاهی و محتوای خود متابولیت می‌باشد. تلاش‌های زیادی برای افزایش زیست‌توده گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است (Gangopadhyay et al., 2008). عوامل محیطی یکی از عوامل تعیین‌کننده در تولید متابولیت ثانویه گیاهان می‌باشد (Zhang et al., 2011). عواملی از قبیل نور، گونه گیاه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، فاکتورهای تغذیه‌ای، پیش‌ماده بیوسنتز و محرک بر افزایش و انباشت متابولیت ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای تأثیر می‌گذارند (Shahzad et al., 2015). بهینه‌سازی شرایط درون شیشه‌ای برای افزایش زیست‌توده ریشه و کمیت متابولیت‌های ثانویه در ریشه می‌تواند یک گام مؤثر در این زمینه باشد (Delaunois et al., 2013).

به دلیل اهمیت اقتصادی مواد ثانویه، بدست آوردن آنها با کمیت و کیفیت بالا، استفاده از سیستم درون شیشه‌ای به عنوان یک راهبردی مؤثر مطرح می‌شود که می‌تواند جایگزین روش‌های دیگر شود (Biçer et al., 2017). استخراج این گونه ترکیبات از گیاهان کشت شده در طبیعت تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی متغیر می‌باشد، از این لحاظ توسعه روش‌های مبتنی بر کشت درون شیشه‌ای به دلیل عدم تأثیرپذیری آنها از محیط، یک راهکار جایگزین مناسب‌تری در تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Vijaya Sree et al., 2010). آنتراکینون موجود در روناس به دلیل خواص ضد میکروبی و ارزش اقتصادی بالا مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است، در نتیجه باتوجه به ارزش بالای این ماده و تولید آن در این‌ویترو، بررسی اثر ریزنمونه و سویه باکتری در القای ریشه موئین و محتوای آنتراکینون آن، به عنوان یک منبع مهم در تولید این ترکیبات، مورد مطالعه قرار گرفت (Dorani et al., 2023). در این مقاله اثر غلظت ساکارز و عوامل القاکننده زیستی و غیر زیستی مختلف در افزایش بیوماس ریشه و انباشت این متابولیت ثانویه در

ریشه‌های مویین گزارش می‌گردد.

مواد و روش‌ها

بذرهای رقم بومی گیاه روناس از مرکز تحقیقات کشاورزی یزد تهیه و برای انجام آزمایش به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه تبریز منتقل شدند. بذرها با آب مقطر استریل به مدت ۱۵ دقیقه، سپس با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه و در مرحله بعدی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، زیر هود ضد عفونی شدند، سپس بذرها سه بار با آب استریل شستشو گردیدند. برای کشت درون شیشه‌ای از محیط کشت پایه (Murashig and MS (schoogh, 1965 جامد با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر میواینوزیتول استفاده شد. بذرها بعد از کشت در این محیط، برای نگهداری و جوانه زنی، به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند (Perassolo et al., 2020).

کشت آگروباکتریوم برای القای ریشه مویین

برای تراریختی و تولید ریشه مویین براساس آزمایش اولیه (Dorani et al., 2023)، برای القایی ریشه مویین از ریزنمونه برگی و سوبه باکتری ۱۵۸۳۴ آگروباکتریوم رایزوزنز موجود در آزمایشگاه زیست فناوری به روش Lee و همکاران (۱۹۹۹) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا یک کشت جامد از باکتری بر روی محیط کشت جامد LB حاوی ۲۵ میلی گرم در لیتر ریفامپسین تهیه شد. سپس درون انکوباتور و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد، تا تک کلون‌ها رشد کردند. برای تهیه آگروباکتریوم رایزوزنز برای تلقیح، یک تک کلون از کشت باکتری برداشته شد و درون محیط ۲۵ میلی لیتر LB مایع حاوی ریفامپسین کشت گردید و کشت‌ها به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شد تا زمانی که غلظت رشد باکتری به $OD_{600} = 0.7$ رسید. سپس کشت باکتری به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ

شد تا باکتری رسوب کرد. قسمت بالایی پلیت باکتری در زیر هود در شرایط استریل خالی شد و در ۲۵ میلی لیتر محیط MS مایع حل گردید و بلافاصله برای تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی استفاده شد.

تهیه ریزنمونه برای تلقیح با آگروباکتریوم رایزوزنز ریزنمونه‌های برگ در ابعاد ۰/۵ در ۰/۵ سانتی متر از گیاهچه‌های سه تا چهار هفته‌ای تهیه شدند. محلول باکتری تهیه شده به ریزنمونه برگ اضافه شد و ریزنمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول باکتری غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌ها از محلول باکتری خارج و بر روی کاغذ واتمن استریل رطوبت‌گیری شد. ریزنمونه‌ها برای هم‌کشتی به مدت ۴۸ ساعت به محیط کشت پایه MS جامد بدون آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. بعد از ۴۸ ساعت هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل گردیدند. ریزنمونه‌ها به مدت ۴۵ روز در این محیط کشت نگهداری شدند. در این مدت ریشه‌های مویین ظاهر شد و بعد از رشد به اندازه کافی برای انتقال به محیط کشت مایع (۲- ۱/۵ سانتی متر) رشد کردند.

ارزیابی مولکولی ریشه مویین

استخراج DNA از ریشه‌های مویین به روش Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳) انجام شد (Dellaporta et al, 1983). برای تأیید مولکولی ریشه‌های مویین، از روش PCR بر روی DNA ژنومی ریشه‌های مویین برای تکثیر بخشی از ژن *rolA* به طور اختصاصی استفاده شد. بدین منظور، از الیگونوکلوتهیدهای آغازگر اختصاصی ژن *rolA* (5'-ACGGTGAGTGTGGTTGTAGG-3' و *rolA* R (5'-GCCACGTGCGTATTAATCCC-3') استفاده شد. برای مشاهده و بررسی محصولات تکثیر شده، از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۸۵ ولت استفاده شد و رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام گردید.

واکشت ریشه‌های مویین درون محیط MS مایع

یکی از بهترین ریشه‌های القا شده براساس رشد تقریبی (بیشترین طول تقریبی در مدت ۴۵ روز از زمان تلقیح) با رشد ظاهری خوب انتخاب و در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع بدون هورمون کشت شدند. بعد از سی روز نیم گرم از این ریشه به شش تیمار جدید محیط کشت مایع شامل محیط پایه MS و MS 1/2 در ترکیب با سه غلظت مختلف ساکارز (۳۰، ۴۵، ۶۰ گرم در لیتر) محیط کشت منتقل شدند. نمونه‌ها به انکوباتور شیکردار با سرعت ۶۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ هفته منتقل گردیدند. هر تیمار سه بار تکرار شد. پس از یک ماه، ریشه‌های رشدکرده توزین شدند.

مطالعه اثر محرک‌های مختلف بر محتوای آنتراکینون ریشه مویین

به منظور مطالعه تأثیر محرک‌های مختلف بر میزان تولید آنتراکینون، بهترین تیمار تولید زیست‌توده ریشه از آزمایش اول انتخاب و در این محیط کشت اثر دو غلظت مختلف از محرک‌های کیتوزان، نیترات نقره، جیبرلیک اسید، نفتالین استیک اسید و پرولین در افزایش محتوای آنتراکینون ریشه مویین روناس و بدون الیستور در تاریکی در ۳ تکرار در قالب آزمایش‌های فاکتوریل براساس طرح کاملاً تصادفی مطالعه شد. از کشت ریشه در محیط پایه بدون الیستور و در روشنایی به عنوان شاهد استفاده شد.

تهیه محرک‌ها

محرک کیتوزان به صورت یک درصد وزن حجمی تهیه شد. برای تهیه این محرک، ابتدا یک گرم از کیتوزان ساخت شرکت Sigma توزین و بعد دو میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک (HCl) به صورت قطره قطره اضافه شد تا کیتوزان حل شود، سپس با استفاده از آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت pH آن با استفاده از HCl و NaOH بر روی ۵/۷ تنظیم شده و برای استریل شدن اتوکلاو شد.

محرک‌های نیترات نقره، جیبرلیک اسید، پرولین و دی اکسید تیتانیوم به صورت محلول‌های ذخیره ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و در شرایط استریل با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرونی فیلتر شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای این مطالعه نیم گرم از ریشه مویین از ریشه‌های تکثیر شده برداشت و به یک ارلن صد میلی‌لیتری حاوی بیست میلی‌لیتر محیط کشت مایع منتقل شد. نمونه‌های کشت شده روی شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا رشد کنند. بعد از یک ماه هریک از محرک‌ها (دی اکسید تیتانیوم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، نیترات نقره ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، پرولین ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اسید جیبرلیک ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به محیط اضافه شدند. بعد از گذشت ۲ روز از افزودن محرک‌ها ریشه‌های مویین برداشت شده و با آب مقطر شستشو گردیدند. ریشه‌های مویین برای خشک شدن درون فویل آلومینیومی قرار داده شده و درون آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند (Perassolo et al., 2020).

استخراج آلیزارین به عنوان یک آنتراکینون شاخص و اندازه‌گیری مقدار آن

برای هریک از تیمارها، ۰/۱ گرم ریشه مویین خشک شده به روش ذکرشده وزن شد و در هاون چینی به پودر تبدیل گردید. پودر ریشه مویین تهیه شده با ۱۰ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد و ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک پنج نرمال، مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد. در نهایت، از محلول بدست آمده برای اندازه‌گیری غلظت آنتراکینون با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۵۵ نانومتر استفاده شد (Lee et al, 1999). برای تبدیل میزان جذب نوری محلول‌ها به غلظت آنتراکینون، ابتدا با

زرد مایل به قهوه‌ای روشن و دارای بافتی نرم‌تر بودند. همچنین ریشه‌های مویین توسعه یافته ابتدا دارای فنوتیپی مانند ریشه معمولی بودند. اما ریشه معمولی پس از ۱۸ روز نه تنها رشدی نکردند، بلکه بافت ریشه‌ها شروع به له شدن کردند.

تأیید مولکولی تراریختگی ریشه‌های مویین

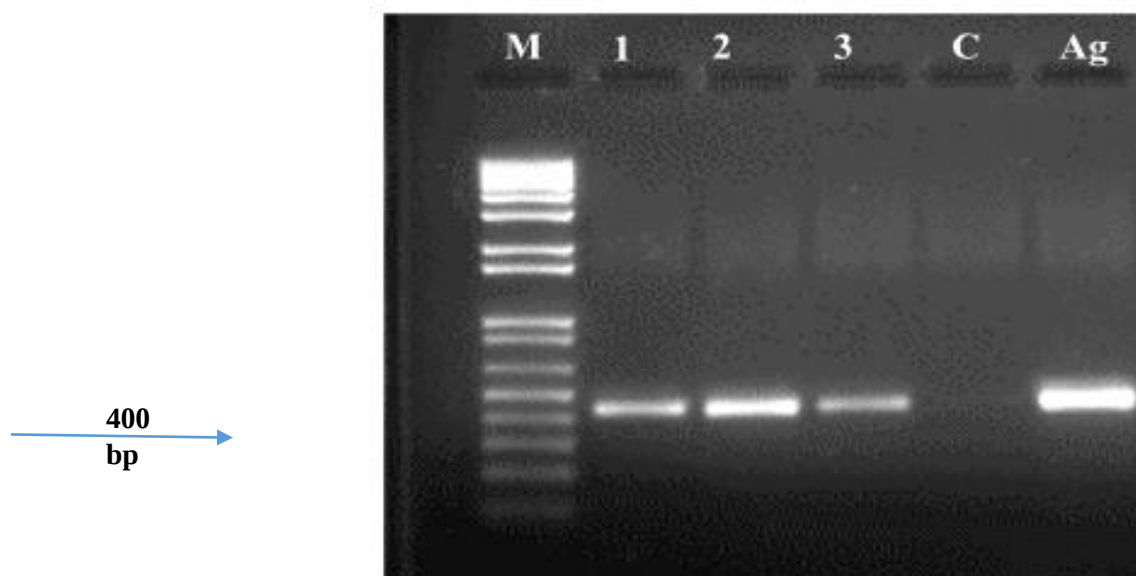
اگرچه رشد سریع با تولید انشعابات فراوان در محیط کشت فاقد هورمون، معرف ریشه‌های مویین مورد مطالعه بود. با این حال، بررسی ماهیت تراریخته توسط آنها با روش PCR برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rolA* با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی انجام شد (شکل ۱). با توجه به نتایج به دست آمده، نمونه‌های ریشه مویین که به تصادف از بین ریشه‌های مویین انتخاب شده بودند با نمونه پلاسمید (شاهد مثبت)، یک نوار مورد انتظار در ناحیه ۴۰۰ جفت بازی را نشان داد. در صورتی که در گیاه غیر تراریخته و در واکنشی که از آب به جای DNA استفاده شد، به عنوان شاهد منفی گرفتند و هیچ تکثیری مشاهده نشد.

استفاده از غلظت‌های مختلف آلیزارین خالص شده از شرکت Merck، منحنی استاندارد برای پنج غلظت مختلف آن رسم شد و با استفاده از معادله $y = ax + b$ کلیه اعداد جذب نوری تبدیل به غلظت شد. از ریشه‌های یک ماهه بدست آمده از کشت درون‌شیشه‌ای بذره‌های روناس نیز به عنوان شاهد استفاده شد.

نتایج

القای ریشه مویین در گیاه روناس

ریزنمونه‌های برگ گیاه روناس ۸-۱۲ روز پس از تلقیح با آگروباکتریوم رایزوژنز، در محیط کشت پایه MS ساده حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم شروع به تولید ریشه مویین کردند. ریشه‌های مویین بدست آمده شروع به رشد کردند و تقریباً به پتری‌دیش را پوشاندند. این ریشه‌ها دارای بافتی نرم بودند. پس از انتقال ریشه‌های مویین به محیط مایع آنها شروع به رشد سریع از طریق انشعابات جانبی فراوان و افزایش طول انشعابات کردند. به‌طوری‌که در پایان هفته سوم کل حجم محیط که یک‌سوم ظروف کشت بود، پر کردند (شکل ۲). ریشه‌های توسعه یافته توسط این سویه، به رنگ زرد تا



شکل ۱- نتایج PCR تأیید تراریختگی محصول روناس؛ M: مارکر مولکولی 1kb، ۱-۳: ریشه‌های مویین تراریخته، C: ریشه طبیعی گیاه (غیرتراریخته) و Ag: پلاسمید آگروباکتریوم رایزوژنز

Figure 1. PCR results confirming transgenic of *Rubia tinctorum* product; M: molecular marker (1kb), 1-3: transgenic hairy roots, C: natural plant root (non-transgenic), and Ag: *Agrobacterium rhizogenes* plasmid

بررسی اثر غلظت محیط پایه و غلظت‌های مختلف ساکارز بر روی افزایش زیست‌توده ریشه موئین به منظور مشاهده تأثیر محیط و ساکارز بر روی افزایش زیست‌توده ریشه موئین، ریشه‌های موئین تولید شده مورد

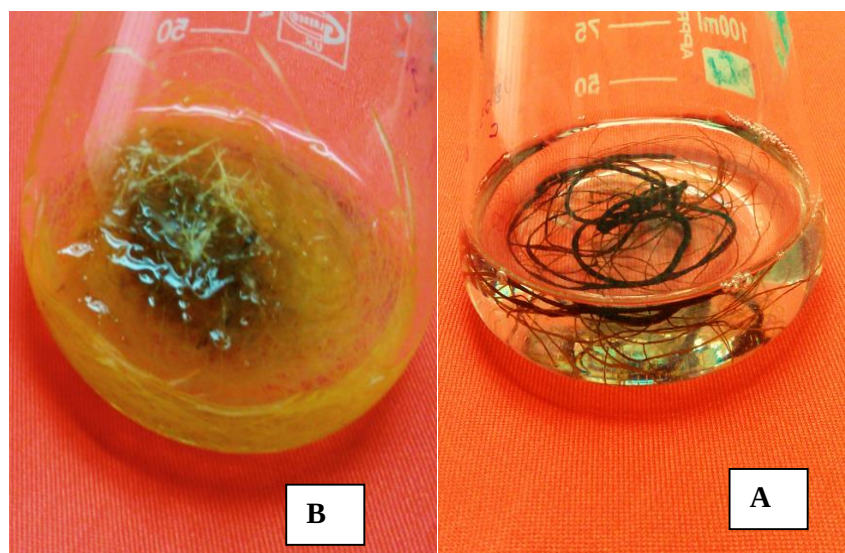
استفاده قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل ساکارز و محیط کشت پایه و اثر ساکارز برای میزان زیست‌توده ریشه موئین در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر محیط پایه کشت درون شیشه‌ای و ساکارز بر زیست‌توده ریشه موئین روناس

Table 1. ANOVA of basal *in vitro* culture medium and sucrose effects on *Rubia tinctorum* hairy roots biomass

S.O.V.	d.f.	M.S.
		Hairy roots biomass
Medium (M)	1	0.46 ^{n.s.}
Sucrose (S)	2	3*
M × S	2	4*
Experimental error	12	0.49
C.V. (%)	1.2	

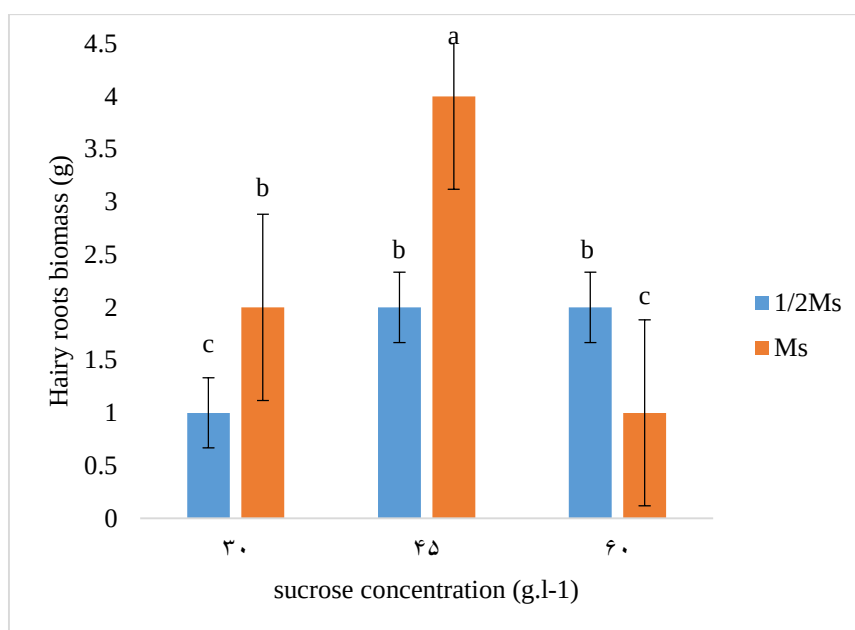
^{n.s.} and *: non-significant and significant at 5% probability level, respectively.



شکل ۲- A) ریشه موئین تراریخته و B) فنوتیپ ریشه غیرتراریخت (شاهد) روناس رشد کرده در محیط کشت 1/2MS حاوی ۴۵ گرم ساکارز
Figure 2. A) Hairy roots and B) non-transgenic (control) roots phenotype in *Rubia tinctorum* grown in 1/2MS containing 45 g sucrose

تولید زیست‌توده ریشه موئین در محیط نصف MS حاوی ۴۵ گرم در لیتر ساکارز نسبت به دیگر محیط‌های مورد آزمایش بالاتر بود، همچنین ریشه موئین بدست آمده از این محیط دارای بافتی نرم‌تر نسبت به ریشه موئین بقیه محیط‌ها بود. اما افزایش زیست‌توده در محیط‌های کشت پایه MS حاوی ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز و در محیط کشت پایه 1/2 MS شامل ۳۰ گرم در لیتر ساکارز افزایش

زیست‌توده متوسط و نزدیکی را نسبت به همدیگر از خود نشان دادند. در محیط‌های کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و نصف MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز زیست‌توده ریشه کمتری بود اما افزایش زیست‌توده ریشه طبیعی گیاه چندان قابل توجه نبود، همچنین دارای بافتی خشک و تیره‌تر نسبت به بقیه کشت‌ها بود (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط پایه کشت درون شیشه‌ای × ساکارز بر زیست توده ریشه موین روناس

Figure 3. Means comparison of basal *in vitro* culture medium × sucrose interaction on *Rubia tinctorum* hairy roots biomass. Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

نیترا ت نقره، جیبرلیک اسید، نفتالین استیک اسید و پرولین هریک با ۲ غلظت متفاوت استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف برای میزان آلizarin ریشه‌ها نشان داد که اثر تیمار در میزان ماده ثانویه گیاه (آلizarin) در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار شد.

اثر محرک‌های مختلف بر افزایش محتوای آنتراکینون ریشه موین به منظور مشاهده تأثیر محرک‌های مختلف بر میزان تولید آنتراکینون آزمایش دوم با انتخاب بهترین تیمارهای حاصل از آزمایش اول انجام شد. برای این منظور، محرک‌های کیتوزان،

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر محیط پایه کشت درون شیشه‌ای و ساکارز بر میزان آلizarin ریشه‌ها

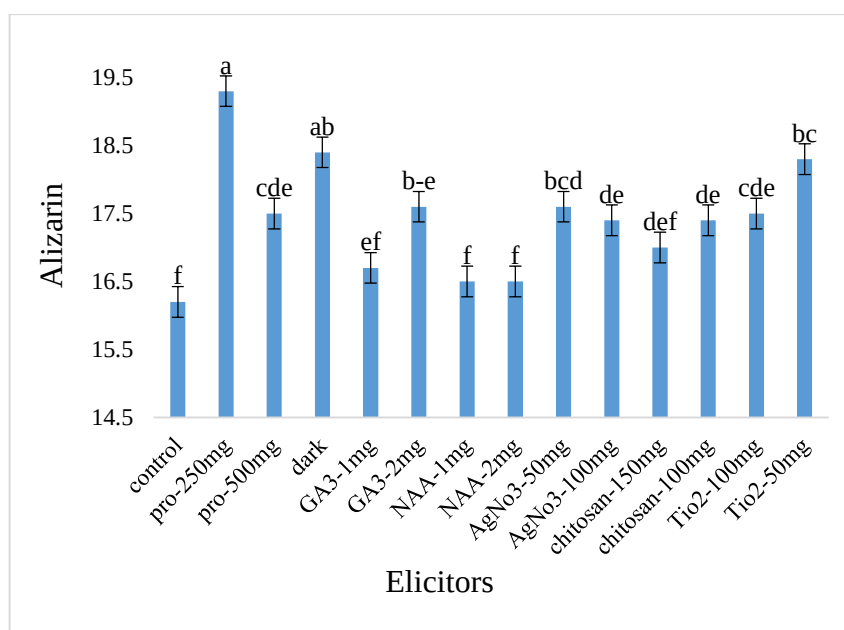
Table 2. ANOVA of basal *in vitro* culture medium and sucrose effects on the amount of alizarin in the roots

Source	Df	Mean Square
Treatment	13	2.013**
Error	28	0.199**
Coefficient of variation	% 2.56	

**Significance at the 1% probability level

۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دی اکسید تیتانیوم، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترا ت نقره، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و ۱ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید به ترتیب در رده‌های بعدی قرار داشتند. اما در این میان محرک‌های نفتالین استیک اسید در دو سطوح مختلف تفاوت قابل توجهی در تولید الیزارین نسبت به شاهد از خود نشان ندادند.

انباشت ماده ثانویه آلizarin در محیط حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین افزایش چشمگیری نسبت به بقیه محرک‌ها و شاهد (ریشه موین بدون الیستور) از خود نشان داد و به دنبال آن محرک‌های تاریکی و دی اکسید تیتانیوم هم با اندک تفاوتی انباشت بالاتری از این ماده را نشان دادند و الیستورهای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترا ت نقره، ۲ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید،



شکل ۴- مقایسه میانگین ماده ثانویه (آلیزارین)، تحت تیمارهای مختلف از محرکهای مختلف

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در بین تیمارهاست.

Figure 4. Comparison of the average secondary substance (alizarin), under different treatments of different elicitors. Similar letters indicate no significant difference between treatments.

بحث

در حالت کلی میزان رشد کشت‌های ریشه موین به ۲ پارامتر فیزیولوژیکی گسترش خطی نوک ریشه و شکل‌گیری نمایی ریشه‌های جانبی بستگی دارد. بنابراین منحنی رشد ریشه‌های موین با فاز تأخیری کوتاه مشخص می‌شود و به دنبال آن نمایی از زیست‌توده افزایش می‌یابد (Mishra & Ranjan, 2008). همچنین محیط رشد در القای ریشه موین تأثیر معنی‌داری دارد. محیط‌های کم نمک مانند B5 (Vaedi et al., 2020)، در رشد ریشه موین بعضی گیاهان حائز اهمیت است.

میزان ساکارز محیط کشت بر رشد و عملکرد کل زیست‌توده ریشه اثر معنی‌داری می‌گذارد (Cui et al., 2010). با توجه به اینکه در ریشه‌های موین منبع سلول‌های جدید در نوک ریشه است. چنین الگوی رشد باعث حفظ تجمع مداوم زیست‌توده در سطح بهینه می‌شود. در این میان استفاده از کربوهیدرات‌های به صورت جداگانه یا به صورت

ترکیبی در حالی که سطح کرین موجود در آن ثابت نگه داشته شود منجر به افزایش تولید زیست‌توده و عملکرد آن می‌شود (Praveen & Murthy, 2012). براساس آزمایشی که بر روی گیاه *Polygonum multiflorum Thunb* به منظور بررسی افزایش آنتراکینون و زیست‌توده ریشه موین انجام شد بیشترین تجمع زیست‌توده در محیط کشت پایه MS به همراه ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز بدست آمد که نتایج ما در ریشه گیاه روناس بر خلاف نتایج بدست آمده از آن آزمایش بود (Thiruvengadam et al., 2014). در دیگر تحقیق بعمل آمده روی گیاه *Withania somnifera* به منظور بررسی افزایش متابولیت ثانویه و افزایش زیست‌توده ریشه موین گیاه، نتایج بدست آمده نشان داد که ساکارز ۵ درصد برای بیشترین تولید متابولیت ثانویه و ساکارز ۲ درصد برای تولید بیشترین مقدار زیست‌توده مناسب بود (Sivanandhan et al., 2013). این موضوع می‌تواند به دلیل پاسخ متفاوت گونه‌های مختلف به حضور منبع غذایی

بیرونی برای رشد و تولید باشد.

در گیاه *Plumbago indica* بیشترین میزان زیست توده در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ درصد ساکارز بدست آمد، در حالی که بالاترین میزان متابولیت ثانویه در محیط MS حاوی ۳ درصد ساکارز و در شرایط نور حاصل شد (Gangopadhyay et al., 2008).

Sivanandhan و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که ترکیب‌های محیط کشت پایه با ساکارز ۴ درصد بعد از ۴۰ روز اثر معنی‌داری بر تجمع ریشه موئین در گیاه *Withania Somnifera* داشت (Sivanandhan et al., 2012). در آزمایش انجام شده روی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) اثر منبع کربن مختلف (ساکارز، گلوکز، فروکتوز) در افزایش زیست توده ریشه موئین ارزیابی شده و نتایج حاصل نشان داد که ساکارز به عنوان بهترین منبع کربن برای تولید زیست توده ریشه بود (Jung, et al., 1992). Vergara-Martínez و همکارانش (۲۰۲۱) در پژوهشی که انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که محیط MSB5 با ۴۵ گرم در لیتر ساکارز، بیشترین تجمع را در زیست توده ریشه موئین *Lepechinia caulescens* داشت (Vergara-Martínez et al., 2021).

نتایج تحقیقات در گیاه *Ocimum basilicum* L که گیاه دارویی ارزشمند با طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه می‌باشد، نشان داد که محیط تکمیل شده با ۲ درصد ساکارز نتایج بهتری نسبت به استفاده از ۳، ۴ و ۵ درصد ساکارز در تولید ریشه‌های موئی داشت (Karataş, 2023).

به طور کلی ثبات ژنتیکی کشت‌های ریشه موئین یک مزیت عمده برای تولید ترکیبات ثانویه خاص ریشه است (Roychowdhury et al., 2017). رشد سریع ریشه‌های موئین از نظر پایداری ژنتیکی بی‌نظیر می‌باشد و از رشد سریع آنها می‌توان به عنوان منبع مداوم برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش استفاده کرد (Pirian et al., 2012).

افزایش متابولیت‌های ثانویه توسط محرک‌ها یکی از معدود راهبردهایی است که اخیراً کاربرد تجاری پیدا کرده

است. محرک‌ها ترکیب‌هایی با منشأ بیولوژیکی و غیربیولوژیکی هستند که وقتی در تماس با سلول‌های گیاهان عالی قرار می‌گیرند باعث افزایش تولید رنگدانه‌ها، فلاون‌ها، فیتوالکسین‌ها و سایر ترکیبات مرتبط با دفاع می‌شوند (Abeed et al., 2021).

ترکیب نامناسب محیط کشت و محرک و غلظت نامناسب محرک می‌تواند باعث تولید ناکارآمد ترکیبات ثانویه شود، به عنوان مثال، مسیر فنیل پروپانوئید (PP) در کشت‌های وانیلا پلانیفولیا *Vanilla planifolia* توسط عصاره مخمر القا نشد (Funk & Brodelius, 1992). در آزمایشی برای تحریک سیلی‌مارین در گیاه خارمریم از دو ترکیب عصاره مخمر و متیل جاسمونات استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که متابولیک خارمریم تحت تأثیر قرار گرفت و باعث افزایش تولید سیلی‌مارین در کشت سوسپانسیون سلولی شد (Santis & Moresi, 2007).

در مطالعه دیگری بر روی *Calendula officinalis* L. اثر محرک‌های مختلف بر روی کشت‌های ۵ روزه به مدت ۲۴ ساعت بررسی شد و نتایج نشان داد که در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر متیل جاسمونات، محتوای سلولی اولئیک اسید (OA) به حداکثر خود رسید. کیتوزان باعث افزایش ۵ برابری این ماده و عصاره مخمر با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری با شاهد را از خود نشان نداد و قارچ *Trichoderma viride* موجب افزایش ۱/۸ برابری محتوای این ماده شد (Wiktorowska et al., 2010). Kahila و همکاران (۲۰۱۸) اثر دی اکسید تیتانیوم در دو سطح مختلف بر روی تولید تیموکینون در گیاه *Black Cumin* را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که ۱۰۰ میلی گرم در لیتر دی اکسید تیتانیوم نسبت به ۵۰ میلی گرم در لیتر از این ماده افزایش بیشتری از ماده ثانویه را به دنبال داشت (Kahila et al., 2018).

البته نوع ترکیبات زیستی و غیر زیستی محیطی هم می‌تواند بر روی افزایش متابولیت ثانویه گیاهی مؤثر باشد. گزارش شده که نوع ترکیبات زیستی و غیرزیستی مورد استفاده اثر معنی‌داری بر افزایش ماده مؤثره گیاه *Psoralea*

Silva-Santos و همکاران (۲۰۲۳) در پژوهشی که روی *Lippia alba* انجام دادند، مشاهده کردند که کاربرد محرک‌ها به‌ویژه ۲ میلی‌مول متیل جاسمونات و ۴ میلی‌مول اسید سالیسیک، ظرفیت تعدیل پاسخ‌های فیزیولوژیکی و تحریک متابولیسم ثانویه و تولید مولکول‌های خاصی مانند مونوترپن‌ها، سسکوئین‌ترین‌ها و فیل پروپانویدها را دارد (Silva-Santos et al., 2023).

هدف از این مطالعه، القای ریشه‌های موئین توسط سویه‌های مختلف باکتری اگروباکتریوم رایزوترز و بررسی عوامل مؤثر در عملکرد ریشه و اثر نوع محرک بر محتوای آنتراکینون ریشه موئین روناس بود. داده‌های حاصل از این تحقیق نشان داد زیست‌توده ریشه موئین در محیط نصف MS حاوی ۴۵ گرم در لیتر ساکارز نسبت به دیگر محیط‌های مورد آزمایش بالاتر بود. انباشت ماده ثانویه در محیط حاوی محرک پرولین ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش چشمگیری نسبت به بقیه محرک‌ها و شاهد (ریشه موئین بدون محرک) از خود نشان داد و به دنبال آن محرک‌های تاریکی و دی اکسید تیتانیوم هم با اندک تفاوتی انباشت بالاتری از این ماده را نشان دادند.

corylifolia L. داشت (Ahmed & Baig, 2014). محرک‌های قارچی (*Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*)، عصاره مخمر و کیتوزان با غلظت‌های مختلف بر تجمع ماده ثانویه افزایش چند برابری را نسبت به شاهد داشت. از بین محرک‌های قارچی (*Aspergillus niger*)، *Bacillus subtilis* و باکتریایی (*Rhizopus oryzae*)، عصاره مخمر و کیتوزان برای انباشت متابولیت ثانویه در گیاه *Plumbago rosea* L. سلول‌های تیمار شده با کیتوزان، افزایش ۷ برابری در تولید ماده ثانویه اسکوپولامین و محرک‌های مخمر و قارچی هم افزایش ۲ برابری را نسبت به شاهد از خود نشان دادند (Komaraiah et al., 2005).

در تحقیق انجام شده روی کشت سلولی گیاه *Brugmansia candida*، اضافه کردن اسید سالیسیک به محیط کشت باعث افزایش ۲-۱۲ برابری در تولید آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین و AgNO_3 باعث افزایش ۳ برابری اسکوپولامین و افزایش ۵-۸ برابر هر دو آلکالوئید، عصاره مخمر افزایش ۳ برابری هر دو آلکالوئید و افزایش ۷ برابری اسکوپولامین شد ولی CaCl_2 تأثیر کمتری در تجمع هر دو آلکالوئید و CdCl_2 باعث افزایش ۳-۲۴ هر دو آلکالوئید را موجب شد (Pitta-Alvarez et al., 2000).

References

- Abeer, H., Ali, M., Ali, E.F., Majrashi, A. and Eissa, M.A., 2021. Induction of *Catharanthus roseus* secondary metabolites when *Calotropis procera* was used as a bio-stimulant. *Plants*, 10(8): 1623. <https://doi.org/10.3390/plants10081623>
- Ahmed, S. and Baig, M., 2014. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5): 499-504. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.12.008>
- Biçer, P.O., Demirci, T., Aşçı, O.A. and Baydar, N.G., 2017. Effects of methyl jasmonate and caffeic acid applications on secondary metabolite production in madder (*Rubia tinctorum*) root cultures. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3): S508-S512.
- Cui, X.H., Murthy, H.N., Wu, C.H. and Paek, K.Y., 2010. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(1): 7-14. <http://doi.org/10.1007/s11240-010-9747-z>
- Delaunoy, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieu, F., Dorey, S. and Cordelier, S., 2013. Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7): 4837-4846. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-1841-4>
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Derksen, G. and Van Beek, T., 2002. *Rubia tinctorum* L. *Studies in Natural Products Chemistry*, 26: 629-

684. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(02\)80016-3](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(02)80016-3)
- Dorani, E., Honarmand, O. and Valizadeh, M., 2023. Effects of explant type and *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and alizarin production in madder (*Rubia tinctorum* Ardakan). Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 12(2):1-9. <https://doi.org/10.30479/ijgpb.2023.19535.1361>
- Funk, C. and Brodelius, P., 1992. Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. IV. Induction of vanillic acid formation. Plant Physiology, 99(1): 256-262. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.99.1.256>
- Gangopadhyay, M., Sircar, D., Mitra, A. and Bhattacharya, S., 2008. Hairy root culture of *Plumbago indica* as a potential source for plumbagin. Biologia Plantarum, 52(3): 533-537. <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-008-0104-6>
- Jung, K., Kwak, S., Kim, S., Lee, H., Choi, C. and Liu, J., 1992. Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. Biotechnology Letters, 14(8): 695-700. <https://doi.org/10.1007/bf01021645>
- Kahila, M., Najy, A., Rahaie, M. and Mir-Derikvand, M., 2018. Effect of nanoparticle treatment on expression of a key gene involved in thymoquinone biosynthetic pathway in *Nigella sativa* L. Natural Product Research, 32(15): 1858-1862. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1405398>
- Karatas, I., 2023. Optimization of sucrose concentration to promote root proliferation and secondary metabolite accumulation in adventitious root cultures of *Ocimum basilicum*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 59(3): 1-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-023-10341-9>
- Karuppusamy, S., 2009. A review on trends in the production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ, and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research, 3(13): 1222-1239. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000026>
- Komaraiah, P., Kishor, P., Carlsson, M., Magnusson, K. and Mandenius, C., 2005. Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. Plant Science, 168(5): 1337-1344. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.01.017>
- Lee, H., Jin, J.H., Kim, J. and Chung, I., 1999. Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture. Biotechnology and Bioengineering, 4: 300-304. <https://doi.org/10.1007/bf02933757>
- Lee, S., Kim, S., Song, W., Kim, Y., Park, N. and Park, S., 2010. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in *Rubia akane* Nakai. Romanian Biotechnological Letters, 15(4): 5405-5409. <https://rombio.unibuc.ro/wp-content/uploads/2022/05/15-4-6.pdf>
- Mishra, B.N. and Ranjan, R., 2008. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. Biotechnology and Applied Biochemistry, 49(1): 1-10. <http://dx.doi.org/10.1042/BA20070103>
- Murashige, T. and 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>
- Oliveira, M., Negri, G., Salatino, A. and Braga, M., 2007. Detection of anthraquinones and identification of 1, 4-naphthohydroquinone in cell suspension cultures of *Rudaea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg.(Rubiaceae). Brazilian Journal of Botany, 30(1): 167-172. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042007000100017>
- Perassolo, M., Busto, V.D., Minoia, J.M., Cerezo, J., Smith, M.E., Martínez, C.A. and Cardillo, A.B., 2022. Production of anthraquinones by in vitro culture of plant cells and hairy roots from *Rubia tinctorum*: Model for the teaching of bioprocesses in courses of plant tissue culture. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 21(1): 1-11. <https://doi.org/10.24275/rmiq/bio2713>
- Perassolo, M., Cardillo, A.B., Busto, V.D., Rivière, S., Cerezo, J., Giulietti, A.M. and Rodríguez Talou, J., 2020. Elicitation as an essential strategy for enhancing anthraquinone accumulation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum*: 133-152. Srivastava, V., Mehrotra, S. and Mishra, S., (Eds.). Hairy Root Cultures Based Applications: Methods and Protocols. Springer Singapore, 237p. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-15-4055-4_10
- Pirian, K., Piri, K. and 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.
- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C. and Giulietti, A.M., 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme and Microbial Technology, 26: 252-258.
- Praveen, N. and Murthy, H., 2012. Synthesis of withanolide A depends on the carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. Industrial Crops and Products, 35(1):

- 241-243.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.009>
- Roychowdhury, D., Halder, M. and Jha, S., 2017. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation in medicinal plants: Genetic stability in long-term culture: 323-345. Jha, S. (Ed.). Transgenesis and Secondary Metabolism. Springer Cham, 649p. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-28669-3_8
 - Santis, D. and Moresi, M., 2007. Production of alizarin extracts from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties. Industrial Crops and Products, 26(2): 151-162. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.02.002>
 - Shahzad, A., Sharma, S. and Siddiqui, S., 2015. Biotechnological Strategies for the Conservation of Medicinal and Ornamental Climbers. Springer, 506p. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-19288-8>
 - Silva-Santos, L., Neto, L.P., Corte-Real, N., Sperandio, M.V.L., Camara, C.A.G., Moraes, M.M. and Ulisses, C., 2023. Elicitation with methyl jasmonate and salicylic acid increases essential oil production and modulates physiological parameters in *Lippia alba* (Mill) NE Brown (Verbenaceae). Journal of Plant Growth Regulation, 42: 5909-5927. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-023-10976-3>
 - Singh, G., 1999. Elicitation-manipulating and enhancing secondary metabolite production: 101-111. In: Fu, T.J., Singh, G. and Curtis, W.R., (Eds.). Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients. Springer, Boston, MA, 290p. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4753-2_9
 - Singh, R. and Chauhan, S.M.S., 2004. 9,10-Anthraquinones and other biologically active compounds from the genus *Rubia*. Chemistry and Biodiversity, 1(9): 1241-1264. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490088>
 - Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T., Manickavasagam, M. and Ganapathi, A., 2012. Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Industrial Crops and Products, 37(1): 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.022>
 - Sivanandhan, G., Dev, G., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Muthuselvam, M., Selvaraj, N. and Ganapathi, A., 2013. A promising approach to biomass accumulation and withanolides production in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Protoplasma, 250(4): 885-898. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0471-x>
 - Thiruvengadam, M., Praveen, N., Kim, E., Kim, S. and Chung, I., 2014. Production of anthraquinones, phenolic compounds, and biological activities from hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb. Protoplasma, 251(3): 555-566. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0554-3>
 - Vaedi, Z., Rahpeyma, S.A. and Zolala, J., 2020. Optimizing hairy root culture media using salts and vitamin modifications in *Corylus avellana* L. Journal of Nuts, 11(4): 327-338. <https://doi.org/10.22034/jon.2021.1917392.1100>
 - Vanisree, M., Lee, C., Lo, S., Nalawade, S., Lin, C. and Tsay, H., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45(1): 1-22. <https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2004/1/bo1451-01.pdf>
 - Vijaya Sree, N., Udayasri, P., Aswani kumar, Y., Ravi Babu, B., Phani kumar, Y. and Vijay Varma, M., 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. Journal of Natural Products, 3: 112-123. <https://scispace.com/pdf/advancements-in-the-production-of-secondary-metabolites-30ghvszjq3.pdf>
 - Vergara-Martínez, V.M., Estrada-Soto, S.E., Valencia-Díaz, S., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L.M., de Jesús Arellano-García, J. and Perea-Arango, I., 2021. Methyl jasmonate enhances ursolic, oleanolic, and rosmarinic acid production and sucrose-induced biomass accumulation in hairy roots of *Lepechinia caulescens*. PeerJ Journals, 9: 1-18. <http://doi.org/10.7717/peerj.11279>
 - Wiktorowska, E., Długosz, M. and Janiszowska, W., 2010. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. Enzyme and Microbial Technology, 46(1): 14-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.002>
 - Zhang, X., Li, C. and Nan, Z., 2011. Effects of salt and drought stress on alkaloid production in endophyte-infected drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*). Biochemical Systematics and Ecology, 39(4-6): 471-476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2011.06.016>