تشخيص الدايوسجنين المعزول من المزارع النسيجية المهندسة وراثياً لنبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L.

Identification of diosgenin isolated from genetically engineered tissues cultures of *Trigonella foenum-graecum* L.

مثنى محمد ابراهيم　　مزاحم قاسم الملاح*　　عمار عمر الاطرقجي**
كلية التربية / جامعة ديالى
*كلية التربية / جامعة الموصل
** كلية الزراعة والغابات /جامعة الموصل

M. M. Al-Mahdawe　　M. K. Al-Mallah*　　A. O. Al-Attrakchii**
College of Engineering / University of Diyala
* College of Education / University of Mosul
** College of Agriculture and Forestry /University of Mosul

المستخلص

فصل مركب الدايوسجنين ، احد نواتج الايض الثانوية في الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. من مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 وكالسها المشتق تلقائياً فضلا عن فصله من اوراق وجذور النباتات البذرية. اعتمدت نتائج كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء HPLC في تشخيص الدايوسجنين المعزول وتقدير نسبة تواجده البالغة161.8 % في اوراق النباتات البذرية . وتقارب نسبة وجوده في الجذور الشعرية المحولة وراثياً وكالسها اذ سجلت 158.3 و156.5% على التوالي . وعموما تؤشر هذه البيانات ان هذه المزارع المحولة وراثياً تمثل مصادر مستديمة مفضلة للحصول على الدايوسجنين وغيره من النواتج الايضيةالثانوية .

الكلمات المفتاحية : الدايوسجنين ، مهندسة وراثيا

Abstract

Thediosgenin compound was separated, one of the secondary metabolic product in *Trigonella foenum-graecum* L. plants. Hairy roots cultures transformed by *Agrobacterium rhizogenes* R1601, and their spontaneously formed callus contained "diosgenin". High performance liquid chromatography HPLC measurements proved the presence of diosgenin in these cultures that approach 158.3 and 156.5% respectively. It present in leaves of plants produced from seeds at 161.8%. Generally, these data pointed out that transformed tissues are often preferred as a continuous source of diosgenin and perhaps other secondary metabolites.

Ket words: diosgenin, genetically engineered

المقدمة .

تشكل النباتات الطبية المصدر الرئيس للكثير من المواد الطبية والصيدلانية المهمة [1]، بوصفها نواتج أيضية لا يمكن تحضيرها مختبرياً في اغلب الأحيان ، ويتطلب الحصول عليها من مصادرها الطبيعية [2]، فضلا عن صعوبة تحضيرها وكلفتها العالية في حال تصنيعها [3]، وأغلب هذه المركبات هي نواتج أيض ثانوية لها دوراً في تداخل النبات مع البيئة وقد تكون مسؤوله عن التضاد بين نبات وأخر Allelopathy [4].

وتعد نباتات الحلبة Fenugreek *Trigonella foenum-graecum* L. واحدة من أهم النباتات الطبية المعروفة [5]، تنتمي إلى تحت العائلة الفراشية Papilionoideae التي تضم معظم أجناس العائلة البقولية Fabaceae [6]، ويعزى استعمالها الواسع لاحتوائها قسم من النواتج الطبيعية المهمة طبياً كالدايوسجنين المعروف بدوره في السيطرة على ايض الكولسترول وانه المصدر التقليدي للبناء الكيميائي للمركبات الصيدلانية الستيرويدية[7].

توفر التقانات الإحيائية النباتية فرصة توظيف أنظمتها في الحصول على نواتج النبات الصناعية أو الطبية [4]. ويعد استعمال الناقل البكتيري *Agrobacterium rhizogenes* من الأنظمة الكفوءة التي يمكن اعتمادها في أحداث التحول الوراثي الناجح ، إذ تقوم البكتريا بدور الناقل للمعلومات الوراثية المشفرة على بلازميدها [8]، ومنحها إحدى قطعتي T-DNA (T_L و T_R) في بلازميدات Ri المحفزة للجذور (Ri-plasmid) أو كلاهما وتضمينها في الذخيرة الوراثية للخلايا النباتية [9]، مسببة تغاير ايض الاوكسين في النسيج المحول بطريقة تؤدي إلى تغير في التعبير المظهري بتكوين الجذور الشعرية في موقع التلقيح أو مواقع قريبة منها [10]، احدث استعمال مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثيا انقلابا في الحصول على النواتج النباتية الصناعية من هذه الجذور [11]، التي تمتاز بسرعة نموها على أوساط بسيطة وثباتها الوراثي وقصر المدة اللازمة لتضاعفها وسهولة حفظها ، وقابلية إنتاجها طيفاً من المركبات الكيميائية المهمة [12]، فضلا عن ثبات إنتاجيتها العالية ودرجة نقاوة تلك النواتج بالمقارنة مع نواتج مزارع الجذور الاعتيادية التي تتصف ببطء نموها وانخفاض إنتاجها وحاجتها الى أوساط معقدة [13]. تهدف الدراسة الحالية الى معرفة انعكاس التحول الوراثي في مستوى الدايوسجنين.

المواد وطرائق العمل

- **المادة النباتية**

عقمت بذور الصنف المحلي للحلبة *T.foenum-graecum* L. سطحياً بغمرها في محلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl بتركيز 6% بنسبة 1 حجم مادة معقمة الى2 حجم ماء معقم لمدة خمس دقائق ، ومن ثَم غسلت بالماء المعقم ثلاث مرات بمعدل ثلاث دقائق/ مرة لإزالة أثار المادة المعقمة [14]، زرعت البذور المعقمة بوضعها على سطح 30 ملمن وسط MSO [15] الصلب الخالي من منظمات النمو في قنانٍ زجاجية حجم 250 مل وبمعدل خمسة بذور/ قنينة. حفظت العينات في الظلام لمدة ثلاثة أيام, وحين إنباتها نقلت إلى غرفة النمو بدرجة 25± 2ْم وفي نظام الضوء والظلام المتعاقب (16 ساعة ضوء / 8 ساعة ظلام) وشدة إضاءة 2000 لوكس.

- **استحثاث الجذورالشعرية المحولة وراثياً وتكوين مزارعها المشفاة من البكتريا.**

استحثت الجذور الشعرية على البادرات المعقمة بعمرأسبوعين، بحقنها الدقيق ببكتريا *A. rhizogenes* R1601 علائمها الوراثية مقاومة الكانامايسين($Kana.^{Res+}$) والكاربنسيلين ($Carb.^{Res+}$). واستخدم لقاح كثافته الضوئية 1.90، حيث وخزت في موقعين في الثلثا لعلوي للسويقة تحت الفلقية، غرست جميع العينات الملقحة بوضع قائم في 20 مل من وسط[1/2WP [16 الصلب في قنانٍ سعة 100مل وبواقع عينة/ قنينة[6]. حفظت العينات في غرفة النموفي ظروف حرارة 25 ±2 وشدة أضاءه 100 لوكس بمعدل 16 ساعة ضوء يومياً.

ازيلت خصل الجذور الشعرية بطول 1سم المتكونة في مواقع التلقيح ووضعت على سطح 20 مل من وسط 1/2 WPO الصلب المدعم بإضافة 350 ملغم لتر$^{-1}$ من السيفوتاكسيم للتخلص من البكتريا[17],أعيد نقل عينات الجذورالشعرية عدة نقلات متتالية لحين الحصول على مزارع خالية من البكتريا. وادامتهاعلى وسط1/2WPخالٍ من المضاد الحيوي. واجريت اختبارات خلومزارع الجذورالشعرية من البكتريا [18]، والترحيل الكهربائي للكشف عن الاوبينات من نوع الـ Agropine في انسجة الجذور الشعرية والكالس المتكون منها تلقائياً للتأكد من تحولها وراثياً[19].

- **استخلاص وفصل الدايوسجنين**

قدرت مستويات الدايوسجنين في مستخلصات انسجة أوراق وجذورالنباتات البذرية النامية في الحقل قبل مرحلة الأزهار، ومن انسجة الجذور الشعرية وكالسها المحولة وراثيا "المنتجة للاكروبين".جُففت العينات لمدة 48 ساعة في درجةحرارة 60م ومن ثم سحقت باستخدام هاون خزفي. اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل [20]في عزل ستيرويد الدايوسجنين، بنقع غرام واحد من مسحوق العينة الجافة في 30 مل من 4 عياري حامض الكبريتيك المخفف في 70% من كحول الايزوبروبانول Isopropanol لمدة 24 ساعة، رشح المستخلص بوساطة ورق الترشيح Whatman No.1، وينقل الراشح إلى قمع لفصل الدايوسجنين باستخدام Hexane (60مل× 3) لمدة 5 دقائق/مرة، يغسل المستخلص ثلاث مرات بمحلول 5% هيدروكسيد البوتاسيوم 180 مل/مرة، ويغسل بالماء المقطر ثلاث مرات 180 مل/مرة، ويضاف اليه 2.5 غم من مسحوق Na_2SO_4 لسحب الماء المتبقي في المستخلص ، ويرُكز الاخير حتى جفافه تماما بوساطة المبخر الدوار Rotary evaporator (RE-52A) عند 40م، ويذاب الراسب في 10مل من الكلوروفورم. اجريت اختبارات أولية للعينات بهدف الكشف عن وجود الصابونيات باستعمال تفاعل سالوكوسكي[21].

- **التشخيص الكيميائي والنوعي للدايوسجنين بوساطة طيف الاشعة تحت الحمراء IR**

وضعت قطرات من المستخلصات النباتية لكل عينة في خلية جهاز طيف الاشعة تحت الحمراء IR وسجلت الرسوم البيانية لمواقع المجاميع الوظيفية الرئيسة لمركب الدايوسجنين والتي شملت موقع مجموعة -OH الكحولية و C-H=والالكين C=Cوالأيثر C-O-C المتناظرة وغير المتناظرة.

- **التشخيص والتقدير الكمي للدايوسجنين بتقنية الكروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC.**

أجري التشخيص بالاعتماد على زمن الاحتباس Retention time في كل من العينات النباتية والمحلول القياسي للدايوسجنين (الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية في سامراء) بأذابة 0.02ملغم في 10 مل من الكلوروفورم إذابة تامة. وكان الطور الثابتODS-2, طول العامود 250 ملم، القطر الداخلي للعامود 4.6 ملم ، قطر حبيبات الحشوة 5مايكرومتر، أما الطور المتحرك Mobile phase فتكون من 90 % اسيتونتريل و 10% ماء حجم: حجم وبمعدل جريان Flow rate 1.0 مل/دقيقة ، حجم العينة المحقونة20مايكروليتر، وبدرجة حرارة 35م، وعند الطول الموجي 254 نانوميتر[22]. تقدر نسبة تواجد المركب اعتماداً على المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة المئوية للمركب} = \frac{T}{S} \times 100$$

حيث T : تمثل مساحة المنحنى للمركب المعزول من العينات المختبرة.

S : تمثل مساحة المنحني للمركب القياسي (المقارنة)

النتائج والمناقشة

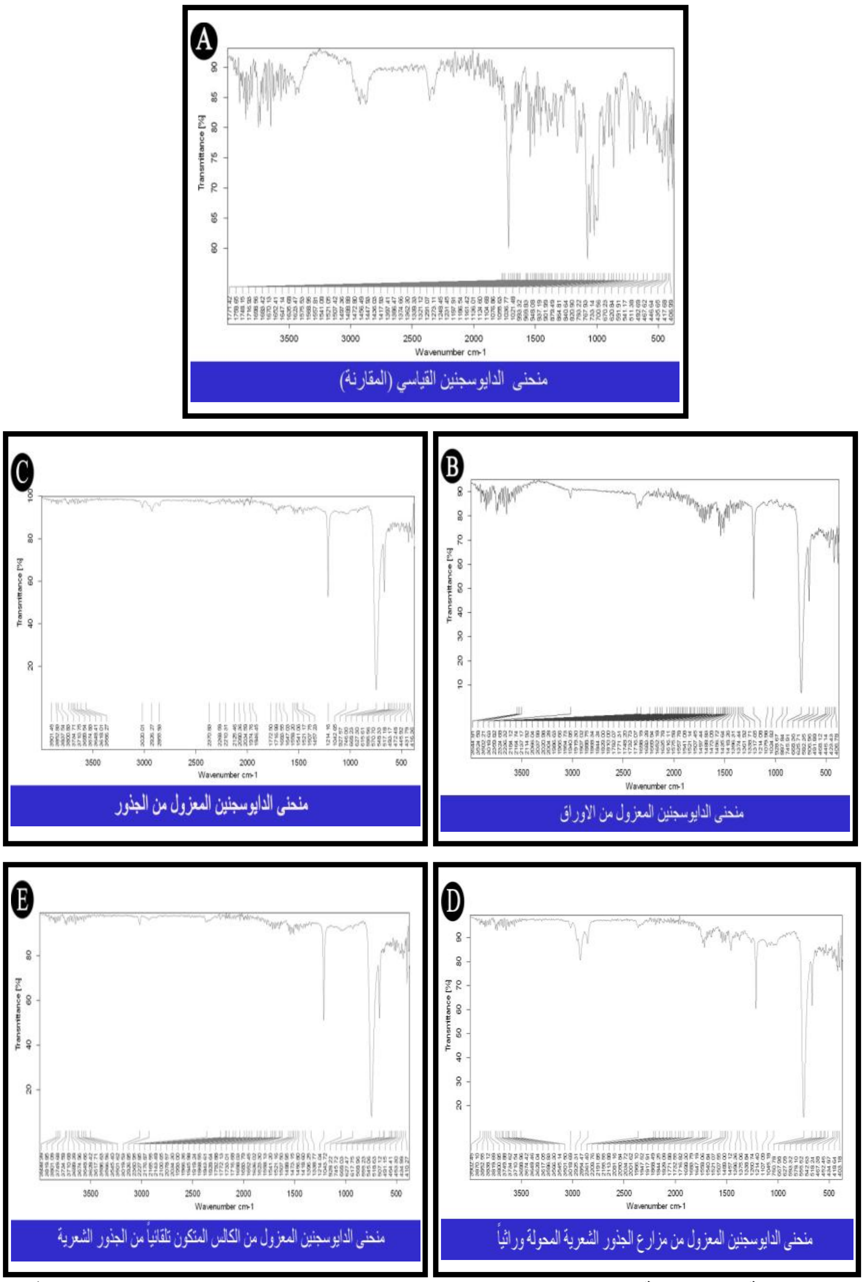
- **عزل الدايوسجنين من مستخلصات الانسجة المحولة وراثيا**

عزلت الستيرويدات الصابونية من المستخلصات ، واتاح الكشف الكيميائي للمادة المعزولة التحقق مبدئياً من الدايوسجنين المعزول بدلالة كشف سالوكوسكيSalkowski الموجب محدثاً لوناً احمر دلالة وجود الستيرويدات الصابونية.

- **التشخيص الكيمياوي والنوعي للدايوسجنين بوساطة IR**

اوضحت قيم طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) وجود المجاميع الرئيسة الفعالة لمركب الدايوسجنين وتقاربها مع قيم هذه المجاميع في منحني الدايوسجنين القياسي. فقد ظهرت حزم الامتصاص عند مدى الترددات 3648.7-3609.4 سم$^{-1}$ مقاربة لتردد الحزمة في العينة القياسية 3649.9 سم$^{-1}$وعائديتها الى تردد مط مجموعة الهيدروكسيل (OH–) الكحولية. وظهور قمة واضحة عند التردد 2925.3-3020.2 سم$^{-1}$ وجود مجموعة (C-H) الاليفاتي المقاربة لتردد العينة القياسية 3008.3 سم$^{-1}$، وحزم للآصرة المزدوجة ضمن الصيغة التركيبية للدايوسجنين متكونة عند المدى 1647.1-1632.8سم$^{-1}$ والمقاربة لتردد مجموعة الالكين (C=C) 1635.6 سم$^{-1}$ في العينة

القياسية. وبينت ترددات مجموعة الايثر (C-O-C) المتناظرة عند التردد 1356.9-1315.4 سم$^{-1}$ وغير المتناظرة عند التردد 926.8-931.6 سم$^{-1}$ تطابقها مع ترددات العينة القياسية مما يدل على ان الدايوسجنين هو الستيرويد المعزول من جميع العينات بدلالة تطابق مواقع امتصاص هذه الاطياف في العينة القياسية شكل (A.1) مع اطياف امتصاص المادة المعزولة من مستخلصات اوراق النباتات البذرية شكل(B. 1),وجذورها الشكل (C. 1)، ومن انسجة الجذور الشعرية المحوّلة وراثياً شكل (D.1) والكالس المشتق تلقائياً منها شكل(E.1).



شكل(1): منحنيات الامتصاصية لطيف الاشعة تحت الحمراء(IR) للدايوسجنين القياسي(A) والمعزول من اوراق(B)وجذور(C) النباتات البذرية والجذور الشعرية المحوّلة وراثياً(D) ببكتريا R1601 *A. rhizogenes* وانسجة الكالس المحوّل وراثيا(E)المشتق من الجذور الشعرية في نباتات الحلبة.*Trigonella foenum-graecum*L.

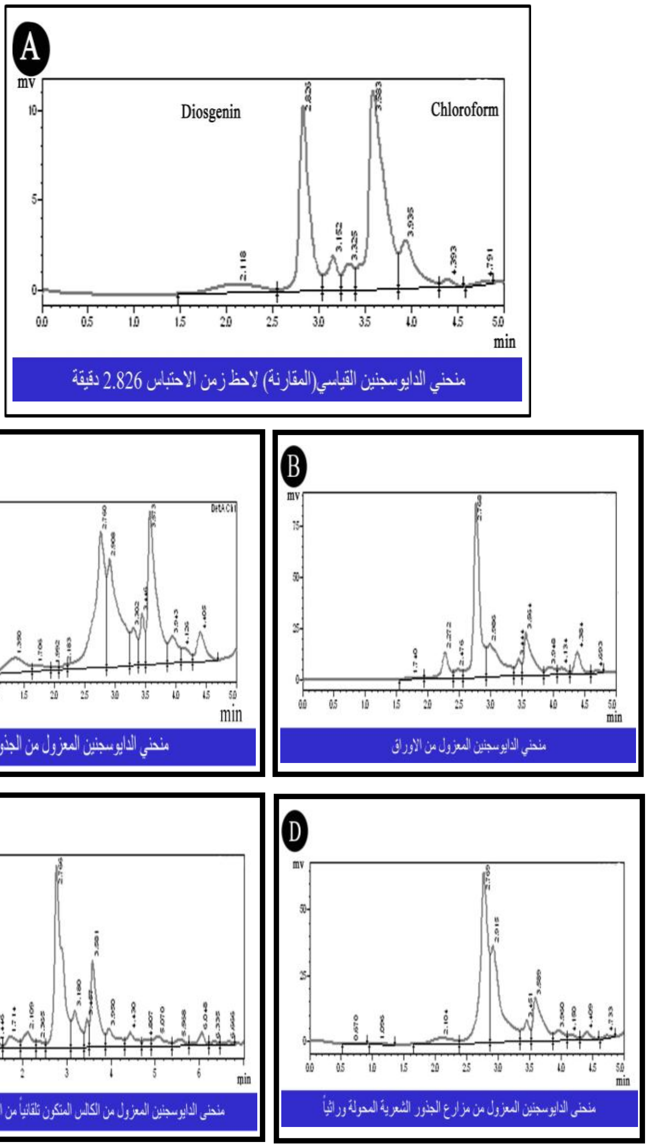
- **تشخيص وتقدير الدايوسجنين الكمي بتقنية HPLC.**

أوضحت المنحنيات المسجلة احتواء اوراق وجذور النباتات البذرية والجذور الشعرية المحولة وراثياً والكالس المشتق منها تلقائياً الدايوسجنين اعتماداً على قيم زمن الاحتباس التي تتراوح بين 2.760-2.769 دقيقة مقاربة قيم زمن احتباس الدايوسجنين القياسية جدول (1)

جدول(1): قيم زمن احتباس الدايوسجنين المعزول ونسب وجوده في اوراق وجذور نباتات الحلبة *Trigonellafoenum-graecum* L.البذرية ، ومزارع الجذورالشعرية المحولة وراثيا ببكتريا*A. rhizogenes* R1601, وكالسهاالمشتق منها.

مصدر الدايوسجنين		زمن الاحتباس (دقيقة)	مساحة المنحني (%)	وجود الدايوسجنين (%)
الدايوسجنين القياسي	المقارنة	2.826	27.109	100
النباتات البذرية	الاوراق	2.768	43.889	161.8
	الجذور	2.760	26.009	95.9
الجذور الشعرية المحّولة وراثياً *A. rhizogenes* R1601		2.769	42.917	158.3
الكالس المحّول وراثياً المشتق تلقائياً من الجذور الشعرية		2.766	42.451	156.5

وكشفت النتائج عن اختلافات واضحة في نسبة مساحة منحني الدايوسجنين القياسي شكل (A.2) مع نسب مساحة المنحنيات المسجلة للدايوسجنين المعزول من اوراق النباتات البذرية مسجلاً ارتفاعاً في نسبة مساحة المنحني شكل (B.2)، بينما لم تختلف الجذور كثيراً في نسبة مساحة منحني الدايوسجنين المعزول منها شكل (C.2) عن مساحة منحني العينة القياسية. واشارت نتائج تقدير نسبة الدايوسجنين في هذه الاجزاء في وجوده بنسبة 161.8 % في الاوراق متفوقاً عن وجودة في الجذور. وتشير منحنيات الدايوسجنين المسجلة من مزارع الجذور الشعرية المحّولة وراثياً شكل (D.2)، وكالسها المتكون تلقائياً منها شكل(E.2)، الى تماثل مزارع الجذور الشعرية المحّولة وراثياً والكالس المتكون منها تلقائياً في نسب وجود للدايوسجنين فيها بنسب قريبة من نسب تواجده في اوراق النباتات البذرية المواقع الرئيسة لتواجده.



شكل(2):منحنيات الدايوسجنين للعينة القياسية (A) والمعزول من اوراق(B) وجذور(C) نباتات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. الناتجة من البذورومن انسجة الجذور الشعرية المحّولة وراثياً(D) وكالسها المتكون تلقائياً(E).

من المعروف احتواء كل من اوراق وجذورالحلبة مستويات متباينة من الدايوسجنين[22]، وفي الدراسة الحالية سجلت اعلى كميات للدايوسجنين في الاوراق ومن ثم في جذورالنباتات البذرية. ,ولوحظ تجسد التلاعب الوراثي بالعائل النباتي وتداخله مع بكتريا *A. Rhizogenes* [23] في استجابة بادرات الحلبة للتلقيح بالبكتريا واستحثاث جذوراً شعرية سالبةً في نموها للانتحاء الارضي" ومنتجةً للاكروبين", أولى علامات التحول الوراثي [13]. التي تبدأ خطواتها بالتصاق البكتريا بخلايا النبات في منطقة الجروح نتيجة تحرير خلاياها مواد فينوليه كالاسيتوسيرنكونAcetosyringone الضرورية لتحفيز مجموعة جينات *Vir genes* المستقرة في بلازميدات Ri خارج قطعة T-DNA، وتساهم منتجاتها في تسهيل حركة T-DNA المنقول وعبوره اغشية وجدر الخلايا واندماجه مع جينوم خلايا النبات المضيف[24]. ويترتب عن هذا حدوث تغيرات فسلجيه ومورفولوجيه نتيجة تعبير الجينات المحمولة في T-DNA بضمنها منطقة Onc الحاوية مجموعة جينات *iaaM* و*iaaH* المسؤولة عن تصنيع الاوكسينات وخاصة IAA، وجين *ipt* gene المسؤول عن تكوين السايتوكاينينات[25]، محدثةً اضطراباً في التنظيم الهرموني للخلايا المحوّلة وراثياً الذي ينعكس في ايضها وانقساماتها واستطالتها وتكوينها هذا النمط من الجذور[26].

ان تماثل نسب وجود الدايوسجنين في مزارع الجذور الشعرية المحّولة وراثياً وكالسهامع نسب تواجده في الاوراق يعبر عن طاقتها في بناء هذه المركبات بمستويات مشابهه لمستويات بنائها في الأعضاء بسبب تمايزها الطبيعي وثباتها وراثياً [27]. وهذا يعزى الى سيطرة الجينات المستقرة في الانسجة المتمايزة على منظومة تشفير الانزيمات اللازمة للبناء الحيوي وتوفير النواقل اللازمة [28]. والى انتقال قطعة T-DNA من بلازميدات Ri واندماجها في جينوم الخلية بشكل عشوائي يترتب عنه اضافة او حذف او اعادة ترتيب تعاقب الوحدات البنائية في الحامض النووي DNA للخلايا المحّولة. وبهذه الطريقة فان قطعة T-DNA المنقولة وحسب موقع ارتباطها قد تسبب تنشيط او كبح بعض الجينات في مسار النواتج الايضية الثانوية [12]، ومن اهم الجينات المستقرة في قطعة T-DNA مجموعة جينات *Onco* genes الحاملة مجاميع جينات *rolA* و *rolB* و *rolC* المعروفة بمسؤوليتها في تنظيم نمو الخلايا وتمايزها عند تعبيرها بشكل جين مفرد او مجموعة جينات، وفي حث بناء النواتج الايضية في الخلايا المحّولة وراثياً في النباتات المختلفة [29].

يمكن الاستنتاج من الدراسة بان مزارع الجذور الشعرية المحّولة وراثياً تمثل مفاعلات حيوية صغيرة مرغوبة لإنتاج المواد الايضية الثانوية خصوصاً الصيدلانية منها ، بسبب معدلات نموها السريعة ، وسهولة زراعتها ونموها في الاوساط الخالية من منظمات النمو وامكانية التلاعب الجيني بها. والاكثر اهمية قدرتها في بناء بعض المواد الايضية التي لا يمكن إنتاجها في الخلايا غير المتمايزة.

المصادر

1. Giri, A. and Narasu, M.L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotech. Adv. 18:1-22.
2. Sarin, R. (2005). Useful metabolites from plant tissue cultures. Biotech. 4: 79-93.
3. Dixon, R. A. (1985). Plant Cell Culture A practical Approach. IRL Press. Oxford. U. K.
4. Sauerwein, M., K. Yoshimatsu and K. Shimomura. (1992). Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. Plant Tiss. Cult. Lett. 9:1-9.
5. Lust, J. B. (1986).The Herb Book. Bantam Books Inc., New York.
6. Merkli, A., P. Christen and I. Kapetanidis. (1997). Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. Plant Cell Repts. 16:632-636.
7. Roman, I.D., A. Thewles and R. Coleman. (1995). Fractionation of livers following diosgenin treatment to elevatebinarycholestral. Biochem. Biophys. Acta. 1255:77-81.
8. Stougaard, J. (1999). *Agrobacterium rhizogenes* as a Vector for Transforming Higher Plants. (In: Methods in Molecular Biology.49:49-61.Ed. Jones, H., HungriaPrss. Inc. Totowa N.J.).
9. Gartland, K.M.A. and M.R. Davey. (1995). Methods in Molecular Biology, *Agrobacterium* Protocols. Humana Press, New Jersey, U.S.A.
10. Ramawat, K. G. (2008). Plant Biotechnology. S. Chand and Company Ltd. third edition, New Delhi, India.
11. Vanisree, M., C. Lee, S. Lo, S. M. Nalawade, C. Y. Lin and H.S. Tsay. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Bot. Bull. Acad. Sin. 45:1-22.
12. Alvarez, M.A. (2011). Genetic Transformation. First ed., DraganaManestar, Croatia.
13. Hu, Z. and M. Du. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. J. Integrative Plant Biol. 48: 121-127.
14. ياسين، جاسم محمد . (2000). التحول الوراثي في نباتات الحلبة *Trigonella foenum- graecum* بوساطة بلازميدات Ti و Ri لبكتريا *Agrobacterium*. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.
15. Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
16. Lloyd, G. and B. McCown. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain Laurel, *Kalmia latifolia,* by use of shoot-tip culture. Int. Plant Prop. Soc. Proc. 30:421-427.
17. Al-Mallah, M. K. and Q. Sh. Al-Ne'ma. (2012). Putative genetically modified callus derived from transformed hairy roots induced on sugarbeet*Beta vulgaris* explants by *Acrobacterium rhizogenes* 1601 horbouring Ri-plasmid. Iraqi J. Biotech. 11:455-463.
18. Scott, D. B. and C.W. Ronson. (1982). Identification and mobilization by cointegrate formation of a nodulation plasmid in *Rhizobium trifolii*. J. Bact. 151: 36-43.

19. Tepfer, D.A. and J. Tempe. (1981). Production of di-agropine par des vaccines formees sous I action *Agrobacterium rhizogenes.* Acad. Sci. Paris. Ser.III. 292:212-218.

20. Sauvaire, Y. and J.C. Baccou. (1978). L'obtention de la diosgenine. Problemes de lhydrolyse acid des saponines. Lloydia. 41: 247-256. (Cited in Ortuno et. al., 1998).

21. Gloria, L., I. Lee and A. Kinghorn. (1998). Special Problems with the Extraction of Plant. Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation, edited by Richard J. P. Cannell. 4: 343-363.

22. Ortuno, A., R. Oncina, J.M. Botia and J.A. Del Rio. (1998). Distribution and changes of diosgenin during development of *Trigonella foenum- graecum* plants modulation by benzylaminopurine. Food Chem. 1: 51-54.

23. Offringa, R. and P.J.J. Hooykaas. (1995). Gene Targeting In Plant. Ed. M.A. Vega. CRC. Press, Florida, U.S.A.

24. Bensaddek, L., M.L. Villarreal and M.A. Fliniaux. (2008). Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Elctronic J. Integrative Bio. Sci. 3:1-11.

25. Hooykaas, P.J. and A.R. Schilperoort. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Mol. Bio. 19:15-38.

26. Meyer, A.D., J. Tempe and P. Costantino. (2000). Hairy root: A molecular overview. Plant Microbe Inter. 5: 1-39.

27. Akramian, M., S.M.F. Tabatabaei and M. Mirmasoumi. (2008). Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus*species. American-Eurasian J. Agric. Envir. Sci. 3: 759-763.

28. Margl, L., A. Tei, I. Gyurjan and M. Wink. (2002). GLC and GLC-MS analysis of thiophene derivatives in plants and in *In vitro* cultures of *Tagetespatula* (Asteraceae). Z. Naturforsch. 57:63-71.

29. Bulgakov, V.P. (2008). Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. Biotechnol. Adv. 26: 24-31.