

ISSN: 3041-9638

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

Open Access

Research Article

Improving the production of relative content of terpene compounds through optimization of hairy root induction conditions in the medicinal plant valerian (*Valeriana officinalis* L.)

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

Received: 03 Mar 2026

Accepted: 11 Oct 2026

Published: 11 Oct 2026

Corresponding Author:

Azizollah Kheiry

Email:

kheiry@znu.ac.ir

Keywords:

Agrobacterium, Transformation, Secondary metabolite, Hairy root

Citation:

Biglari Farash, R., Kheiry, A., Ghahremani, Z., Bagheri, Kh., & Razavi, F. (2026). Improving the production of relative content of terpene compounds through optimization of hairy root induction conditions in the medicinal plant valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Journal of Research in Plant Metabolites*, 3(4), 49-61.

Doi:10.22034/jrpsm.2026.577954.1109

Extended Abstract

Background and Objective: Valerian (*Valeriana officinalis* L.) is one of the most important medicinal plants and a valuable source of terpene compounds. Due to limitations in field production and the decline of natural reserves, the use of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* has attracted attention. This research was conducted with the aim of optimizing the conditions for hairy root induction and investigating its effect on growth indices and terpene content.

Materials and Methods: This research was carried out as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications. Treatments included four levels of acetosyringone (0, 100, 150, and 200 mg/L), two levels of *Agrobacterium rhizogenes* strain MSU suspension density based on optical density (OD₆₀₀ = 0.5 and 1), and three co-cultivation times (24, 48, and 72 hours). In vitro leaf explants of valerian were immersed in a bacterial suspension containing acetosyringone for 10 minutes and then co-cultivated on MS medium in darkness at 25 ± 2°C. After co-cultivation, the explants were transferred to medium containing cefotaxime to eliminate the bacteria. Hairy root transformation was confirmed by genomic DNA extraction and amplification of the *rolB* gene using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers and a standard temperature program. The measured traits included the percentage and speed of hairy root induction, number of roots per explant, root dry weight, and terpene content. Terpene content was measured using the vanillin-sulfuric acid colorimetric method with absorbance reading at 550 nm. A standard curve was prepared using β-caryophyllene, and the results were expressed as mg β-caryophyllene equivalent per gram of dry weight. Data were analyzed using SAS software, and means were compared using Duncan's multiple range test at the 5% probability level.

Results: The results showed that the highest percentage of hairy root induction (78%), the highest induction speed (9 days), the highest number of roots (16 roots per explant), and the highest root dry weight (64 mg) were obtained in the treatment of 100 mg/L acetosyringone, bacterial density of OD₆₀₀ = 0.5, and co-cultivation time of 48 hours. Increasing the acetosyringone concentration to 200 mg/L caused a significant decrease in all growth indices, which was probably due to oxidative stress and its inhibitory effects on cell division and growth. Furthermore, increasing bacterial density to OD₆₀₀ = 1 reduced the induction percentage, root number, and dry weight, which can be attributed to bacterial overgrowth, competition for nutrients, and triggering of plant defense responses. The co-cultivation time of 48 hours was identified as the most suitable duration, since shorter co-cultivation did not provide sufficient time for effective T-DNA transfer, while longer co-cultivation led to tissue necrosis and reduced explant viability. The highest amount of terpene (0.151 mg β-caryophyllene equivalent per gram of dry weight) was observed in the optimal treatment, while the lowest amount (0.036 mg/g DW) was found in the 200 mg/L acetosyringone treatment. Additionally, the presence of a specific 780 bp band of the *rolB* gene in the PCR test confirmed the successful transformation of all examined hairy roots.

Conclusion: The results of this study demonstrated that simultaneous optimization of acetosyringone concentration, bacterial density, and co-cultivation time significantly enhanced hairy root induction efficiency and terpene accumulation in valerian. The treatment of 100 mg/L acetosyringone, OD₆₀₀ = 0.5, and 48 hours of co-cultivation was introduced as the optimal condition for producing hairy roots and terpene compounds.





دسترسی رایگان

مقاله پژوهشی

بهبود تولید محتوای نسبی ترکیبات ترپنی از طریق بهینه‌سازی شرایط القای ریشه موئین در گیاه دارویی سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.)

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

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

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

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۷/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۷/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۰۶

چکیده

نویسنده مسئول:

عزیزاله خیری

ایمیل:

kheiry@znu.ac.ir

سابقه و هدف: سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) از مهم‌ترین گیاهان دارویی و منبع ارزشمند ترکیبات ترپنی است. به دلیل محدودیت تولید مزرعای و کاهش ذخایر طبیعی، استفاده از ریشه‌های موئین القاشده توسط *Agrobacterium rhizogenes* مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش با هدف بهینه‌سازی شرایط القای ریشه موئین و بررسی اثر آن بر شاخص‌های رشدی و میزان ترپن انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل چهار سطح استوسیرینگون (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر)، دو سطح تراکم سوسپانسیون آگروباکتریوم رایزوزن (*Agrobacterium rhizogenes*) سویه MSU440 بر اساس چگالی نوری (OD₆₀₀) ۰/۵ و ۱/۵ و ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری حاوی استوسیرینگون غوطه‌ور شدند و سپس در محیط کشت MS، در شرایط تاریکی و دمای ۲۵±۲ درجه سانتی گراد، تحت هم‌کشتی قرار گرفتند. پس از پایان هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها برای حذف باکتری به محیط کشت حاوی سفوتاکسیم منتقل شدند. تایید تراریختی ریشه‌های موئین با استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن *roB* به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و برنامه دمایی استاندارد انجام شد. صفات اندازه‌گیری شده شامل درصد و سرعت القای ریشه موئین، تعداد ریشه در هر ریزنمونه، وزن خشک ریشه و میزان ترپن کل بود. مقدار ترپن با روش رنگ‌سنجی وانیلین-اسید سولفوریک و قرائت جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با استفاده از β-کاریوفیلین تهیه و نتایج بر حسب میلی گرم معادل β-کاریوفیلین در گرم وزن خشک بیان شد. داده‌ها با نرم‌افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه موئین (۷۸ درصد)، بیشترین سرعت القا (۹ روز)، بیشترین تعداد ریشه (۱۶ ریشه در هر ریزنمونه) و بالاترین وزن خشک ریشه (۶۴ میلی گرم) در تیمار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استوسیرینگون، تراکم باکتری ۰/۵ OD₆₀₀ و زمان هم‌کشتی ۴۸ ساعت به دست آمد. افزایش غلظت استوسیرینگون به ۲۰۰ میلی گرم در لیتر موجب کاهش معنی‌دار تمامی شاخص‌های رشدی شد که احتمالاً ناشی از تنش اکسیداتیو و اثرات بازدارنده آن بر تقسیم و رشد سلولی بود. همچنین، افزایش تراکم باکتری به OD₆₀₀=۱ درصد القا، تعداد ریشه و وزن خشک را کاهش داد که می‌تواند به رشد بیش از حد باکتری، رقابت برای مواد غذایی و تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاه نسبت داده شود. زمان هم‌کشتی ۴۸ ساعت نیز به عنوان مناسب‌ترین مدت زمان شناسایی شد، زیرا هم‌کشتی کوتاه‌تر فرصت کافی برای انتقال مؤثر T-DNA فراهم نکرد و هم‌کشتی طولانی‌تر موجب نکروز بافت و کاهش زنده‌مانی ریزنمونه‌ها شد. بیشترین مقدار ترپن (۰/۱۵۱ میلی گرم معادل β-کاریوفیلین در گرم وزن خشک) در تیمار بهینه و کمترین مقدار (۰/۰۳۶ میلی گرم در گرم وزن خشک) در تیمار ۲۰۰ میلی گرم در لیتر استوسیرینگون مشاهده شد. همچنین، حضور باند اختصاصی ۷۸۰ جفت‌بازی ژن *roB* در آزمون PCR، تراریختی موفق تمامی ریشه‌های موئین بررسی شده را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که بهینه‌سازی هم‌زمان غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی، کارایی القای ریشه موئین و تجمع ترپن را در سنبل الطیب به طور معنی‌داری افزایش داد. تیمار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استوسیرینگون، OD₆₀₀=۰/۵ و ۴۸ ساعت هم‌کشتی، به عنوان شرایط بهینه برای تولید ریشه موئین و ترکیبات ترپنی معرفی شد.

واژه‌های

کلیدی: آگروباکتریوم، ترانسفورماسیون، متابولیت ثانویه، ریشه موئین

نحوه استناد:

بیگلری فراش^۱، خیری، ع.، قهرمانی، ز.، باقری، خ.، و رضوی، ف. (۱۴۰۵). بهبود تولید محتوای نسبی ترکیبات ترپنی از طریق بهینه‌سازی شرایط القای ریشه موئین در گیاه دارویی سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) مجله پژوهش در متابولیت‌های گیاهی، دوره ۴، شماره ۱، صفحات: ۴۹-۶۱.

Doi:10.22034/jrpsm.2026.577954.1109

مقدمه

گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع طبیعی ترکیبات زیست‌فعال، نقش برجسته‌ای در نظام‌های درمانی سنتی و مدرن ایفا می‌کنند. با افزایش تقاضای جهانی برای فرآورده‌های گیاهی و محدودیت‌های ناشی از برداشت بی‌رویه از منابع طبیعی، توسعه روش‌های نوین و پایدار برای تولید زیست‌توده گیاهی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی جهان است که به‌دلیل خواص آرام‌بخش، ضد اضطراب و اثرات درمانی بر سیستم عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این خواص عمدتاً به حضور ترکیبات ثانویه ارزشمند، به‌ویژه ترپن‌ها و سسکوئین‌ترپن‌ها نسبت داده می‌شود که عمدتاً در ریشه‌های گیاه تجمع می‌یابند (Sezen, Karaoglan, 2022). با این حال، تولید این ترکیبات در شرایط مزرعه‌ای با محدودیت‌هایی نظیر رشد آهسته گیاه، نوسانات محیطی، تنوع ژنتیکی و برداشت‌های مکرر همراه است. از این‌رو، توسعه سامانه‌های زیست‌فناورانه جایگزین برای تولید پایدار و کنترل‌شده متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه ترپن‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. سیستم ریشه موئین القاشده توسط آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*) به‌عنوان یکی از کارآمدترین ابزارها برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی مطرح شده است. آگروباکتریوم رایزوزنز با نام جدید ریزوبیوم رایزوزنز، یک باکتری گرم‌منفی و خاک‌زی است که طیف وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کند (Castellanos-Arévalo et al., 2020). این باکتری از طریق القای پلاسמיד Ri (القاننده ریشه) خود، حاوی ژن‌های *rol* در ناحیه T-DNA، باعث ایجاد ریشه‌های موئین با انشعابات زیاد در محل زخم می‌شود. استفاده از ریشه‌های موئین تراریخته حاصل از این روش، به دلیل کارایی بالا، سرعت تولید و صرفه اقتصادی، پایداری ژنتیکی، استقلال هورمونی و قابلیت کشت در زیست‌راکتورها به یک ابزار قدرتمند و جایگزینی مناسب برای روش‌های سنتی سنتز متابولیت‌های ثانویه تبدیل شده است (Vereshchagina et al., 2024). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که ریشه‌های موئین قادرند مقادیر بالاتری از ترکیبات ثانویه را نسبت به گیاه مادری تولید کنند، که این ویژگی آن‌ها را به یک سیستم مناسب برای تولید صنعتی ترکیبات دارویی تبدیل کرده است (Biswas et al., 2023). با این حال موفقیت در القای ریشه موئین به‌شدت وابسته به بهینه‌سازی شرایط تراریزش است. یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در این فرایند، غلظت باکتری است که معمولاً با چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD₆₀₀) بیان می‌شود. OD شاخصی غیرمستقیم برای برآورد تراکم سلول‌های باکتری در سوسپانسیون بوده و تعیین‌کننده شدت تماس بین باکتری و بافت گیاهی است (Yan et al., 2023). مطالعات

اخیر نشان داده‌اند که استفاده از OD های پایین منجر به عفونت ناکافی و کاهش کارایی انتقال T-DNA می‌شود، در حالی که تراکم بالای باکتری می‌تواند باعث رشد بیش از حد باکتری، نکرز بافت گیاهی و کاهش درصد القای ریشه موئین شوند (Li et al., 2024). از این‌رو، انتخاب یک OD بهینه برای هر گونه گیاهی ضروری است (De Koning et al., 2023). عامل مهم دیگر در سیستم تراریزش، زمان هم‌کشتی بین باکتری و ریزنمونه گیاهی است. این دوره زمانی، بازه‌ای است که در آن *A. rhizogenes* فرصت دارد ژن‌های T-DNA خود را به سلول‌های گیاهی منتقل کرده و فرایند تراریزش را آغاز کند (Liu et al., 2024). مطالعات نشان داده‌اند که زمان‌های هم‌کشتی کوتاه ممکن است برای انتقال مؤثر DNA کافی نباشند، در حالی که زمان‌های طولانی‌تر اغلب منجر به رشد بیش از حد باکتری، تخریب بافت گیاهی و کاهش بقای ریزنمونه‌ها می‌شوند (Ghorbani et al., 2024). در کنار عوامل فیزیکی و زیستی، استفاده از ترکیبات شیمیایی القاننده نیز نقش مهمی در بهبود کارایی تراریزش دارد. استوسیرینگون (Acetosyringone) یک ترکیب فنولی طبیعی است که از دیواره سلولی گیاهان آسیب‌دیده آزاد می‌شود و به‌عنوان یکی از قوی‌ترین القاننده‌های ژن‌های *vir* در *A. rhizogenes* شناخته می‌شود. این ترکیب با فعال‌سازی ژن‌های *vir*، فرایند برش و انتقال T-DNA را تسهیل می‌کند و در نتیجه موجب افزایش کارایی تراریزش و القای ریشه موئین می‌شود (Palmer and Shaw, 1992). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که استفاده از استوسیرینگون در غلظت‌های مختلف می‌تواند تأثیر معنی‌داری بر درصد القا و کیفیت ریشه‌های موئین داشته باشد، به‌طوری که غلظت‌های پایین ممکن است اثر القایی کافی نداشته باشند و غلظت‌های بالا گاهی اثرات بازدارنده یا سمیت بر بافت گیاهی نشان دهند (Massah and Rabiei, 2023). با وجود گزارش‌های متعدد درباره تولید ریشه موئین در گیاهان دارویی، اطلاعات محدودی درباره بهینه‌سازی همزمان غلظت استوسیرینگون، تراکم آگروباکتریوم و زمان هم‌کشتی در سنبل‌الطیب و اثر این عوامل بر تجمع ترکیبات ترپنی وجود دارد. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی شرایط القای ریشه موئین، تأیید مولکولی تراریختی ریشه‌ها و ارزیابی تغییرات تجمع ترکیبات ترپنی در گیاه دارویی سنبل‌الطیب انجام شد.

روش تحقیق

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل غلظت استوسیرینگون در چهار سطح (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت باکتری در دو سطح (۱/۵ و ۱) و زمان هم‌کشتی در سه سطح (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و با سه تکرار در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه زنجان انجام شد. بذره‌های استاندارد

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه های موین: به منظور تأیید تراریختی ریشه های موین و حضور ژن *rolB* استخراج DNA از ریشه های تیمار شده با *A. rhizogenes* به روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle, 1990). خلوص و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز بررسی گردید. برای شناسایی ژن *rolB* واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی (آغازگر رفت با توالی 5'-gctcttgacgtgctagatt-3' و آغازگر برگشت با توالی 3'--5' gaaggtgcaagctacctctc) اجرا شد. تکثیر قطعات ۷۸۰ bp ژن *rolB* با استفاده از آغازگرهای مورد اشاره انجام گرفت. جهت آماده سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش، از یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومول در لیتر، ۱۲/۵ میکرولیتر از کیت آماده PCRm master mix شرکت دنا زیست (حاوی جافر ۱۰X pcr، انزیم Taq DNA Polymerase، $MgCl_2$ ۴ میلی مول بر لیتر) و dNTPs (۱۰ میکرومول بر لیتر)، ۱ میکرولیتر (۲۵ نانوگرم) DNA ژنومی و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه استفاده گردید. برنامه ترموسایکلر (مدل T100 Thermal Cycler شرکت Bio-Rad) شامل دناتوراسیون اولیه در $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر $58^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در $72^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و در نهایت بسط نهایی در $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵ سیکل انجام شد. محصولات PCR شامل مارکر ۱۰۰ جفت باز (CinnaGen)، کنترل منفی (DNA استخراج شده از ریشه های غیرتراریخت)، کنترل مثبت (پلاسمید Ri حامل ژن های *rolB*) و نمونه های DNA ریشه های موین، روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE 0.5X با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، باندهای تشکیل شده در دستگاه ژل داک (مدل Compact Pro، ساخت شرکت ATP، پدیده نو ژن پارس) مشاهده و با مارکر مقایسه گردیدند (Sharma et al., 2017).

سنجش ترین کل: ترکیبات ترپنی قابل سنجش با روش اصلاح شده وانیلین-اسید سولفوریک بر پایه تشکیل کمپلکس رنگی بین ترکیبات ترپنوئیدی و معرف وانیلین در محیط اسیدی اندازه گیری شد (Suresh et al., 2021). پودر ریشه های خشک شده (۱۰۰ میلی گرم) با ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ و حمام فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه استخراج و سپس سانتریفیوژ شد. یک میلی لیتر از عصاره با یک میلی لیتر وانیلین ۱٪ و یک میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در $60^{\circ}C$ درجه سانتی گراد انکوبه شد. جذب نمونه ها در ۵۵۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 7315 اندازه گیری گردید. برای رسم منحنی استلندارد، رقت های

سنبل الطیب با کد VO ۱۵ MPL SB ۶۷۴ از موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور تهیه و پس از خیساندن در جیبرلیک اسید ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر به مدت ۲۴ ساعت، با اتانول ۷۰٪ (۱ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۵٪ (۱۰ دقیقه) ضدعفونی شده و در محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) جامد کشت شدند (Murashige & Skoog, 1962). جوانه زنی در اتاقک رشد با دمای $27^{\circ}C$ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی انجام شد. از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه MSU440 دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک ریفامپین استفاده شد. باکتری در محیط مایع LB حاوی آنتی بیوتیک ریفامپین (جهت حذف سایر باکتری ها)، در دمای $28^{\circ}C$ درجه سانتی گراد و با تکان دهی ۱۲۰ دور در دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. پس از رسیدن باکتری به فاز لگاریتمی رشد، سوسپانسیون باکتری در فالكون های ۱۵ میلی لیتری با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $4^{\circ}C$ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (مدل Hermle Z206-A Compact Centrifuge, 115V - کشور آلمان) شد. سلول های ته نشین شده جمع آوری و در محیط مایع MS بدون تنظیم کننده رشد مجدداً معلق شدند. چگالی نوری سوسپانسیون باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) تنظیم شد تا غلظت های مورد نظر برای تیمارها حاصل شود. به منظور بهینه سازی کارایی انتقال T-DNA، استوسیرینگون در چهار غلظت به سوسپانسیون باکتری افزوده شد (Xi et al., 2018). ریزنمونه های برگ به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری حاوی استوسیرینگون غوطه ور شدند و رطوبت اضافی آن ها با استفاده از کاغذ صافی استریل گرفته شد. ریزنمونه های آلوده شده روی محیط کشت جامد MS بدون تنظیم کننده رشد و در تاریکی کامل و دمای $25 \pm 2^{\circ}C$ درجه سانتی گراد تحت شرایط هم کشتی در سه بازه زمانی نگهداری شدند. پس از پایان دوره های هم کشتی، برای حذف باکتری باقی مانده، نمونه ها در محیط MS مایع استریل حاوی ۲۰۰ mg/L سفوتاکسیم به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر ۸۰ rpm شسته شدند. سپس به محیط MS جامد حاوی ۵۰۰ mg/L سفوتاکسیم منتقل و در دمای $27^{\circ}C$ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Biglari Farash et al., 2026). این مرحله تا حذف کامل باکتری ها چندین بار تکرار شد. پس از ۴ هفته درصد القای ریشه موین، سرعت القای ریشه موین، تعداد ریشه موین در هر ریزنمونه و وزن خشک ریشه های موین ظهور یافته بررسی شد. سرعت القا بر اساس تعداد روزهای سپری شده تا ظهور اولین ریشه موین ثبت گردید. تعداد ریشه های موین برای هر ریزنمونه به صورت شمارش مستقیم اندازه گیری شد. برای تعیین وزن خشک، ریشه های موین برداشت شده ابتدا با آب مقطر شسته شده، سپس در آون با دمای $60^{\circ}C$ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک و در نهایت توزین شدند.

در سطح احتمال پنج درصد صورت پذیرفت. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی و همچنین اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه آنها بر تمامی صفات مورد بررسی، شامل درصد القای ریشه مویین، زمان ظهور ریشه، تعداد ریشه، وزن خشک و ترپن کل، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). به‌ویژه، معنی‌داری برهم‌کنش سه‌گانه استوسیرینگون $\times$ تراکم باکتری $\times$ زمان هم‌کشتی نشان داد که پاسخ ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب به هر یک از عوامل، به سطح دو عامل دیگر وابسته است و بنابراین مقایسه میانگین‌ها بر اساس اثرات اصلی هر عامل به‌تنهایی نمی‌تواند الگوی واقعی پاسخ را نشان دهد. از این‌رو، مقایسه و تفسیر میانگین‌ها بر اساس ترکیبات سه‌گانه تیماری انجام شد.

سریالی از β -کاریوفیلین (۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه و با همان مراحل واکنش، جذب آن‌ها قرائت شد. معادله رگرسیون خطی (فرمول ۱) با ضریب تعیین R^2 محاسبه گردید. مقدار ترپن کل نمونه‌ها بر اساس این معادله بر حسب میلی‌گرم معادل β -کاریوفیلین در گرم وزن خشک بیان شد.

رابطه ۱: معادله رگرسیون به‌دست‌آمده $Abs = 0.0181C + 0.012$ ($R^2 \approx 0.999$)

Abs: جذب نوری نمونه در طول موج ۵۵۰ نانومتر

0.0181: شیب خط استاندارد (ضریب حساسیت روش)

C: غلظت ترکیبات ترپنی (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)

0.012: جذب زمینه یا (blank)

R^2 : ضریب تعیین (اعتبار خطی منحنی استاندارد)

آنالیز آماری: تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر شاخص‌های القای ریشه مویین و ترپن کل در سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.)

Table 1- Analysis of variance for the effects of treatments on hairy root induction traits and total terpene content in valerian (*Valeriana officinalis* L.)

منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degrees of freedom (df)	میانگین مربعات Mean Squares (MS)				
		درصد القا Induction percentage	سرعت القا Induction speed	تعداد ریشه Root number	وزن خشک Dry weight	ترپن کل Total terpene
استوسیرینگون (A) Acetosyringone (A)	3	1560.8 **	108.3 **	415.3 **	819.5 **	0.00614 **
تراکم باکتری (B) Bacterial density (B)	1	1215.0 **	92.5 **	345.6 **	726.0 **	0.00487 **
زمان هم‌کشتی (C) Co-cultivation time (C)	2	917.1 **	89.3 **	244.6 **	512.3 **	0.00362 **
A $\times$ B	3	297.4 **	19.5 **	71.8 **	141.9 **	0.00117 **
A $\times$ C	6	207.6 **	12.0 **	49.8 **	94.7 **	0.00082 **
B $\times$ C	2	228.1 **	16.4 **	66.3 **	134.5 **	0.00093 **
A $\times$ B $\times$ C	6	105.8 **	6.4 **	29.5 **	59.4 **	0.00042 **
خطا Error	48	6.36	0.35	1.45	2.75	0.000034
CV Coefficient of Variation	-	5.2	6.8	8.5	7.5	5.9

*: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، **: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد، ns: غیرمعنی‌دار

*: significant at $P < 0.05$, **: significant at $P < 0.01$, ns: not significant

ترکیب هم‌زمان سه عامل وابسته بود. بیشترین درصد القا (۷۸٪) در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استوسیرینگون، $OD_{600} = 0.5$ و ۴۸ ساعت هم‌کشتی مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که

اثر متقابل غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر شاخص‌های القای ریشه مویین: بررسی ترکیبات سه‌گانه (شکل ۱) نشان داد که درصد القای ریشه مویین به‌شدت به

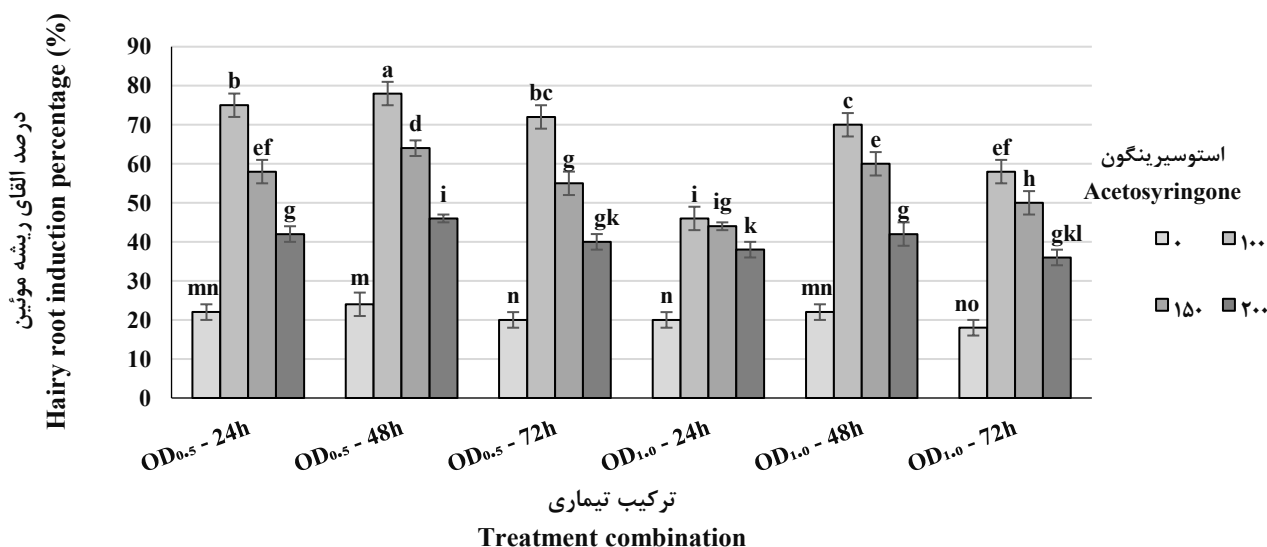
باکتری ($OD < 0.7$) باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی و تجمع ROS در بافت‌ها می‌شود که با کاهش درصد القا همبستگی دارد (Kuta & Tripathi, 2005). اثر زمان هم‌کشتی نیز کاملاً وابسته به دو عامل دیگر بود. نتایج شکل ۱ نشان داد که افزایش زمان هم‌کشتی از ۲۴ به ۴۸ ساعت، درصد القای ریشه موپین را از ۴۶٪ به حداکثر مقدار ۷۲٪ افزایش داد، اما افزایش بیشتر به ۷۲ ساعت باعث کاهش آن به ۵۸٪ شد که نشان‌دهنده اثرات منفی تماس طولانی‌مدت ریزنمونه با باکتری است.

محققان در دو گونه گل ماهور (Verbascum) زمان‌های هم‌کشتی ۴۸ و ۷۲ ساعت را مقایسه کردند. بیشترین درصد القا، برابر با ۶۸/۱۸ درصد، در هم‌کشتی ۷۲ ساعته مشاهده شد (Amini et al., 2024). همچنین در گیاه گل بادکنکی (*Platycodon grandiflorus*)، افزایش زمان هم‌کشتی از ۴۸ به ۷۲ ساعت باعث رشد بیش از حد باکتری و کاهش القا گردید (Park et al., 2011). مطالعات در آشواگاندا (*Withania somnifera*) نشان داد در شرایط بهینه، هم‌کشتی به مدت ۵ روز با سویه R1000 و استوسیرینگون ۱۰۰ میکرومولار، به القای ۸۸٪ ریشه موپین منجر شد. هم‌کشتی ۷ روزه نیز باعث رشد بیش از حد باکتری و نکروز ریزنمونه‌ها شد (Sivanandhan et al., 2014). این گزارشات نشان می‌دهد که زمان بهینه به گونه و شرایط آزمایش وابسته است. در زمان‌های کوتاه، فرصت کافی برای اتصال باکتری، فعال‌سازی ژن‌های ویبرولانس و انتقال T-DNA وجود ندارد، اما در ۴۸ ساعت فرآیند تراریختی تکمیل شده و حداکثر سلول‌ها ژن‌های *rol* را دریافت می‌کنند (Gutiérrez-Valdes et al., 2020). در زمان‌های طولانی‌تر، رشد بیش از حد باکتری منجر به رقابت برای مواد مغذی، تجمع متابولیت‌های سمی و نکروز بافت می‌شود (Hussain et al., 2022).

غلظت استوسیرینگون اثر تعیین‌کننده‌ای بر موفقیت القای ریشه موپین در سنبل‌الطیب داشت. بیشترین درصد القا در تیمار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود، در حالی که تیمار شاهد کمترین میزان القا (۲۲٪) را نشان داد که بیانگر نقش ضروری این ترکیب فنولی در فعال‌سازی فرایند انتقال ژن توسط *A. rhizogenes* است.

استوسیرینگون به‌عنوان القاکننده قوی ژن‌های *vir*، موجب افزایش کارایی انتقال T-DNA می‌شود و حضور آن در غلظت‌های بهینه، توان تراریختی باکتری را به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌دهد (Kumari et al., 2022). نتایج این بررسی نشان داد که غلظت باکتری تأثیر قابل‌توجهی بر درصد القای ریشه موپین دارد. در پژوهش حاضر، تراکم $OD_{600}=0.5$ در ترکیب با غلظت بهینه استوسیرینگون و زمان مناسب، پاسخ بیشتری نسبت به $OD_{600}=1$ ایجاد کرد.

مطالعه‌ای جامع روی سنبل‌الطیب گزارش کرد که غلظت بهینه باکتری $OD_{600}=0.6$ بوده و بالاترین درصد القا (۷۸٪) را داشته است که به تعادل مناسب بین تراکم باکتریایی برای انتقال مؤثر T-DNA و جلوگیری از خفگی بافت نسبت داده شد (Piatczak et al., 2021). همچنین نشان داده شد که غلظت‌های پایین ($OD < 0.4$) به دلیل تعداد ناکافی باکتری و غلظت‌های بالا ($OD < 0.7$) به دلیل رشد بیش از حد باکتری و القای پاسخ‌های دفاعی، درصد القای کمتری دارند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Torkamani et al., 2014). در غلظت‌های پایین، تعداد باکتری‌های متصل‌شونده به سطح ریزنمونه محدود است، اما با افزایش غلظت تا نقطه بهینه ($OD_{600} \approx 0.6$) پوشش سطحی مناسب و اتصال مؤثر فراهم شده و فرآیند انتقال T-DNA با حداکثر کارایی صورت می‌گیرد (Hussain et al., 2022). مطالعه‌ای تخصصی روی سنبل‌الطیب نشان داد که غلظت‌های بالای

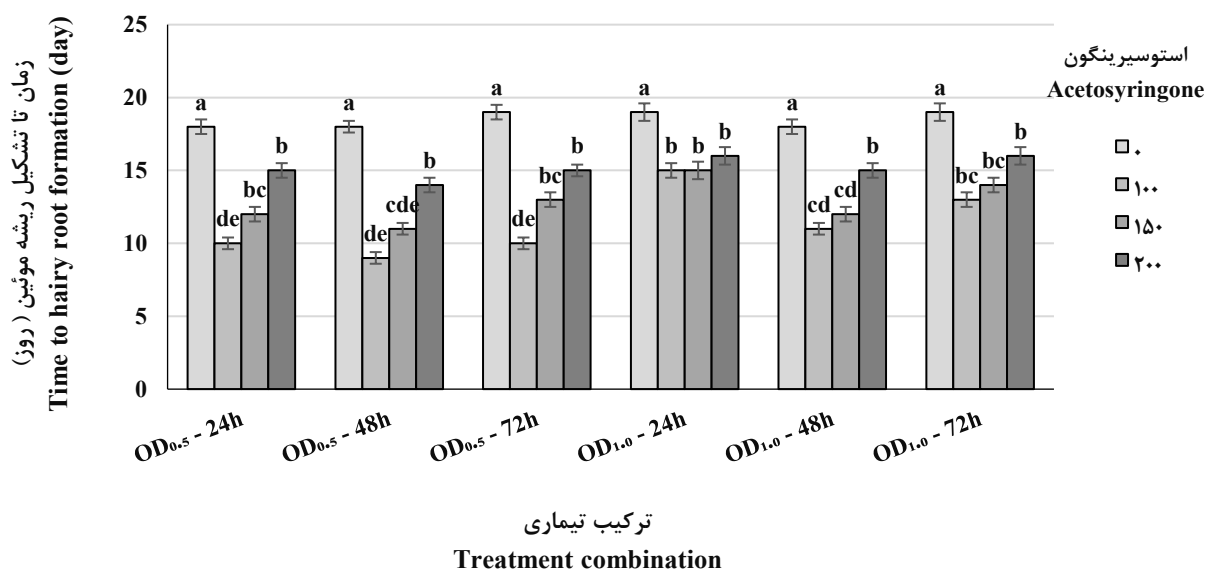


شکل ۱- مقایسه میانگین اثر غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر درصد القای ریشه موپین گیاه سنبل‌الطیب

Figure 1- Comparison of the mean effects of acetosyringone concentration, bacterial density, and co-cultivation time on the percentage of hairy root induction in valerian (*Valeriana officinalis* L.).

افزایش بیشتر استوسیرینگون به ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، زمان تشکیل ریشه را افزایش داد که نشان دهنده اثر دوز-وابسته غیرخطی است. نتایج حاضر با گزارش Pavli و Foti (2020) همخوانی دارد که بیان کردند افزودن استوسیرینگون در محدوده ۷۵–۱۰۰ mg/L موجب افزایش بیش از دو برابری سرعت القای ریشه موئین در عدس (*Lens culinaris*) شد (Foti and Pavli, 2020). این پاسخ غیرخطی قبلاً نیز در ریشه‌های موئین دتاتوره (*Datura stramonium*) مشاهده شده، که بیشینه سرعت در غلظت‌های متوسط و افت در سطوح بالاتر گزارش گردیده است (Sharma et al., 2021). از لحاظ مکانیزمی، استوسیرینگون واکنش‌های *vir* را فعال کرده و مسیر انتقال T-DNA را تسهیل می‌کند، اما در غلظت‌های بالا با افزایش تولید ROS و مهار آنزیم‌های کلیدی رشد، پاسخ سلولی را کاهش می‌دهد (Sharma and Gupta, 2020).

اثر متقابل غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر زمان ظهور اولین ریشه موئین: زمان ظهور اولین ریشه نیز تحت تأثیر معنی‌دار برهم‌کنش سه‌گانه قرار گرفت (شکل ۲). کوتاه‌ترین زمان ظهور ریشه در ترکیب ۱۰۰ mg/L استوسیرینگون در ۴۸ ساعت و $OD_{600}=0/5$ مشاهده شد و ریشه‌ها پس از ۹ روز ظاهر شدند. در مقابل، در تیمار شاهد در همین تراکم و زمان، زمان ظهور ریشه ۱۹ روز بود. غلظت استوسیرینگون تأثیر قابل توجهی بر سرعت تشکیل ریشه موئین داشت. در تیمار شاهد، زمان تشکیل ریشه ۱۸ روز بود، در حالی که در ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به حدود ۹ روز کاهش یافت. این الگوی بهینه با یافته‌های مطالعات قبلی در سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) هم‌راستا است (Moehninsi & Navarre, 2018).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر سرعت تشکیل ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب
Figure 2- Comparison of the mean effects of acetosyringone concentration, bacterial density, and co-cultivation time on the rate of hairy root formation in valerian (*Valeriana officinalis* L.).

(Balasubramanian et al., 2018). در غلظت‌های پایین، تعداد باکتری‌های عامل آلودگی کافی نبوده و در غلظت‌های بالا، رقابت شدید برای مواد مغذی و شرایط هیپوکسی، فرآیندهای تقسیم سلولی را کند می‌کنند (Thwe et al., 2016; Alpizar et al., 2008). زمان هم‌کشتی بر سرعت تشکیل ریشه نیز تأثیر مستقیم داشت. در تیمار ۲۴ ساعت، بیشترین زمان ظهور ریشه (۱۹ روز) مشاهده شد. در مقابل، تیمار ۴۸ ساعت با سرعت اولیه بیشتر (۹ روز) تا تشکیل ریشه، بیشترین سرعت القا ریشه را داشت. زیرا افزایش مدت هم‌کشتی فرصت بیشتری برای اتصال و انتقال T-DNA توسط *A.*

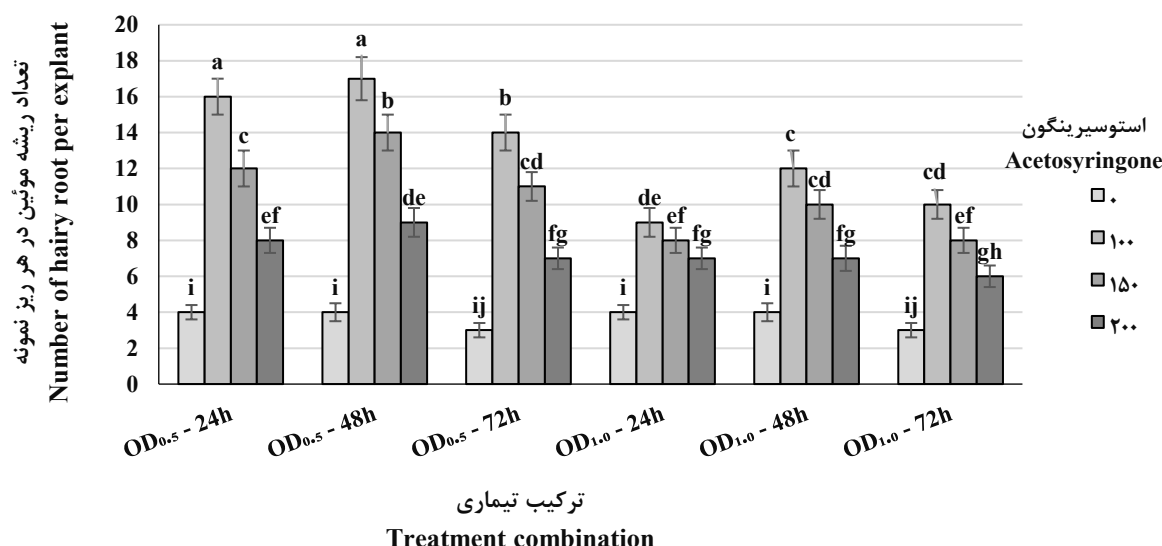
به‌طور مشابه در سنبل‌الطیب، شرایط بهینه استوسیرینگون موجب افزایش سرعت تشکیل ریشه می‌شود، در حالی که غلظت‌های بالاتر از آستانه تحمل باعث کاهش کارایی می‌گردد (Sharma et al., 2021). تراکم باکتری نیز در ترکیب با دو عامل دیگر بر زمان ظهور اثر گذاشت. نتایج نشان داد که با کاهش غلظت باکتری، مدت زمان لازم برای ظهور ریشه‌ها کاهش یافته و در $OD_{600}=0/5$ به کمترین میزان (۹ روز) رسید، در حالی که در $OD=1$ این زمان افزایش یافت. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که غلظت‌های میانی باکتری (معمولاً ۰/۷ تا ۰/۵) سریع‌ترین زمان ظهور ریشه‌ها را دارند (t

استوسیرینگون در غلظت بهینه، در کنار تراکم مناسب باکتری و زمان مناسب هم‌کشتی، موجب افزایش چشمگیر تعداد کانون‌های ریشه‌زایی شد. کاهش تعداد ریشه در غلظت‌های ۱۵۰ (۸ ریشه) و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۶ ریشه) بیانگر وجود دامنه بهینه استوسیرینگون و اثر مهاری در سطوح بالاتر است.

این الگو در گونه‌های دارویی دیگر نظیر جینسنینگ هندی (*Withania somnifera*)، افسنتین شیرین (*Artemisia annua*) و تاتوره (*Datura stramonium*) نیز گزارش شده است که افزایش تعداد ریشه تا غلظت بهینه استوسیرینگون و افت آن در دوزهای بالا را نشان دادند (Giri and Narasu, 2000). پژوهش‌های فیزیولوژیک نشان داده‌اند که استوسیرینگون در غلظت‌های بالا می‌تواند تعادل اکسیداتیو سلول را برهم زده و بیان ژن‌های مرتبط با رشد را سرکوب کند (Gelvin, 2017).

rhizogenes فراهم کرده و سرعت بیشتری به تراریختی و ظهور ریشه می‌دهد. در تیمار ۷۲ ساعت، به دلیل رشد بیش از حد باکتری و آسیب بافتی، کارایی کلی القا کاهش یافت. این تفسیر با گزارش‌های اخیر در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) که بیشترین تعداد ریشه را در ۴۸ ساعت نشان داد (Singh et al., 2025) و گیاه پریلا (*Perilla frutescens*) که هم‌کشتی ۴۸ ساعته را برای تسریع ظهور ریشه بهینه گزارش کرد، (Mahmoudi et al., 2025)، همخوانی دارد.

اثر متقابل غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر تعداد ریشه‌های مویین: تعداد ریشه نیز پاسخ وابسته به ترکیب سه‌گانه عوامل نشان داد (شکل ۳). بیشترین تعداد ریشه (۱۶ عدد در هر ریزنمونه) در ترکیب 100 mg/L استوسیرینگون در ۴۸ ساعت و $OD_{600}=0.5$ مشاهده شد. حضور



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر تعداد تشکیل ریشه‌های مویین گیاه سنبل الطیب

Figure 3- Comparison of the mean effects of acetosyringone concentration, bacterial density, and co-cultivation time on the number of hairy roots formed in valerian (*Valeriana officinalis* L.).

اثر زمان هم‌کشتی بر تعداد ریشه‌های مویی به سایر عوامل آزمایش‌شده وابسته بود. بیشترین تعداد ریشه در زمان هم‌کشتی ۴۸ ساعت و کمترین تعداد در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت مشاهده شد. این یافته با مطالعات انجام‌شده در گیاهان دیگر هم‌راستا است، به‌طوری‌که در سیر (*Allium sativum*)، هم‌کشتی ۴۸ ساعته بیشترین درصد القای ریشه‌های مویی را به همراه داشت (Vu et al., 2023). همچنین، در *Vitex negundo*، بیشترین کارایی القا در بازه ۴۴ تا ۴۸ ساعت گزارش شد (Mahakur et al., 2024). این نتایج بر اهمیت بهینه‌سازی مدت هم‌کشتی متناسب با گونه گیاهی و شرایط آزمایش تأکید می‌کنند. در زمان‌های کوتاه، انتقال T-DNA به‌طور کامل صورت نمی‌گیرد و تنها تعداد محدودی سلول تراریخت

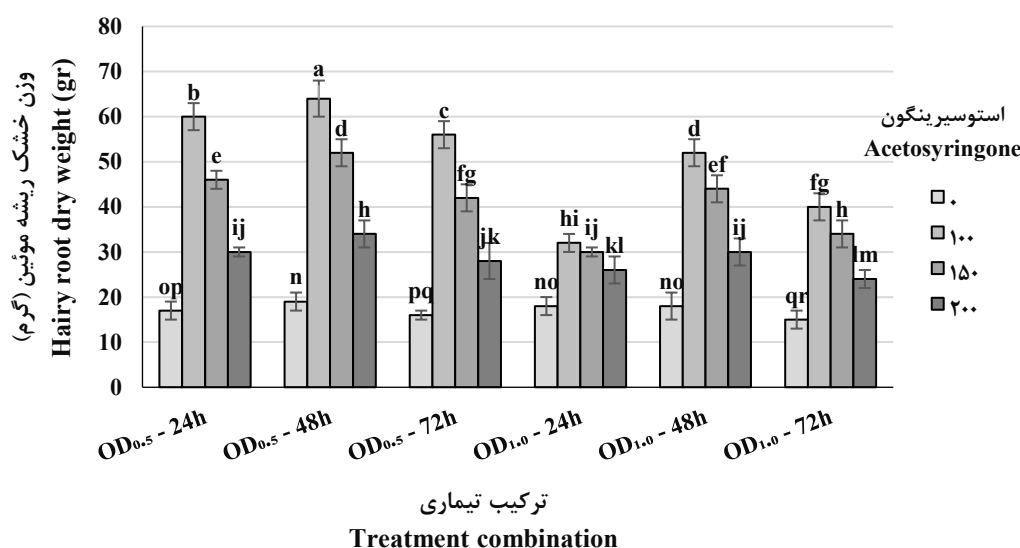
بیشترین تعداد ریشه در $OD_{600}=0.5$ حاصل شد و با افزایش به $OD=1$ ، تعداد کاهش یافت.

در پژوهشی روی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*)، بالاترین تعداد ریشه (۵ ریشه) در $OD_{600}=0.6$ گزارش شد (Sharafi et al., 2013) و در گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum*) نیز $OD_{600}=0.6$ برای تولید حداکثری ریشه معرفی گردید (Thwe et al., 2016). در غلظت‌های پایین، تعداد باکتری‌های متصل محدود است، اما با افزایش تا نقطه بهینه، پوشش سطحی مناسب و کانون‌های متعدد ریشه‌زایی فعال می‌شوند. در غلظت‌های بالاتر، اشباع سطح و پاسخ فوق‌حساسیت گیاه از جوازهنزی ریشه‌ها جلوگیری می‌کند (Alpizar et al., 2008; Giri and Narasu, 2000).

باعث کاهش رشد می‌گردد (Tiwari *et al.*, 2022). بیشترین وزن خشک ریشه در $OD_{600}=0.5$ (۶۴ میلی گرم) و کمترین آن در $OD=1$ (۱۵ میلی گرم) مشاهده شد (شکل ۷). در غلظت‌های بالاتر، اشباع بافت، رقابت برای منابع غذایی و تجمع متابولیت‌های دفاعی منجر به کاهش وزن خشک می‌شود (Hussain *et al.*, 2022). بنابراین، بهینه‌سازی غلظت باکتری برای دستیابی به حداکثر زیست‌توده، عاملی کلیدی در کاربردهای صنعتی کشت ریشه‌های موئین محسوب می‌شود (Al-Qurainy *et al.*, 2020). در بررسی اثر زمان هم‌کشتی بر وزن خشک ریشه‌های موئین، پاسخ گیاه به زمان هم‌کشتی وابسته به غلظت استوسیرینگون و تراکم باکتری بود، به‌طوری‌که در $OD_{600}=0.5$ و در حضور استوسیرینگون، افزایش زمان هم‌کشتی از ۲۴ به ۴۸ ساعت موجب افزایش وزن خشک شد و بیشترین مقدار در ۴۸ ساعت مشاهده گردید، به‌طوری‌که در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب از ۶۰، ۴۶ و ۳۰ به ۶۴ mg، ۵۲ و ۳۴ رسید، در حالی‌که افزایش زمان تا ۷۲ ساعت موجب کاهش وزن خشک به ترتیب به ۵۶ mg، ۴۲ و ۲۸ شد. در $OD=1$ نیز همین روند کلی مشاهده شد و بیشترین وزن خشک در ۴۸ ساعت به دست آمد. این الگو نشان می‌دهد که ۴۸ ساعت هم‌کشتی احتمالاً زمان مناسبی برای برقراری تماس مؤثر *A. rhizogenes* با بافت و انتقال T-DNA بوده است، در حالی‌که هم‌کشتی طولانی‌تر از ۴۸ ساعت، احتمالاً به دلیل افزایش رشد باکتری و تشدید تنش و پاسخ‌های دفاعی بافت، موجب کاهش تجمع زیست‌توده شده است. مطالعه‌ای روی سنبل الطیب (*Valeriana officinalis*) گزارش کرد که زمان ۴۸ ساعت با سویه ATCC15834 بالاترین وزن خشک (۲/۹ میلی گرم در هر ریزنمونه) را تولید کرد (Torkamani *et al.*, 2022). همچنین در تحقیقی نشان داده شد که افزایش زمان هم‌کشتی از ۴۸ به ۷۲ ساعت منجر به کاهش ۳۰ درصدی وزن خشک و کاهش معنی‌دار والرنیک اسید می‌شود (Piateczak *et al.*, 2021). در زمان‌های کوتاه، تعداد سلول‌های تراریخت محدود بوده و ریشه‌ها از توان رشد کافی برخوردار نیستند، اما در ۴۸ ساعت، تعامل مناسب بین باکتری و میزبان، شرایط را برای رشد سریع و انباشت زیست‌توده فراهم می‌آورد (Hussain *et al.*, 2022).

می‌شوند، اما در ۴۸ ساعت حداکثر سلول‌های هدف در معرض باکتری قرار گرفته و کانون‌های متعدد ریشه‌زایی فعال می‌شوند (Hussain *et al.*, 2022). در زمان‌های طولانی‌تر، رشد بی‌رویه باکتری باعث القای پاسخ فوق‌حساسیت، تجمع ROS، افزایش ترکیبات فنولی دفاعی و در نهایت نکرز بافت می‌شود که از جوانه‌زنی ریشه‌ها جلوگیری می‌کند.

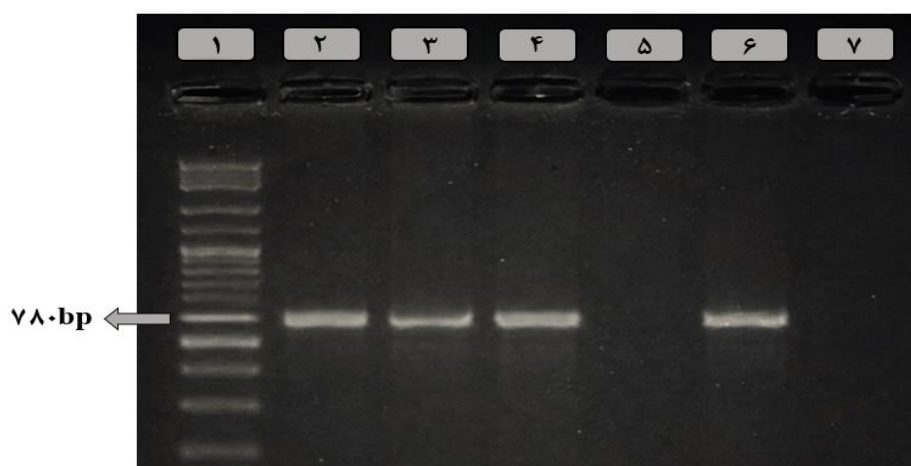
اثر متقابل غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر وزن خشک ریشه‌های موئین: وزن خشک به‌عنوان شاخصی از تجمع زیست‌توده، بیشترین مقدار خود را در همان ترکیب بهینه مشاهده‌شده برای سه صفت دیگر نشان داد (شکل ۴). این هم‌زمانی افزایش درصد القاء، تعداد ریشه و وزن خشک نشان می‌دهد که شرایط بهینه نه تنها احتمال ایجاد ریشه موئین را افزایش داده، بلکه رشد و تجمع زیست‌توده ریشه‌های تشکیل‌شده را نیز تقویت کرده است. وزن خشک ریشه‌های موئین نیز اثر معنی‌دار و وابسته به دوز استوسیرینگون را نشان داد. بیشترین وزن خشک (۶۴ میلی گرم) در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد (۱۶ میلی گرم) افزایش بیش از سه برابری را نشان می‌دهد. کاهش وزن خشک در ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نشان‌دهنده اثر مهاری در سطوح بالاتر است که احتمالاً ناشی از تنش اکسیداتیو یا اختلال در تعادل هورمونی بافت است. فعال‌سازی سیستم VirA/VirG توسط استوسیرینگون موجب افزایش کارایی انتقال T-DNA و بیان ژن‌های *rol* می‌شود که مستقیماً در تحریک رشد ریشه نقش دارند (Gelvin, 2017). با این حال، تجمع بیش از حد ترکیبات فنلی می‌تواند تولید ROS را افزایش داده و رشد زیست‌توده را محدود کند. نتایج حاضر با مطالعات انجام‌شده روی درمنه شیرین (*Artemisia annua*) همخوانی دارد، به‌گونه‌ای که افزایش زیست‌توده در غلظت‌های متوسط استوسیرینگون و کاهش آن در سطوح بالا مشاهده شده است (Sivakumar *et al.*, 2010). همچنین در نیز پژوهشی دیگر در ریحان (*Ocimum basilicum*) نشان داد که بیشینه تولید زیست‌توده و متابولیت ثانویه در غلظت‌های بهینه القاکنده فنلی حاصل می‌شود و دوزهای بالاتر



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر وزن خشک ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب
Figure 4- Comparison of the mean effects of acetosyringone concentration, bacterial density, and co-cultivation time on the dry weight of hairy roots in valerian (*Valeriana officinalis* L.)

سویه MSU440، (چاهک ۶) نیز باند اختصاصی را در محدوده مورد انتظار نشان داد که صحت عملکرد آغازگرها و شرایط PCR را تأیید کرد. همچنین، واکنش PCR بدون DNA (چاهک ۷) به‌عنوان کنترل منفی دوم، هیچ بلندی را نشان نداد. این نتایج بیانگر انتقال موفق ناحیه T-DNA پلاسمید Ri به ژنوم گیاه میزبان و القای موفق ریشه‌های موئین است.

تأیید تراریختی ریشه‌های موئین: نتایج PCR با آغازگر اختصاصی ژن *rolB* (شکل ۵) وجود باند ۷۸۰ جفت‌بازی را در تمام لاین‌های ریشه موئین تراریخته (چاهک‌های ۲، ۳ و ۴) نشان داد، در حالی که در کنترل منفی (ریشه‌های غیرتراریخته، چاهک ۵) این باند مشاهده نشد. کنترل مثبت (پلاسمید Ri استخراج‌شده از *A. rhizogenes*)

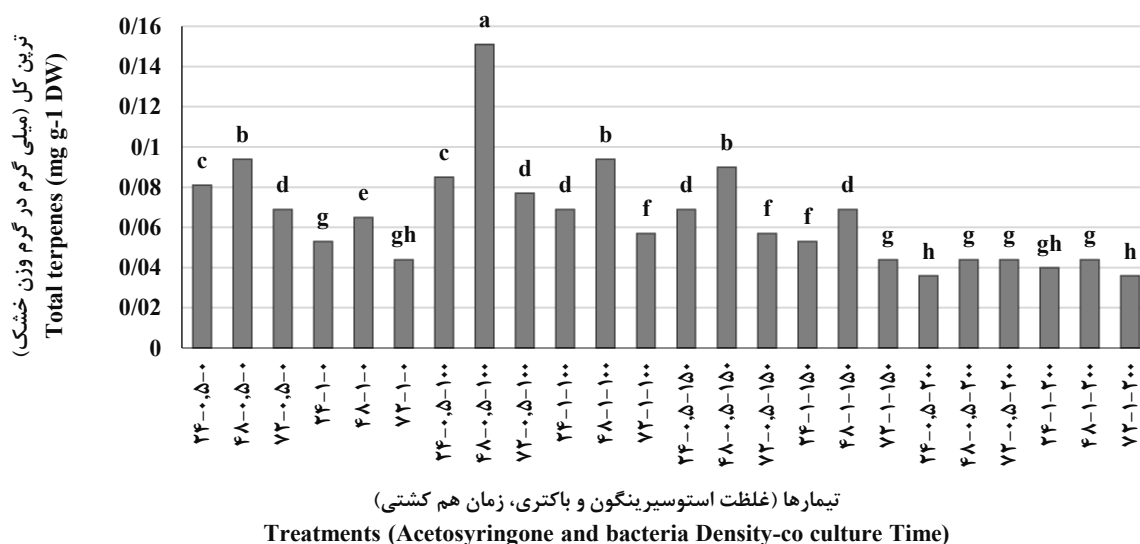


شکل ۵- بررسی تراریختی ریشه‌های موئین از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و تأیید حضور ژن *rolB*
 ۱: DNA مارکر ۱ kbp، ۲، ۳ و ۴: DNA ریشه‌های موئین القا شده از ریزنمونه‌ها به طول ۷۸۰ bp، ۵: DNA ریشه‌های غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی، ۶: پلاسمید Ri از آگروباکتریوم رایزوزنز سویه MSU440، ۷: واکنش PCR بدون DNA به عنوان کنترل منفی
Figure 5- Evaluation of the transformation of hairy roots by polymerase chain reaction (PCR) and confirmation of the presence of the *rolB* gene
 1: 1-kbp DNA marker; 2, 3, and 4: DNA from hairy roots induced from explants, showing a 780-bp fragment, 5: DNA from non-transformed roots as a negative control, 6: Ri plasmid from *Agrobacterium rhizogenes* strain MSU440, 7: PCR reaction without DNA as a negative control.

مختلف بین ۰/۰۳۶ تا ۰/۱۵۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود (شکل ۶). بیشترین مقدار $(0.151 \text{ mg g}^{-1})$ در تیمار ۱۰۰

تأثیر غلظت استوسیرینگون، تراکم باکتری و زمان هم‌کشتی بر محتوای نسبی ترکیبات ترپنی: مقدار ترین در تیمارهای

فعال‌سازی کنترل‌شده این مسیر در شرایط بهینه تراریزش، شار متابولیکی را به سمت تولید متابولیت‌های ثانویه هدایت می‌کند. همچنین گزارش شده است که افزایش کارایی تراریزش، در صورت حفظ تعادل بین رشد و تنش، با تجمع بیشتر ترپنوئیدها همراه است (Srivastava and Srivastava, 2007). بنابراین، به‌نظر می‌رسد تیمار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استوسیرینگون شرایط مناسبی برای فعال شدن هم‌زمان مسیرهای دفاعی و بیوسنتزی بدون ایجاد تنش مخرب فراهم کرده است، در حالی‌که غلظت‌های بالاتر از آستانه تحمل سلول فراتر رفته و موجب کاهش رشد و بیوسنتز ترپن شده‌اند. این نتایج با گزارش‌های پیشین درباره نقش شرایط بهینه تراریزش در افزایش تولید ترپنوئیدها در گونه‌های سنبل‌الطیب مطابقت دارد (Niazian et al., 2023).



تیمارها (غلظت استوسیرینگون و باکتری، زمان هم کشتی)

Treatments (Acetosyringone and bacteria Density-co culture Time)

شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر غلظت استوسیرینگون و باکتری و زمان هم کشتی بر میزان ترپن کل ریشه های موبین گیاه سنبل الطیب

Figure 6 - Comparison of the average effect of acetosyringone and bacteria concentrations and co-cultivation time on the total terpene content of valerian hairy roots

رشدی شد که می‌تواند ناشی از کاهش رشد بیش‌ازحد باکتری و تنش وارد شده به ریزنمونه‌ها باشد. زمان هم‌کشتی ۴۸ ساعت نیز بهترین نتیجه را ایجاد کرد، زیرا زمان‌های کوتاه‌تر برای انتقال مؤثر T-DNA کافی نبودند و زمان‌های طولانی‌تر باعث کاهش رشد و نکروز بافت شدند. بر این اساس، تیمار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استوسیرینگون، تراکم باکتری $OD_{600}=0.5$ و ۴۸ ساعت هم‌کشتی به‌عنوان شرایط بهینه معرفی می‌شود. همچنین، اگرچه روش رنگ‌سنجی وانیلین-اسید سولفوریک برای مقایسه نسبی ترکیبات ترپنی مناسب است، اختصاصیت کامل برای همه کلاس‌های ترپن ندارد؛ بنابراین، استفاده از GC-MS یا HPLC برای شناسایی و اندازه‌گیری دقیق‌تر این ترکیبات در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود.

میلی گرم در لیتر استوسیرینگون، تراکم باکتری $OD_{600}=0.5$ و ۴۸ ساعت هم‌کشتی به‌دست آمد که نشان می‌دهد وجود سطح بهینه‌ای از تحریک شیمیایی برای انتقال مؤثر T-DNA و حفظ ظرفیت متابولیکی ریشه‌های مؤین ضروری است. در مقابل، کمترین مقدار ترپن ($0.36 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر استوسیرینگون مشاهده شد که احتمالاً ناشی از تنش شدید و اثرات بازدارنده آن بر رشد ریشه و مسیرهای بیوسنتزی است. مطالعات نشان داده‌اند که تنش بیش از حد با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، در صورت تداوم، موجب مهار مسیر موالونات (MVA) و کاهش فعالیت آنزیم‌های کلیدی مانند HMGR می‌شود (Considine and Foyer, 2021). در ریشه‌های مؤین سنبل‌الطیب، سزکویی‌ترپن‌ها عمدتاً از مسیر MVA در سیتوزول سنتز می‌شوند و

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که همه صفات اندازه‌گیری‌شده الگوی پاسخ مشابهی به تیمارها داشتند و بیشترین مقادیر آن‌ها در یک ترکیب تیماری مشترک حاصل شد که بیانگر پایداری پروتکل پیشنهادی برای القای ریشه مؤین در سنبل‌الطیب است. استوسیرینگون بر تمامی صفات اثر معنی‌داری داشت و احتمالاً از طریق تحریک ژن‌های *vir* انتقال T-DNA را تسهیل کرد. با این حال، کاهش پاسخ در غلظت‌های بالاتر نشان‌دهنده ضرورت تعیین غلظت بهینه و اجتناب از اثرات بازدارنده آن است. همچنین، تراکم کمتر باکتری موجب افزایش درصد و سرعت القا و بهبود شاخص‌های

منابع

- Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C., Lashermes, P., & Etienne, H. (2008). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): Conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Annals of Botany*, 101(7), 929–940. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn027>
- Al-Qurainy, F., Nadeem, M., Khan, S., Alansi, S., Tarroum, M., Al-Ameri, A. A., & Gaafar, A. R. Z. (2020). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains for in-vitro hairy root induction, total phenolic, flavonoids contents, antibacterial and antioxidant activity of (*Cucumis anguria* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 2972–2979. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.050>
- Amini, S., Fattahi, M., & Nazemiyeh, H. (2024). Optimization of induction and hairy root culture establishment in two mullein species, *Verbascum erianthum* and *Verbascum stachydiforme*. *Scientific Reports*, 14, Article 5636. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56331-8>
- Balasubramanian, M., Anbumegala, M., Surendran, R., Arun, M., & Shanmugam, G. (2018). Elite hairy roots of *Raphanus sativus* (L.) as a source of antioxidants and flavonoids. *3 Biotech*, 8(2), Article 128. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1153-y>
- Biglari Farash, R. B., Kheiry, A., Ghahremani, Z., Bagheri, Kh., & Razavi, F. (2026). Study on the efficiency of Agrobacterium strains (*Agrobacterium rhizogenes*) and different types of explants on the transformation efficiency and antioxidant capacity of hairy roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Journal of Research in Plant Metabolites*, 4 (1), 35. doi:10.22034/jrpsm.2.026.562414.1102
- Biswas, D., Chakraborty, A., Mukherjee, S., & Ghosh, B. (2023). Hairy root culture: A potent method for improved secondary metabolite production of Solanaceous plants. *Frontiers in Plant Science*, 14, Article 1197555. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1197555>
- Castellanos-Arévalo, A. P., Estrada-Luna, A. A., Cabrera-Ponce, J. L., Valencia-Lozano, E., Herrera-Ubaldo, H., de Folter, S., Blanco-Labra, A., & Délano-Frier, J. P. (2020). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of grain (*Amaranthus hypochondriacus*) and leafy (*A. hybridus*) amaranths. *Plant Cell Reports*, 39(9), 1143–1160. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02553-9>
- Considine, M. J., & Foyer, C. H. (2021). Oxygen and reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Plant Physiology*, 186(1), 79–92. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa077>
- De Koning, R., Daryanavard, H., Garmyn, J., Kiekens, R., Toili, M. E. M., & Angenon, G. (2023). Fine-tuning CRISPR/Cas9 gene editing in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using a hairy root transformation system and *in silico* prediction models. *Frontiers in Plant Science*, 14, Article 1233418. doi: 10.3389/fpls.2023.1233418.
- Foti, C., & Pavli, O. I. (2020). High-efficiency Agrobacterium rhizogenes-mediated transgenic hairy root induction of *Lens culinaris*. *Agronomy*, 10(8), Article 1170. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081170>
- Gelvin, S. B. (2017). Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annual Review of Genetics*, 51, 195–217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
- Ghorbani, M., Omid, M., & Shah Nejat Boushahri, A. (2024). Optimization of genetically pRi-transformed roots induction in *Dracocephalum kotschy* Boiss. using response surface methodology. *Journal of Genetics*, 19(3), 159–171. URL: <http://mg.genetics.ir/article-1-1804-en.htm>
- Giri, A., & Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00016-6)
- Gutiérrez-Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K. M., Ritala, A., & Cardon, F. (2020). Hairy root cultures—A versatile tool with multiple applications. *Frontiers in Plant Science*, 11, Article 33. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>
- Hussain, M. J., Abbas, Y., Nazli, N., Fatima, S., Drouet, S., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2022). Root cultures, a boon for the production of valuable compounds: A comparative review. *Plants*, 11(3), Article 439. <https://doi.org/10.3390/plants11030439>
- Husain, Z. Z., Warsi, Z. I. I., Khan, S., Mahendran, G., Afroz, S., Chandran, A., Kashyap, P. K., Khatoun, K., Parween, G., Tandon, S., et al. (2024). Metabolic engineering of hairy root cultures in *Beta vulgaris* for enhanced production of vanillin, 4-hydroxybenzoic acid, and vanillyl alcohol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1435190. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1435190>
- Liu, L., Qu, J., Wang, C., Liu, M., Zhang, C., Zhang, X., Guo, C., Wu, C., Yang, G., Huang, J., Yan, K., Shu, H., Zheng, C., & Zhang, S. (2024). An efficient genetic transformation system mediated by *Rhizobium rhizogenes* in fruit trees based on the transgenic hairy root to shoot conversion. *Plant Biotechnology Journal*, 22(8), 2093–2103. <https://doi.org/10.1111/pbi.14328>
- Park, N. I., Tuan, P. A., Li, X., Kim, Y. K., Yang, T. J., & Park, S. U. (2011). An efficient protocol for genetic transformation of Platycodon grandiflorum with *Agrobacterium rhizogenes*. *Molecular Biology Reports*, 38(4), 2307–2313. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0363-0>
- Mahmoudi, M., Sadat-Noori, S. A., Bahmankar, M., Ebrahimi, M., & Fadavi, A. (2025). Shikonin and luteolin production in hairy root culture of *Perilla frutescens* L. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7080593/v1>
- Mahakur, B., Moharana, A., Madkami, S. K., Naik, S. K., & Barik, D. P. (2024). Optimization of factors affecting Agrobacterium-mediated hairy root induction in *Vitex negundo* L. (Lamiaceae). *International Journal of Secondary Metabolite*, 11(2), 244–254. <https://doi.org/10.21448/ijsm.1368677>
- Massah, M., & Rabiei, M. (2023). Effect of acetosyringone, sucrose and nutrients on transgenic hairy root induction in *Chenopodium quinoa* using different *Rhizobium rhizogenes* strains. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2833983/v1>
- Kim, Y. K., Li, X., Xu, H., Park, N.-I., Uddin, M. R., Pyon, J. Y., & Park, S. U. (2009). Production of phenolic compounds in hairy root culture of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12(1), 53–58. <https://doi.org/10.1007/s12892-009-0075-y>

- Kuta, D. D., & Tripathi, L. (2005). Agrobacterium-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: A resistance response against Agrobacterium-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 752–757. <https://doi.org/10.4314/ajb.v4i8.15199>
- Moehninsi, & Navarre, D. A. (2018). Optimization of hairy root induction in *Solanum tuberosum*. *American Journal of Potato Research*, 95(6), 650–658. <https://doi.org/10.1007/s12230-018-9671-z>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052>
- Niazian, M., Belzile, F., Curtin, S. J., de Ronne, M., & Torkamaneh, D. (2023). Optimization of in vitro and ex vitro *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of soybean for visual screening of transformants using RUBY. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1207762. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1207762>
- Palmer, A. C. V., & Shaw, C. H. (1992). The role of *VirA* and *VirG* phosphorylation in chemotaxis towards acetosyringone by *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*, 138(12), 2509–2514. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-12-2509>
- Piateczak, E., Jeleń, A., & Grzegorzczak-Karolak, I. (2021). Optimization of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Valeriana officinalis* L. and production of valerenic acid in hairy root cultures. *Industrial Crops and Products*, 168, Article 113589. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113589>
- Phuong, V. T. B., Anh, N. P., Thang, N. P. Q., Tran, P., & Phuong, Q. N. D. (2023). Study on induction of *Allium sativum* L. hairy roots with antibacterial activity against *Vibrio*. *Research Journal of Biotechnology*, 18(8), 153–162. <https://doi.org/10.25303/1808rjbt1530162>
- Sezen Karaoğlu, E. (2022). *Valeriana officinalis* L. in Novel drug targets with traditional herbal medicines: *Scientific and clinical evidence*, 565-568. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73234-9_39
- Sharma, P., Padh, H., & Shrivastava, N. (2017). Optimizing culture conditions for establishment of hairy root culture of *Semecarpus anacardium* L. 3 *Biotech*, 7, Article 101. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0728-6>
- Sharma, S., Singh, Y., Verma, P. K., & Vakhlu, J. (2021). Establishment of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of *Crocus sativus* L. 3 *Biotech*, 11(2), Article 82. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02626-2>
- Singh, P., Labade, D., Chote, M., Deshmukh, P., Panchal, B., Deshpande, J., Phule, A. S., Tabassum, H., & Wani, M. (2025). Efficient regeneration of *Stevia rebaudiana* Bertoni transformants through hairy root culture technique. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 98, 22–28. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2025.098.003>
- Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A., & Manickavasagam, M. (2014). An efficient hairy root culture system for *Withania somnifera* (L.) Dunal. *African Journal of Biotechnology*, 13(43), 4141–4147. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14128>
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 29. <https://doi.org/10.1080/07388550601173918>
- Sivakumar, G., Liu, C., Towler, M. J., & Weathers, P. J. (2010). Biomass production of hairy roots of *Artemisia annua* and *Arachis hypogaea* in a scaled-up mist bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(5), 802–813. <https://doi.org/10.1002/bit.22892>
- Suresh, R., Kamdar, Y., Garg, V., Kalathoti, A., & Renganathan, G. (2021). Evaluation of improved and current vanillin based colorimetric quantification methods of triterpenoids. *Journal of Student Research*, 10(2). <https://doi.org/10.47611/jsrhs.v10i2.1442>
- Tao, J., Tan, R. F., & Li, L. (2006). Genetic transformation of sunflower (*Helianthus Annuus* L.) mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *Acta Agronomica Sinica*, 32(5), 743–748.
- Tiwari, M., Mishra, A. K., & Chakrabarty, D. (2022). Agrobacterium-mediated gene transfer: Recent advancements and layered immunity in plants. *Planta*, 256(2), Article 37. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03951-x>
- Torkamani, M. R. D., Jafari, M., Abbaspour, N., Heidary, R., & Safaie, N. (2014). Enhanced production of valerenic acid in hairy root culture of *Valeriana officinalis* by elicitation. *Central European Journal of Biology*, 9, 853–863. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0320-3>
- Xi, J., Patel, M., Dong, S., Que, Q., & Qu, R. (2018). Acetosyringone treatment duration affects large T-DNA molecule transfer to rice callus. *BMC Biotechnology*, 18, Article 48. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0459-5>
- Yan, Z., Liu, S., Zhang, J., Huang, G., Duan, L., & Ye, Y. (2020). Optimizing hairy root production from explants of *Phyllanthus hainanensis*, a shrub used for traditional herbal medicine. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 7(4), 513–522. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2019272>