DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

عوامل مؤثر بر کارایی اگروباکتریوم رایزوژنز در القای ریشه‌های مویین تراریخت و ارزیابی تولید والرنیک اسید در ریشه‌مویین گیاه دارویی سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.)

ناصر زارع*، ویدا مدنی، اصلان جمالی گله‌شیخان و رسول اصغری زکریا

ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

کشت ریشه‌های مویین به دلیل پایداری ژنتیکی و بیولوژیکی بالا و قابلیت رشد سریع و تولید متابولیت‌های ثانویه در زمان کوتاه و بدون نیاز به هورمون‌های گیاهی، راهکار مؤثری را برای تولید متابولیت های ثانویه گیاهی فراهم نموده است. دراین تحقیق تأثیر عوامل مختلف شامل نوع سویه اگروباکتریوم (شامل A_4، ۱۵۸۳۴ و ۲۶۵۶)، نوع ریزنمونه (برگ و دمبرگ)، شرایط تلقیح (مدت زمان تلقیح (۱۰ و ۱۵ دقیقه) و هم‌کشتی (۴۸ و ۷۲ ساعت) و حضور و عدم حضور استوسرینگون) و همچنین غلظت ترکیبات معدنی محیط‌کشت (MS و ۱/۲ MS) در القاء و تولید ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج نشان داد در بین سویه‌های باکتری، سویه A_4 بیشترین درصد ریشه‌زایی مویین و تعداد ریشه مویین در هر ریزنمونه را داشت. همچنین ریزنمونه برگ نیز در مقایسه با ریزنمونه دمبرگ درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در هر ریزنمونه بیشتری را دارا بود. ارزیابی شرایط تلقیح مختلف نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی مویین در تیمار ۱۰ دقیقه تلقیح ریزنمونه و ۷۲ ساعت هم‌کشتی و بیشترین تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه نیز در تیمار ۱۰ دقیقه تلقیح ریزنمونه و ۷۲ ساعت هم‌کشتی به همراه ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون بدست آمد. همچنین، محیط کشت ۱/۲MS از نظر درصد و تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه در مقایسه با محیط کشت MS از کارایی بالاتری برخوردار بود. نتایج HPLC نشان داد که والرنیک اسید با مقدار ۳/۷۷ میلی‌گرم برلیتر در کشت‌های ریشه‌مویین سنبل‌الطیب تولید و تجمع می‌یابد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در تولید ریشه‌های مویین و افزایش زیست توده کلی ریشه‌های مویین گیاه سنبل‌الطیب جهت بالا بردن میزان متابولیت‌های دارویی با ارزش، نوع سویه آگروباکتریوم رایزوژنز، نوع ریزنمونه و بهینه‌سازی شرایط کشت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بهترین ترکیب‌های تیماری برای تولید ریشه‌مویین سنبل‌الطیب شامل ۱۰ دقیقه تلقیح و ۷۲ ساعت هم‌کشتی ریزنمونه برگ با سویه A_4 آگروباکتریوم و محیط کشت ۱/۲MS بود.

واژه های کلیدی: سویه اگروباکتریوم، گیاه دارویی، متابولیت ثانویه، نوع ریزنمونه، *Valeriana officinalis* L.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۵۳۳۵۱۰۱۴۰ ، پست الکترونیکی: nzare@uma.ac.ir

مقدمه

گیاه دارویی سنبل‌الطیب با نام علمی *Valeriana officinalis* L. در پزشکی به عنوان مسکن، آرام‌بخش، خواب‌آور، درمان اسپاسم، هیجان، میگرن و روماتیسم کاربرد دارد (۸). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده که اثر آرام‌بخشی سنبل‌الطیب مربوط به روغن فرار و ترکیبات والپوتریات آن است. هم‌چنین مشخص شده است که والرنال و اسید والرنیک از قوی‌ترین ترکیبات آرام بخش

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

موجود در گیاه سنبل‌الطیب هستند. مقدار این ترکیبات در ریشه‌ها زیاد و در اندام‌های هوایی کم هستند (۳۶ و ۴۲).

یکی از بخش‌های مهم زیست‌فناوری، کشت سلول، بافت و اندام گیاهی است که کاربردهای آن در زمینه گیاهان دارویی، از جنبه‌های مختلفی از جمله تولید ریشه‌مویین قابل بررسی است. ریشه‌های مویین دارای ویژگی‌هایی چون سرعت رشد بالا در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، انشعابات فرعی فراوان، پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی بوده و در مقایسه با ریشه‌های معمولی گیاه، در برخی مواقع سطح بالاتری از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند. بنابراین، می‌توان از آن‌ها به عنوان منبع مداومی برای تولید متابولیت‌های ثانویه با اهمیت، در بیوراکتور برای تولید نیمه صنعتی و صنعتی استفاده کرد (۱۸، ۲۰ و ۳۰). ریشه‌های مویین از طریق تراریختی سلول‌های گیاهی با اگروباکتریوم رایزوژنز تولید می‌شوند (۱۱). عوامل متعددی تراریختی سلول‌های گیاه به واسطه اگروباکتریوم رایزوژنز و تولید ریشه‌های مویین را تحت تأثیر قرار می‌دهند که از مهمترین این عوامل می‌توان به ژنوتیپ، زخمی شدن بافت گیاهی، سنتز القاکننده‌های فنولی توسط گیاه، سویه اگروباکتریوم، نوع ریزنمونه و شرایط تلقیح و هم‌کشتی اشاره کرد (۲۶). در طبیعت اگروباکتریوم اساساً به بافت‌های زخمی حمله می‌کند، بافت زخمی ترکیباتی از جمله فنول‌ها (نظیر استوسیرینگون و آلفا هیدروکسی استوسیرینگون) و قندها را ترشح می‌کند و شرایطی از جمله pH پایین را ایجاد می‌کند که این شرایط یک محیط مناسب برای باکتری بوده و بیان ژن‌های *vir* را القاء می‌کند (۴۳). در شرایط آزمایشگاهی از روش‌های مختلفی برای القای ریشه‌های مویین استفاده می‌شود. به عبارت دیگر تماس بین سلول‌های گیاهی و باکتری به‌وسیله تزریق مستقیم سوسپانسیون باکتری به داخل گیاهچه یا توسط غوطه‌ورسازی بافت‌های گیاهی در سوسپانسیون باکتری امکان‌پذیر است (۳۹). انتقال T-DNA از *A. rhizogenes* به ژنوم گیاهی فرایند پیچیده‌ای است که تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر سویه باکتری (۱۳ و ۱۷)، نوع و سن ریزنمونه گیاهی (۲۵) و دوره هم کشتی (۷) قرار می‌گیرد. دلیل این پدیده را می‌توان در قالب اثرات متقابل گیاه–پاتوژن بررسی کرد. Bandyopadhyay و همکاران (۶) نشان دادند که الحاق T-DNA به داخل ژنوم گیاه می‌تواند مرتبط با نوع سویه باکتریایی و تعداد نسخه‌های انتقال یافته باشد که این امر بر رشد و متابولیسم ثانویه ریشه‌های مویین تراریخته اثر می‌گذارد. Granicher و همکاران (۱۹) برای اولین بار موفق به تولید ریشه مویین در گیاه *Valeriana sambucifolia* شدند. Pirian و همکاران (۳۵) تراریختی ریزنمونه‌های مختلف برگ، ساقه و ریشه گیاه *Portulaca oleracea* با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز را مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که ریزنمونه‌های برگ همراه با دمبرگ در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها بیشترین درصد تراریختی را نشان دادند. اگروباکتریوم اساساً به بافت‌های زخمی حمله می‌کند، بافت زخمی ترکیباتی از جمله فنول‌ها (نظیر استوسیرینگون و آلفا هیدروکسی استوسیرینگون) و ترکیبات قندی را ترشح می‌کند و شرایطی از جمله pH پایین را ایجاد می‌کند که این شرایط باعث تحریک سیستم بیماری‌زایی اگروباکتریوم و القاء بیان ژن‌های *vir* می‌شود (۴۳). به‌عبارت دیگر، استوسیرینگون و مشتقات آن باعث افزایش قدرت تراریختی اگروباکتریوم از طریق افزایش بیان ژن‌های *vir* در پلاسمید باکتری می‌گردند (۲۰).

باتوجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه موجود در ریشه گیاه دارویی سنبل‌الطیب و در معرض خطر قرارگرفتن این گیاه به خاطر برداشت بی‌رویه ریشه آن از رویشگاه‌های طبیعی، استفاده از روش‌ها و رهیافت‌های بیوتکنولوژی برای تولید متابولیت‌های ثانویه این گیاه از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین، با ارزیابی میزان پاسخ‌دهی سنبل‌الطیب به آلودگی با سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و میزان پاسخ‌دهی به ریزنمونه ها و شرایط کشت مختلف می‌توان از آن به‌عنوان یک گیاه بالقوه برای انتقال ژن و مهندسی

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

ژنتیک در جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه با استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی نیز بهره برد. به‌طوری‌که بهینه‌سازی هریک از عوامل موثر در القاء و رشد ریشه‌های مویین ممکن است افزایش بازده تولید ترکیبات دارویی را از طریق کشت ریشه‌های مویین گیاه سنبل‌الطیب به دنبال داشته باشد. لذا، در این پژوهش امکان تولید ریشه‌های مویین از گیاه *Valeriana officinalis* L. به کمک سویه-های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز، تأثیر عوامل مختلف (مدت زمان تلقیح، مدت زمان هم کشتی، نوع ریزنمونه، سویه باکتری و نوع محیط کشت) مؤثر در اثر متقابل بین سلول باکتری و سلول گیاهی بر تولید ریشه‌های مویین، همچنین تکثیر ریشه‌های مویین در محیط کشت مایع و میزان تولید والرنیک اسید در این ریشه‌ها مورد ارزیابی قرارگرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه‌ها: بذور سنبل‌الطیب ازشرکت پاکان بذر (اصفهان، ایران) تهیه شدند. بذور پس از شستشو با آب مقطر به‌مدت چند دقیقه، ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به‌مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم دو درصد تیمار شدند. سپس بذرهای ضدعفونی‌شده سه بار و هربار به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شده و آب اضافی با کاغذ صافی استریل حذف گردید. بذور ضدعفونی شده در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS جامد کشت شده و در اتاقک رشد با شرایط دمایی ^{0}C ۲±۲۵ و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با نور فلورسنت نگهداری شدند. بعد از جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه‌ها (هفته سوم تا چهارم کشت)، ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ سنبل‌الطیب در قطعاتی به اندازه ۲-۱ سانتی‌متر به‌وسیله اسکالپل تیز و استریل در زیر هود لامینار تهیه گردید و به منظور تلقیح با اگروباکتریوم رایزوژنز مورد استفاده قرارگرفتند.

سویه باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها: سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز شامل A_4، ۱۵۸۳۴ و ۲۶۵۶ به منظور القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی سنبل‌الطیب مورد استفاده قرارگرفتند. به‌منظور کشت سویه‌های باکتری از محیط کشت جامد MYA به همراه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین (برای جلوگیری از رشد باکتری‌های دیگر و صرفا رشد باکتری مورد نظر) استفاده گردید. یک کلونی از سویه باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MYAمایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم برلیتر ریفامپسین منتقل گردیده و به‌صورت شبانه در ^{0}C ۲۸ و ۱۲۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. سپس حدود یک میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MYA مایع تازه حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین اضافه گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به OD_{600} برابر با ۰/۸-۰/۶ رشد داده شدند. برای اندازه‌گیری OD_{600} ، مقدار یک میلی‌لیتر از باکتری رشد داده شده در دستگاه اسپکتروفتومتر(BIORAD, SmartspecTM plus– ساخت کشور آمریکا) قرارداده شد و تغییرات جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. از محیط کشت بدون باکتری به‌عنوان بلانک استفاده شد. از این سوسپانسیون باکتری برای تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی استفاده شد. سپس ریزنمونه‌های تهیه‌شده در سوسپانسیون باکتری و در حضور و عدم حضور استوسرینگون (۱۰۰ میکرومولار) به مدت زمان ۱۰ و ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و پس از حذف باکتری اضافی با کاغذ صافی استریل، روی محیط کشت MS فاقد هورمون‌های گیاهی و آنتی‌بیوتیک به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی هم‌کشت شدند. پس از سپری شدن مدت زمان هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت جامد MS و ۱/۲MS بدون هورمون و حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (جهت جلوگیری از رشد آگروباکتریوم) منتقل شدند. زیرکشت ریزنمونه‌ها با فواصل یک هفته‌ای انجام شد (۲ و ۳۱). لازم به ذکر است ریزنمونه‌های تیمار شده با

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

محیط کشت بدون باکتری به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

آنالیز مولکولی ریشه‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): استخراج DNA ژنومی ریشه‌های تراریخت احتمالی با استفاده از روش CTAB، با اندکی تغییرات طبق روش Doyle و Doyle (۱۶) انجام گرفت. به‌منظور اثبات مولکولی ماهیت تراریخت ریشه‌های مویین از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *rol*B (آغازگر رفت با توالی-5'-gctcttgcagtgctagattt-3' و آغازگر برگشت با توالی-5'-gaaggtgcaagctacctctc-3') و ژن *rol*C (آغازگر رفت با توالی-5'-ctcctgacatcaaactcgtc-3' و آغازگر برگشت با توالی-5'-tgcttcgagttatgggtaca-3') استفاده شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱درصد، با استفاده از دستگاه ژل‌داک مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند.

عوامل مورد بررسی در تلقیح ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب با اگروباکتریوم رایزوژنز: در این پژوهش تأثیر نوع سویه (A_4، ۱۵۸۳۴ و ۲۶۵۶) اگروباکتریوم رایزوژنز، نوع ریزنمونه (برگ و دمبرگ)، نوع محیط کشت (MS و MS ۱/۲) و شرایط آلوده‌سازی شامل سه تیمار استوسرینگون (صفر و ۱۰۰ میکرومولار)، مدت زمان تلقیح (۱۰ و ۱۵ دقیقه) و مدت زمان هم‌کشتی (۴۸ و ۷۲ ساعت) بر القای ریشه‌های مویین مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول۱). سه هفته بعد از تلقیح ریزنمونه‌ها، درصد ریشه‌زایی مویین (رابطه۱) و هم‌چنین تعداد ریشه‌های مویین در هر ریزنمونه ثبت گردید.

$$\text{درصد ریشه‌زایی} = \frac{\text{تعداد ریزنمونه های ریشه داده}}{\text{تعداد کل ریزنمونه ها}} \times 100 \quad \text{(رابطه ۱)}$$

اندازه‌گیری میزان والرنیک اسید ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب با استفاده از HPLC: پس از رشد ریشه‌های مویین به اندازه یک تا سه سانتی‌متر روی محیط جامد، ریشه‌ها از ریزنمونه جدا شده و به محیط کشت MS مایع منتقل شدند. ریشه‌ها هر دو هفته یک بار زیرکشت شدند و برای استخراج متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه حدود ۰/۵ گرم از ریشه‌های مویین در داخل ازت مایع پودر گردید و سپس درون یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه شده و دو نوبت به‌مدت ۴۰ دقیقه درون حمام اولتراسوند قرار داده شد. محلول حاصل با سیستم فیلتراسیون شیشه‌ای (سینتردگلس) و فیلتر ۰/۲ میکرومتری فیلتر شد، سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان خشک شدن عصاره در دستگاه آون نگهداری شد و در نهایت با ۵۰۰ میکرولیتر متانول رقیق گردید. عصاره حاصل برای تزریق به دستگاه HPLC استفاده شد (۲۹). دراین تحقیق برای اندازه‌گیری والرنیک اسید از سیستم Agilent HPLC (1200 series, Diode array detector) استفاده گردید. ۱۰ میکرولیتر از عصاره سلولی به ستون C-18 فاز معکوس Agilent طول ۱۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر پر شده با ذراتی به قطر ۵ میکرومتر (Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4.6 × 150 mm) تزریق گردید. فاز متحرک شامل آب با ۰/۳ درصد فسفریک اسید و متانول با ۰/۳ درصد فسفریک اسید بود که با سرعت جریان 1 ml/min از ستون عبور می‌کرد. ابتدا دیتکتور UV به مدت ۱۵دقیقه گرم شد و قبل از تزریق نمونه، فاز متحرک به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایش از ستون جداسازی عبور داده شد. سپس با استفاده از سرنگ ۱۰ میکرولیتر از عصاره به دستگاه تزریق گردید. جذب نوری خروجی ستون در طول موج ۲۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. سنجش کمی با استفاده از منحنی استاندارد والرنیک اسید انجام گرفت (۲۹). اندازه‌گیری میزان والرنیک اسید در سه تکرار انجام شد.

آنالیز آماری: طرح آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و حداقل ۱۲ ریزنمونه در هر تکرار انجام گرفت.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

جدول۱ – شرایط آلوده‌سازی مختلف، سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز و محیط کشت مورد بررسی در تلقیح ریزنمونه‌های گیاه سنبل‌الطیب با اگروباکتریوم رایزوژنز

تیمار تلقیح	استوسرینگون (میکرومولار)	زمان تلقیح (دقیقه)	زمان (ساعت)	هم‌کشتی	سویه باکتری	محیط کشت
T1	۰	۱۰	۴۸		A4	MS۱/۲
T1	۰	۱۰	۴۸		A4	MS
T1	۰	۱۰	۴۸		۱۵۸۳۴	MS۱/۲
T1	۰	۱۰	۴۸		۱۵۸۳۴	MS
T1	۰	۱۰	۴۸		۲۶۵۶	MS۱/۲
T1	۰	۱۰	۴۸		۲۶۵۶	MS
T2	۰	۱۰	۷۲		A4	MS۱/۲
T2	۰	۱۰	۷۲		A4	MS
T2	۰	۱۰	۷۲		۱۵۸۳۴	MS۱/۲
T2	۰	۱۰	۷۲		۱۵۸۳۴	MS
T2	۰	۱۰	۷۲		۲۶۵۶	MS۱/۲
T2	۰	۱۰	۷۲		۲۶۵۶	MS
T3	۰	۱۵	۴۸		A4	MS۱/۲
T3	۰	۱۵	۴۸		A4	MS
T3	۰	۱۵	۴۸		۱۵۸۳۴	MS۱/۲
T3	۰	۱۵	۴۸		۱۵۸۳۴	MS
T3	۰	۱۵	۴۸		۲۶۵۶	MS۱/۲
T3	۰	۱۵	۴۸		۲۶۵۶	MS
T4	۰	۱۵	۷۲		A4	MS۱/۲
T4	۰	۱۵	۷۲		A4	MS
T4	۰	۱۵	۷۲		۱۵۸۳۴	MS۱/۲
T4	۰	۱۵	۷۲		۱۵۸۳۴	MS
T4	۰	۱۵	۷۲		۲۶۵۶	MS۱/۲
T4	۰	۱۵	۷۲		۲۶۵۶	MS
T5	۱۰۰	۱۰	۴۸		A4	MS۱/۲
T5	۱۰۰	۱۰	۴۸		A4	MS
T5	۱۰۰	۱۰	۴۸		۱۵۸۳۴	MS۱/۲
T5	۱۰۰	۱۰	۴۸		۱۵۸۳۴	MS
T5	۱۰۰	۱۰	۴۸		۲۶۵۶	MS۱/۲
T5	۱۰۰	۱۰	۴۸		۲۶۵۶	MS
T6	۱۰۰	۱۰	۷۲		A4	MS۱/۲
T6	۱۰۰	۱۰	۷۲		A4	MS
T6	۱۰۰	۱۰	۷۲		۱۵۸۳۴	MS۱/۲
T6	۱۰۰	۱۰	۷۲		۱۵۸۳۴	MS
T6	۱۰۰	۱۰	۷۲		۲۶۵۶	MS۱/۲
T6	۱۰۰	۱۰	۷۲		۲۶۵۶	MS
T7	۱۰۰	۱۵	۴۸		A4	MS۱/۲
T7	۱۰۰	۱۵	۴۸		A4	MS
T7	۱۰۰	۱۵	۴۸		۱۵۸۳۴	MS۱/۲
T7	۱۰۰	۱۵	۴۸		۱۵۸۳۴	MS
T7	۱۰۰	۱۵	۴۸		۲۶۵۶	MS۱/۲
T7	۱۰۰	۱۵	۴۸		۲۶۵۶	MS
T8	۱۰۰	۱۵	۷۲		A4	MS۱/۲
T8	۱۰۰	۱۵	۷۲		A4	MS
T8	۱۰۰	۱۵	۷۲		۱۵۸۳۴	MS۱/۲
T8	۱۰۰	۱۵	۷۲		۱۵۸۳۴	MS
T8	۱۰۰	۱۵	۷۲		۲۶۵۶	MS۱/۲
T8	۱۰۰	۱۵	۷۲		۲۶۵۶	MS

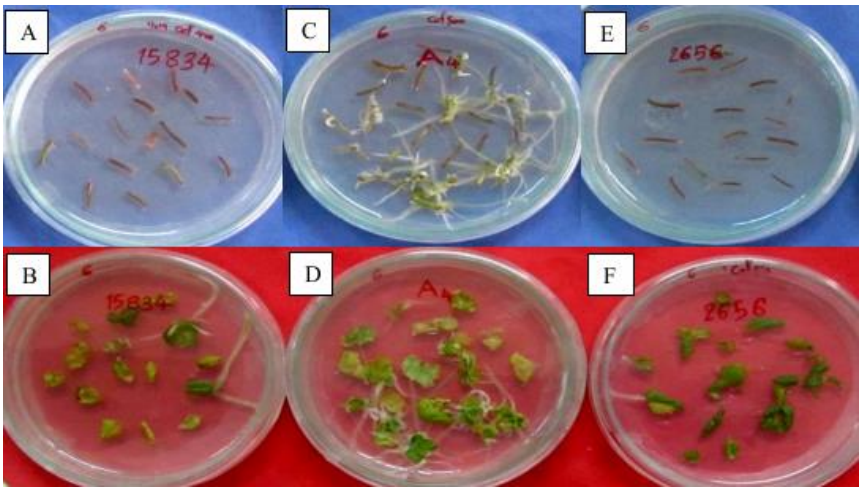
فاکتورهای مورد بررسی شامل نوع سویه آگروباکتریوم، نوع ریزنمونه، شرایط تلقیح و نوع محیط کشت بود. محاسبات آماری و تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS *ver*. 23 و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. مقایسات

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

گروهی با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج

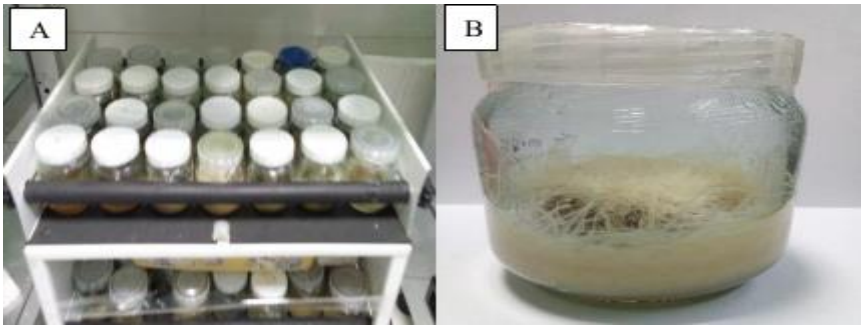
اثر عوامل مختلف مؤثر بر القای ریشه مویین: بعد از گذشت دو تا سه هفته از تلقیح ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه سنبل‌الطیب با سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه‌های مویین ظاهر گردید (شکل۱). نمونه-هایی از ریشه‌های مویین تولید و تکثیر یافته در محیط کشت‌های جامد و مایع در شکل‌های ۲ و ۳ آورده شده است. ریشه‌زایی سویه ۲۶۵۶ در هر دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بسیار کم و بیش از نیمی از داده‌های مربوطه صفر بود، بنابراین، در تجزیه و تحلیل نهایی داده‌ها از این سویه صرف نظر گردید.



شکل۱- القای ریشه‌مویین در گیاه سنبل‌الطیب با استفاده از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در محیط ۱/۲MS و تحت شرایط تیمار T6، A و B (سویه ۱۵۸۳۴)، C و D (سویه A4)، E و F (سویه ۲۶۵۶)

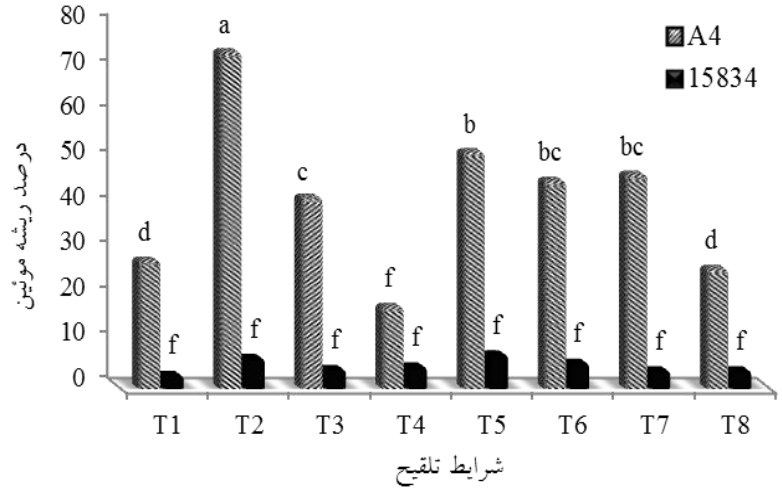
شکل ۲- اثر محیط‌های کشت MS و ۱/۲MS بر ریشه‌زایی برگ و دمبرگ با سویه A4 و تحت شرایط تیمار T6، شکل‌های A، B، C و D: ریشه-های مویین تولید شده روی محیط ۱/۲MS، شکل‌های E، F، G و H: ریشه‌های مویین تولید شده روی محیط MS

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8



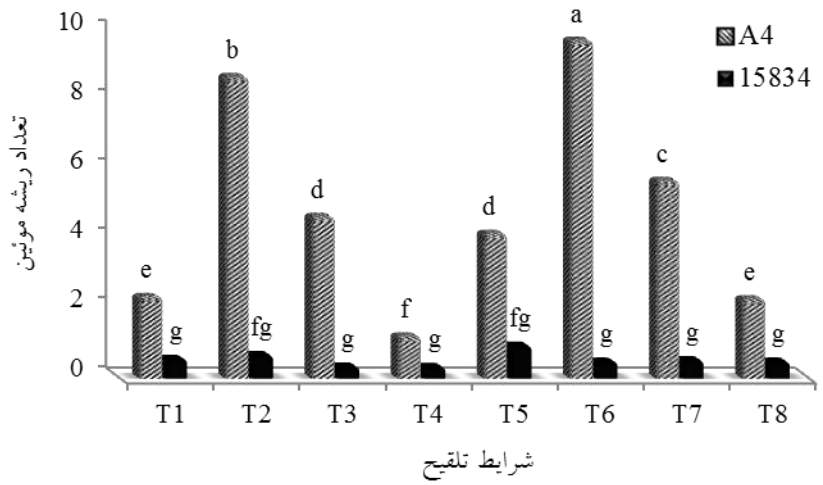
شکل ۳- A) انتقال ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب به شیشه‌های حاوی محیط کشت MS ۱/۲ و MS مایع و نگهداری آن‌ها روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، B) رشد کامل ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب در محیط کشت MS ۱/۲مایع

درصد القای ریشه مویین و تعداد ریشه مویین در هر ریزنمونه تحت تأثیر نوع سویه اگروباکتریوم، نوع ریزنمونه، شرایط تلقیح و اثرات متقابل بین آنها قرارگرفت. ارزیابی ترکیب تیماری نوع سویه و شرایط تلقیح نشان داد که سویه A_4 در تمامی سطوح شرایط تلقیح از نظر درصد و تعداد ریشه‌مویین در هر دو ریزنمونه برگ و دمبرگ مؤثرتر از سویه ۱۵۸۳۴ بود. بطوری‌که سویه A_4 در سطح تیمار T2 (تلقیح به مدت ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۷۴/۱۶ درصد بیشترین درصد ریشه‌مویین و سویه ۱۵۸۳۴ در سطح تیمار T1 (تلقیح به مدت ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۴۸ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۳/۱۵ درصد کمترین درصد ریشه‌مویین را داشت. درصد ریشه‌مویین و تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه حاصل از سویه اگروباکتریوم ۱۵۸۳۴ در تمامی سطوح شرایط تلقیح از نظر آماری یکسان بوده ولی برای سویه A_4 درصد ریشه‌زایی مویین و تعداد ریشه در هر ریزنمونه از سطحی به سطح دیگر متفاوت بود (شکل های ۴ و ۵). همانطوریکه در شکل‌های ۴ و ۵ مشاهده می‌شود در سویه A_4 استفاده از استوسرینگون باعث افزایش تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه و درصد ریشه‌زایی مویین (به غیر از تیمار تلقیح T6برای درصد ریشه‌زایی موئین) نسبت به شرایط عدم استفاده از استوسرینگون شده است. ولی استوسرینگون در کارایی تراریختی توسط سویه ۱۵۸۳۴ تأثیر معنی‌داری نداشته است.



شکل ۴- میانگین درصد ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب در ترکیب‌های تیماری متفاوت سویه اگروباکتریوم و شرایط تلقیح؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

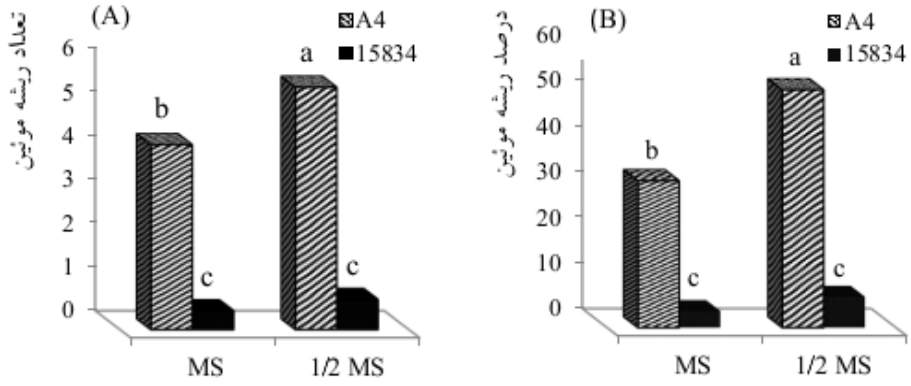
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8



شکل ۵- میانگین تعداد ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب در ترکیب‌های تیماری سویه اگروباکتریوم و شرایط تلقیح؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

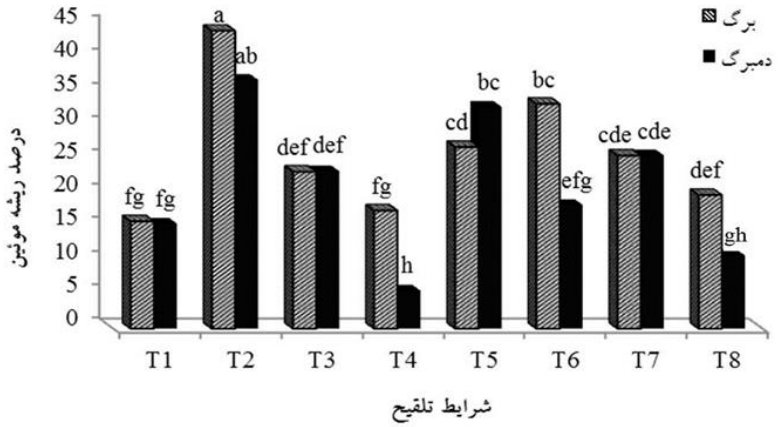
در مورد صفت تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه، سویه A_4 در سطح تیمار T6 (تلقیح به مدت ۱۰ دقیقه و هم-کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) با میانگین ۹/۷۵ بیشترین تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه، و سویه ۱۵۸۳۴ در سطح تیمار T4 (تلقیح به مدت ۱۵ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۰/۳۵ کمترین تعداد ریشه‌مویین را داشت (شکل ۵).

ارزیابی ترکیب تیماری سویه اگروباکتریوم و نوع محیط کشت نشان داد که بیشترین درصد و تعداد ریشه‌مویین متعلق به سویه A_4 به ترتیب با میانگین ٪۵۱/۷۱ (در محیط کشت ۱/۲MS) و ۵/۵۳ عدد (در محیط کشت ۱/۲MS)، و کمترین درصد و تعداد ریشه‌مویین متعلق به سویه ۱۵۸۳۴ به ترتیب با میانگین ٪۳/۶ و ۰/۴۳ عدد در محیط کشت MS است (شکل ۶). همانطوری‌که در شکل ۶ مشاهده می‌شود سویه ۱۵۸۳۴ در هر دو محیط کشت MS و ۱/۲MS پاسخ یکسان و پایینی را نشان داده ولی پاسخ سویه A_4 در محیط کشت‌های MS و ۱/۲MS متفاوت بود (شکل ۶).



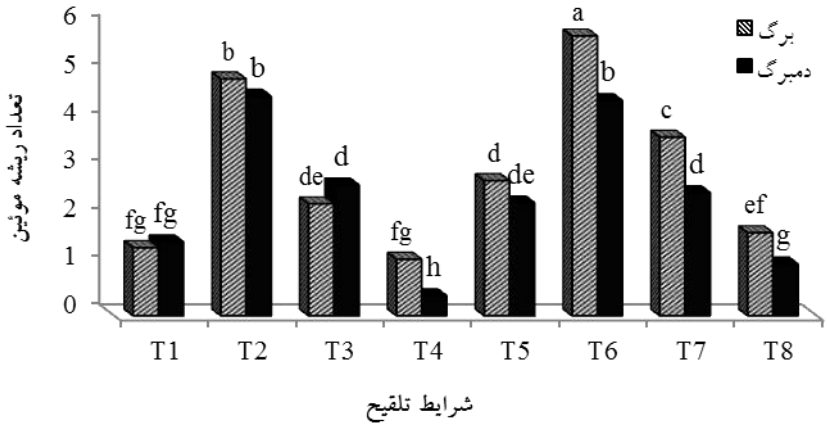
شکل۶- اثر سویه اگروباکتریوم و نوع محیط کشت بر تعداد (A) و درصد ریشه مویین (B) در گیاه سنبل‌الطیب؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8



شکل ۷- میانگین درصد ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب در ترکیب‌های تیماری متفاوت ریزنمونه گیاهی و شرایط تلقیح؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

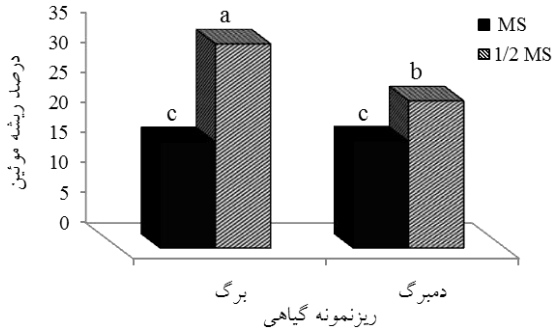
کمترین درصد ریشه مویین با ریزنمونه برگ در سطح تیمار تلقیح T1 (تلقیح به مدت ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۴۸ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۱۵/۹ درصد و کمترین درصد ریشه مویین توسط ریزنمونه دمبرگ در سطح تیمار تلقیح T4 (تلقیح به مدت ۱۵ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۵/۶۲ درصد به دست آمد (شکل ۷). در مورد صفت تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه، نیز ریزنمونه برگ در سطح تیمار تلقیح T6 (مدت زمان ۱۰ دقیقه تلقیح و هم‌کشتی ۷۲ ساعت و حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) با میانگین ۵/۸ و ریزنمونه دمبرگ در سطح تیمار تلقیح T6 و T2 (۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۴/۵۵ بیشترین تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه را داشتند (شکل ۸).



شکل ۸- میانگین تعداد ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب در ترکیب‌های تیماری ریزنمونه گیاهی و شرایط تلقیح؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

ارزیابی ترکیب تیماری ریزنمونه و محیط کشت نشان داد که درصد ریشه‌زایی مویین هر دو ریزنمونه مورد استفاده در محیط MS یکسان بوده و در محیط ۱/۲MS درصد ریشه‌زایی مویین ریزنمونه برگ به‌طور معنی‌داری بیشتر از دمبرگ بود (شکل ۹).

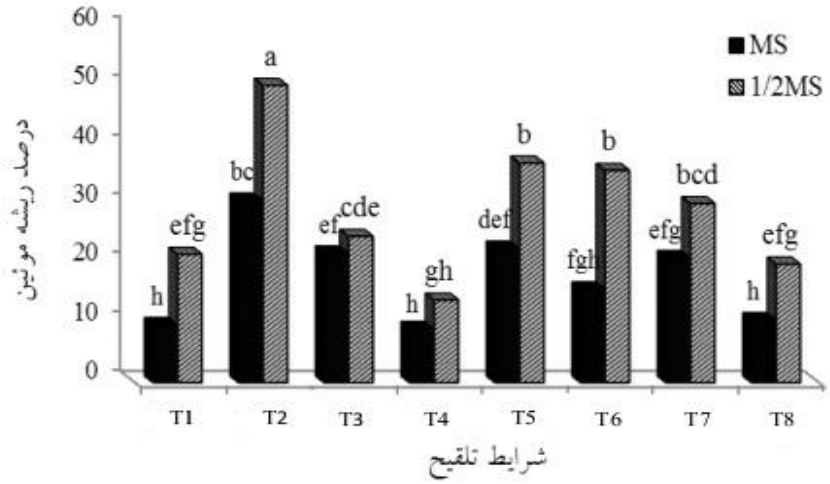
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8



شکل ۹- درصد ریشه زایی مویین ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در محیط کشت‌های MS و ۱/۲MS؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

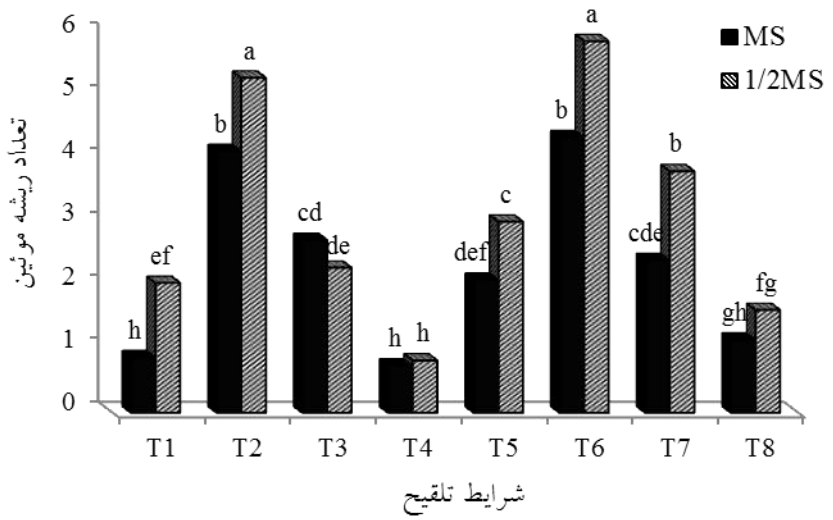
ارزیابی ترکیب تیماری محیط کشت پایه و شرایط تلقیح نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی مویین در محیط کشت ۱/۲MS در سطح تیمار T2 (تلقیح ۱۰ دقیقه و هم-کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۵۰/۲ درصد و کمترین آن در محیط کشت MS در شرایط تلقیح T4 (تلقیح به مدت ۱۵ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۹/۱۶ درصد بدست آمده است (شکل۱۰). در مورد صفت تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه، نیز محیط کشت ۱/۲MS در شرایط تلقیح T6 (تلقیح به مدت ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) با میانگین ۵/۸۹ بیشترین تعداد ریشه‌مویین و محیط کشت MS در سطح تیمار T4 (تلقیح به مدت ۱۵ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت و بدون استوسرینگون) با میانگین ۰/۷۵ کمترین تعداد ریشه‌مویین را داشت. تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه، حاصل از محیط کشت ۱/۲MS و MS در سطوح شرایط تلقیح T2 (۱۰ دقیقه تلقیح و هم‌کشتی ۷۲ ساعت و بدون استوسرینگون) و T6 (۱۰ دقیقه تلقیح و هم‌کشتی ۷۲ ساعت و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) از نظر آماری کاملاً یکسان بود. در حالی‌که در شرایط ۱۰ دقیقه تلقیح و ۴۸ ساعت هم‌کشتی (T1) استفاده از استوسرینگون (T5) باعث افزایش معنی‌دار هر دو صفت درصد ریشه‌زایی مویین و تعداد ریشه‌مویین در هر دو محیط کشت MS و ۱/۲MS شده است (شکل های ۱۰و ۱۱). ولی چنین روندی در شرایط ۱۵ دقیقه تلقیح ریزنمونه و ۷۲ ساعت هم‌کشتی (T4 در مقایسه با T8) مشاهده نمی‌شود.

ارزیابی ترکیب سه‌تایی نوع سویه اگروباکتریوم، ریزنمونه و شرایط تلقیح نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ترکیب‌های تیماری از نظر درصد ریشه‌زایی مویین و تعداد ریشه در هر ریزنمونه وجود دارد.



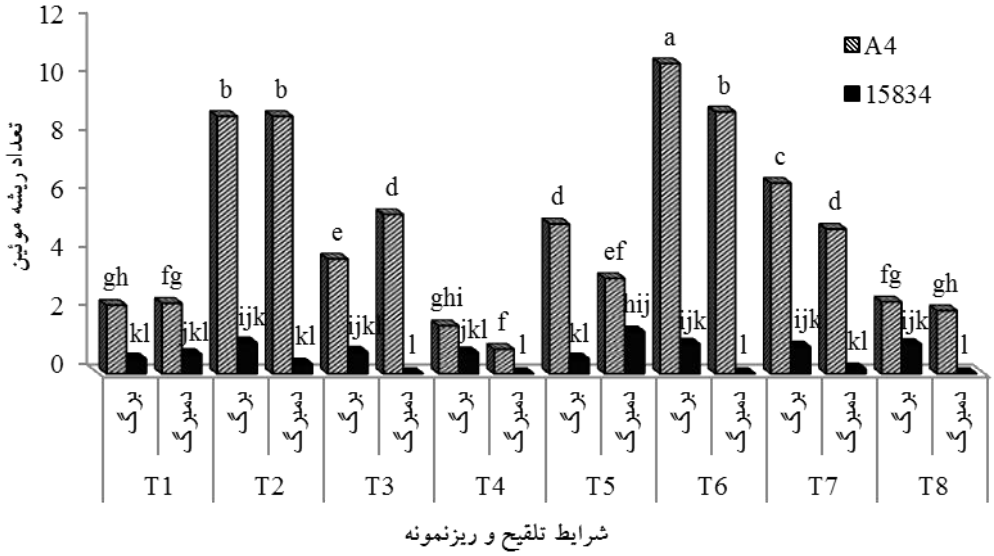
شکل ۱۰- میانگین درصد ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب در ترکیب تیماری شرایط تلقیح و محیط کشت؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8



شکل ۱۱- میانگین تعداد ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب در ترکیب شرایط تلقیح و محیط کشت؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

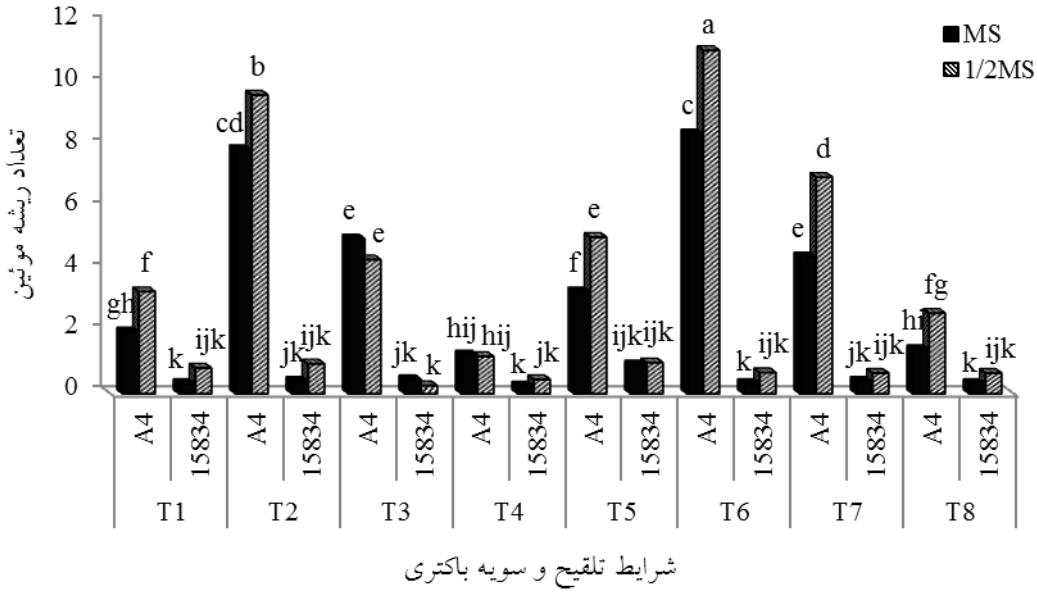
بطوری‌که سویه A_4 با ریزنمونه برگ و در شرایط تلقیح T6 (به مدت ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) بیشترین تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه (۱۰/۵۸) و سویه ۱۵۸۳۴ با ریزنمونه دمبرگ و در شرایط تلقیح T3 و T4 و نیز T6 و T8 کمترین تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه را داشتند. در ریزنمونه دمبرگ بیشترین تعداد ریشه‌مویین حاصل از سویه A_4 با میانگین ۸/۹۳ در سطح تیمار تلقیح T6 (تلقیح ۱۰ دقیقه + هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط استفاده از ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) مشاهده شد. بیشترین تعداد ریشه‌مویین حاصل از سویه ۱۵۸۳۴ با میانگین ۱/۴۳ در ریزنمونه دمبرگ و شرایط تلقیح T5 (۱۰ دقیقه + هم کشتی ۴۸ ساعت و شرایط ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) مشاهده شد (شکل ۱۲).



شکل ۱۲- مقایسه میانگین اثر متقابل سویه، ریزنمونه و شرایط تلقیح بر تعداد ریشه مویین؛ حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

ارزیابی ترکیب سه عامل نوع سویه، محیط کشت و شرایط تلقیح نشان داد که سویه A_4 در محیط کشت ۱/۲MS و تیمار T6 (تلقیح به‌مدت ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط ۱۰۰µM استوسرینگون) بیشترین تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه با میانگین ۱۱/۱۰ و سویه ۱۵۸۳۴ در محیط کشت MS و تیمار T4 (تلقیح ۱۵ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) کمترین تعداد ریشه‌مویین با میانگین ۰/۲۵ را ایجاد کرده است. همچنین کمترین تعداد ریشه‌مویین حاصل از سویه A_4 با میانگین ۱/۲۰ در محیط کشت ۱/۲MS و تیمار T4 (تلقیح ۱۵ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) و نیز بیشترین تعداد ریشه‌مویین (با میانگین ۱ ریشه‌مویین در هر ریزنمونه) حاصل از سویه ۱۵۸۳۴ در محیط کشت ۱/۲MS و تیمار T2 (تلقیح ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) به دست آمد (شکل ۱۳). همانطوری‌که در شکل ۱۳ مشاهده می‌شود استفاده از استوسرینگون در سویه A_4 کارایی تراریختی اگروباکتریوم را از نظر تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه در محیط ۱/۲MS بطور معنی‌داری نسبت به عدم استفاده از استوسرینگون افزایش داده است. در حالیکه چنین افزایشی معنی‌داری در محیط MS و همچنین سویه ۱۵۸۳۴ در هیچ کدام از محیط کشت‌های پایه مشاهده نشده است. این امر نشان می‌دهد که اثر متقابل بین عوامل فوق در تراریختی ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب و تولید ریشه‌های مویین بیشتر ناشی از سویه A_4 است.



شکل ۱۳- میانگین تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه، سنبل‌الطیب در ترکیب‌های تیماری سویه، شرایط تلقیح و محیط کشت، حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

مقایسه تیمار شاهد (بدون تلقیح با اگروباکتریوم) با بقیه تیمارها از نظر درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه: ریزنمونه‌های تلقیح نشده با آگروباکتریوم رایزوژنز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بنابراین تیمار شاهد شامل همه مراحل به‌جز تلقیح با آگروباکتریوم بود. مقایسه گروهی تیمار شاهد در برابر تیمارهای تلقیح با اگروباکتریوم نشان داد که بین این دو گروه از نظر هر دو صفت درصد ریشه‌زایی مویین و تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

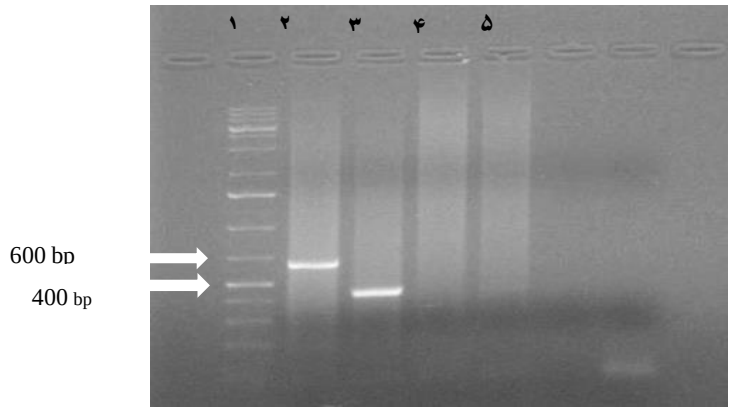
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

جدول ۲- مقایسه گروهی تیمار شاهد در برابر تیمارهای تلقیح با اگروباکتریوم از نظر صفات درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه گیاه سنبل‌الطیب

		میانگین مربعات	
منابع تغییر	درجه آزادی	درصد ریشه مویین	تعداد ریشه مویین
شاهد در برابر بقیه	۱	۳۴۹۱/۰۱۶ **	۴۵/۷۴۳ **
خطا	۱۳۶	۰/۱۶۴	۰/۰۱۴

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد

تایید مولکولی ریشه‌های مویین: برای بررسی حضور ژن‌های *rol*B و *rol*C در لاین ریشه‌مویین و در نتیجه تأیید ماهیت تراریختی آن، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژنهای *rol*B و *rol*C استفاده شد. حضور نوار با طول ۵۸۶ جفت باز برای ژن *rol*C و با طول ۳۸۳ جفت باز برای ژن *rol*B در ریشه‌های مویین نشانگر تراریخت بودن این ریشه‌ها توسط اگروباکتریوم رایزوژنز می‌باشد (شکل ۱۴).



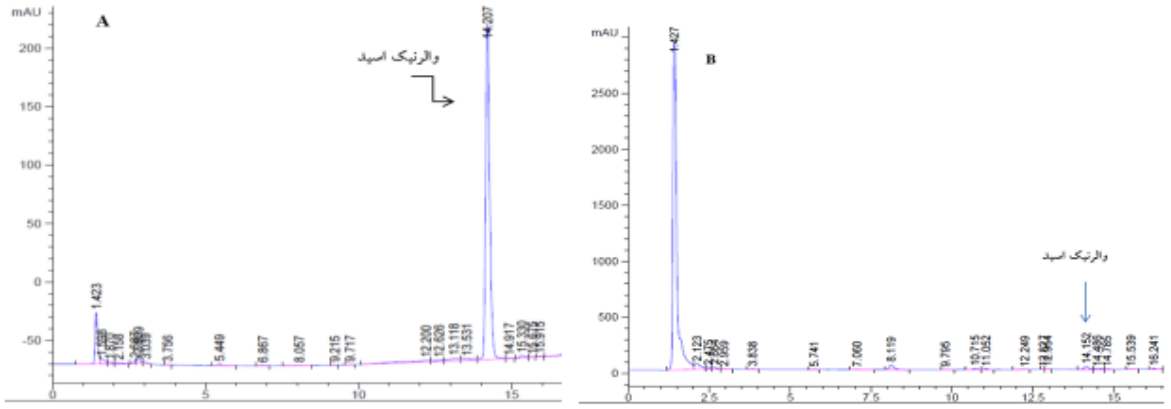
شکل ۱۴- بررسی تراریختی ریشه‌های مویین، ستون ۱ : مارکر 1 Kb، ستون ۲ : DNA ریشه مویین تراریخت احتمالی با آغازگرهای اختصاصی ژن rolC، ستون ۳: DNA ریشه‌مویین تراریخت احتمالی با آغازگرهای اختصاصی ژن rolB، ستون ۴ و ۵ : DNA گیاه غیرتراریخت بترتیب با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های rolC و rolB

ندازه‌گیری والرنیک اسید در ریشه‌های مویین: به منظور ارزیابی تولید و تجمع متابولیت والرنیک اسید از تجزیه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) استفاده شد (شکل۱۵). نتایج حاصل از HPLC نشان داد که والرنیک اسید با مقدار ۳/۷۷ میلی‌گرم برلیتر در کشت‌های ریشه‌مویین سنبل‌الطیب تولید و تجمع می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان از کشت ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب به عنوان یک رهیافت جایگزین برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش این گیاه دارویی استفاده کرد.

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر بین سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز، نوع ریزنمونه‌ها، شرایط تلقیح و محیط کشت از نظر صفات درصد ریشه‌زایی مویین و تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه سنبل‌الطیب اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل۴). بطوری‌که پاسخ تراریختی ریزنمونه‌های گیاه سنبل‌الطیب به سویه A_4 در مقایسه با سویه‌های ۱۵۸۳۴ و ۲۶۵۶ بهتر بود.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8



شکل ۱۵- کروماتوگرام HPLC (A): والرنیک اسید (استاندارد) و (B) عصاره ریشه‌مویین سنبل‌الطیب

سویه A_4 با میانگین ۴۱/۸ درصد ریشه‌زایی‌مویین و ۴/۸۷ ریشه‌مویین در هر ریزنمونه از پتانسیل القای ریشه‌مویین بیشتری نسبت به سویه ۱۵۸۳۴ با میانگین ۵/۱۵ درصد ریشه‌زایی مویین و ۰/۷ ریشه‌مویین در هر ریزنمونه برخوردار بود. این تفاوت در قابلیت تراریختی را می‌توان به تفاوت در قدرت بیماری‌زایی سویه‌ها به‌دلیل پلاسمیدهای متفاوت قرارگرفته در سویه‌های باکتری و همچنین بیان متفاوت ژن‌های T-DND درج شده در ژنوم گیاه بواسطه اثرات محل درج T-DND در ژنوم گیاه نسبت داد (۵ و۳۱). چنین تفاوتی در گیاهان و ریزنمونه‌های مختلف گزارش شده است. برای مثال Baskaran و Jayabalan (۹) با به‌کارگیری سویه‌های A_4 و ۱۵۸۳۴ و مدت زمان‌های مختلف هم‌کشتی (۰، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت) برای القای ریشه‌های مویین در *Psoralea coryfolia*، دریافتند که بین دو سویه در توانایی تراریختی سلول‌های گیاهی اختلاف وجود داشته و گزارش کردند که بیشترین درصد ریشه‌مویین و تعداد ریشه‌مویین در سویه A_4 و ۴۸ ساعت هم‌کشتی می‌باشد. در مطالعه Ooi و همکاران (۳۱) سویه A_4 بالاترین درصد القای ریشه‌های مویین را در گیاه تاجریزی (*Solanum mammosum*) نشان داده است. چنین تفاوتی بین سویه‌های باکتری از نظر القای تولید ریشه‌مویین با یافته‌های Lee Young و همکاران (۲۷) که اثر سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز (۱۳۳۳۳، ۱۵۸۳۴ ، R۱۰۰۰، R۱۲۰۰ و R۱۶۰۱) بر القای ریشه‌مویین در گیاه *Rubia akane Nakai* را مورد بررسی قرار دادند مطابقت دارد. آنها گزارش کردند که سویه ۱۶۰۱ R بالاترین درصد آلودگی (۸۵/۶ درصد) و بیشترین تعداد ریشه‌مویین (۵/۳) را داشته، در حالی‌که سویه ۱۵۸۳۴ کمترین درصد آلودگی (۴/ ۵۶ درصد) و کمترین تعداد ریشه‌مویین (۲/۷) را دارا بود. Khelifi و همکاران (۲۴) در بررسی‌های خود گزارش کردند که در بین سویه‌های مختلف اگروباکتریوم، سویه A4 بیشترین درصد تراریختگی در گیاه *Datura innoxia* را نشان داده است. همچنین نتایج تحقیقات Khatodia و همکاران (۲۳) نیز بر روی چند گیاه از خانواده سولاناسه که به بررسی ترکیبات ثانویه مهم آنها در ریشه‌های مویین تراریخته با استفاه از سویه‌های A_4 و ۱۵۸۳۴ اگروباکتریوم رایزوژنز پرداخته بودند حاکی از افزایش معنی‌دار این ترکیبات در ریشه‌های مویین القاء شده توسط سویه A_4 نسبت به سویه ۱۵۸۳۴ است. همچنین سهرابی‌نژاد و همکاران (۳) در پژوهش‌های خود گزارش کردند که سویه‌های ۱۵۸۳۴ و A_4 اگروباکتریوم رایزوژنز به‌ترتیب با ۳۹/۴ و ۲۶/۴ درصد بالاترین و سویه ۲۶۵۶ با ۱۳/۶۹ درصد کمترین میزان تولید ریشه‌مویین را در گیاه *Calendula officinalis* L.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

نشان دادند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نوع ریزنمونه نیز در تولید ریشه‌های مویین تراریخته سنبل‌الطیب حائز اهمیت است. بطوری‌که درصد ریشه‌مویین و تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه برگی به ترتیب با ۲۵/۸۲ درصد و ۲/۹۸ عدد، بیشتر از درصد ریشه‌مویین با میانگین ۲۱/۱۴ درصد و تعداد ریشه‌مویین (۲/۴۵) در هر ریزنمونه دمبرگ بود (شکل ۹). درصد تراریختی بالای ریزنمونه برگ توسط اگروباکتریوم نسبت به ریزنمونه دمبرگ می‌تواند مرتبط با حساسیت بالای ریزنمونه‌های برگ این گیاه به اگروباکتریوم باشد که این حساسیت بستگی به وضعیت فیزیولوژیکی بافت‌ها نیز دارد (۳۴). Mehrota و همکاران (۲۸) نیز گزارش کردند که میزان ریشه‌زایی و تعداد ریشه‌های مویین تحت تأثیر نوع ریزنمونه قرار می‌گیرد. بطوری‌که، براساس مطالعه مذکور ریزنمونه‌های برگی بیشترین ریشه‌زایی را نشان داد. نتایج پژوهش Jenifer و همکاران (۲۱) که به بررسی القای ریشه‌های مویین در گیاه تاجریزی پرداخته بودند نشان داد، ریشه‌های مویینی که حاصل از قطعات جداکشت برگ بودند، قادر به تولید لاین‌های تراریخته پر رشد بودند. در بررسی تأثیر سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز (LBA ۹۴۰۲ ، ۱۹۳ NRRLB و A_4) بر القای ریشه‌های مویین در *Artemisia annua* L. گزارش شده که سویه LBA ۹۴۰۲ با ۱۰۰ درصد تراریختی در ریزنمونه برگ بیشترین درصد ریشه‌مویین را دارا می‌باشد. همچنین گزارش شده که ریزنمونه برگ در مقایسه با ساقه‌ها برای سویه NRRLB۱۹۳ راحت‌تر تراریخت می‌شود (۴). در تحقیق حاضر شرایط تلقیح و محیط کشت نیز از فاکتورهایی بودند که تأثیر زیادی بر تولید ریشه‌های مویین داشتند، بطوری‌که بیشترین درصد ریشه‌زایی مویین متعلق به سطح تیماری T2 (تلقیح به‌مدت ۱۰ دقیقه، هم‌کشتی ۷۲ ساعت و تحت شرایط بدون استوسرینگون) با میانگین ۴۰/۵۲ درصد و بیشترین تعداد ریشه مویین در هر ریزنمونه نیز متعلق به سطوح تیماری T6 (تلقیح ۱۰ دقیقه، هم‌کشتی ۷۲ ساعت و تحت شرایط ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) و T2 (تلقیح ۱۰ دقیقه، هم‌کشتی ۷۲ ساعت و تحت شرایط بدون استوسرینگون) به‌ترتیب با میانگین ۵/۱۳ و ۴/۳ بود. ترکیب فنولی استوسرینگون به‌عنوان القاء کننده ژن *Vir* در اگروباکتریوم در جایگزینی T-DND در سلول‌های گیاهی نقش دارد (۱۴) و انتخاب مقدار بهینه این ترکیب نیز می‌تواند در افزایش موفقیت تراریختی مؤثر باشد، زیرا غلظت پایین آن بیماری‌زایی اگروباکتریوم را تشدید نمی‌کند، و غلظت بالای آن نیز برای اگروباکتریوم و سلول‌های گیاهی اثر سمیت دارد (۳۷). علاوه‌براین، تأثیر استوسرینگون می‌تواند تحت تأثیر سایر عوامل دیگری از جمله گونه گیاهی، نوع ریزنمونه، مدت زمان هم‌کشتی و مدت زمان تلقیح قرار گیرد (۲۵). Cardoza و Stewart (۱۲) زمان پیش کشت، زمان هم‌کشتی و غلظت استوسرینگون را از عوامل مهم تأثیرگذار در انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم گزارش کرده‌اند. Karmarkar و Keshavachandran (۲۲) نیز گزارش کردند که درصد تراریختی (القای ریشه‌مویین) تحت تأثیر هم سویه باکتریایی و هم مدت زمان هم‌کشتی قرار می‌گیرد.

همچنین در تحقیق حاضر در محیط ۱/۲MS درصد ریشه‌زایی مویین (۲۹/۲۱ درصد) و تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه (۳/۱۱) به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط MS به ترتیب با میانگین ۱۷/۷۴ و ۲/۳۲ درصد بود. مشابه با نتایج پژوهش حاضر، در تحقیقی رشد ریشه‌های مویین حاصل از گیاه سنبل‌الطیب در محیط کشت‌های MS، ۱/۲MS و N6 مورد مطالعه قرار گرفت که بعد از سه هفته، بیشترین تجمع زیست‌توده در ریشه‌های مویین کشت شده در محیط ۱/۲MS و بعد از آن در محیط MS و کمترین در محیط N6 مشاهده شد (۳۲). همچنین در آزمایشی طی مقایسه اثر نوع محیط کشت MS، MS ۱/۲ و B5 بر رشد ریشه‌های مویین در گیاه علف خنازیر آبی، محیط کشت ۱/۲MS، مناسب‌ترین محیط کشت برای رشد ریشه‌ها معرفی شد (۳۳). همچنین در مطالعه‌ای از محیط‌های

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

MS، ۱/۲MS، ۱/۴MS و B5 به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت تحریک ریشه‌مویین در گیاه *Hypericum perforatum* استفاده شده که درصد تحریک ریشه‌زایی مویین در محیط ۱/۲MS بیشتر از MS گزارش شده است (۱۰). طی تحقیقی بر روی گیاه *Artemisia vulgaris* نیز همانند پژوهش حاضر، محیط کشت ۱/۲MS بهترین محیط برای ریشه‌زایی و رشد ریشه‌های مویین گزارش شده است (۳۸).

نتایج حاصل از ارزیابی تولید متابولیت ثانویه والرنیک اسید در ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب با استفاده از HPLC نشان داد که این متابولیت در مقدار قابل ملاحظه‌ای در ریشه‌های مویین تولید و تجمع می‌یابد (شکل ۱۵). مطالعات متعدد نشان داده که میزان تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های درون‌شیشه‌ای را می‌توان با استفاده از رهیافت‌های متعددی مانند استفاده از محرک‌ها، گزینش‌لاین‌های پرمحصول و تغذیه سلول‌ها با پیش‌ماده بطور مؤثری افزایش داد (۴۱ و ۴۴). در پژوهشی تأثیر محرک‌های عصاره قارچی *Fusarium graminearum*، متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید در تولید والرنیک اسید در ریشه‌های مویین *V. officinalis* در مدت زمان ۳ و ۷ روز مورد بررسی قرارگرفته و گزارش شده که عصاره‌ی قارچی و متیل جاسمونات بیشترین مقدار والرنیک اسید را در زمان ۷ روز بعد از اعمال تیمار تولید می‌کنند، در حالی که سالسیلیک اسید به طور معنی‌داری تولید والرنیک اسید را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد (۱۵). سلطانی (۲) تأثیر محرک‌های متیل‌جاسمونات، اسید سالیسیلیک، امواج فراصوت، و پیش‌ساز L–لوسین و ترکیب آن‌ها را روی ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب بررسی کردند. نتایج افزایش تولید والرنیک اسید در تیمار ترکیبی متیل جاسمونات با L–لوسین را نشان داد. همچنین در پژوهش پارسا و زینالی (۱) بیشترین مقدار آتروپین و اسکوپولامین در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Hyoscyamus niger* L. در تیمار با غلظت یک میلی‌مولار متیل جاسمونات در زمان ۹۶ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

بنابراین، براساس نتایج تحقیق حاضر می توان نتیجه‌گیری کرد که عوامل مختلفی از قبیل سویه اگروباکتریوم ، نوع ریزنمونه، مدت زمان تلقیح و هم‌کشتی و غلظت محیط کشت MS بر درصد ریشه‌زایی مویین و تعداد ریشه در گیاه سنبل‌الطیب مؤثر بود. در مجموع نتایج نشان داد که بهترین ترکیب‌های تیماری از نظر درصد ریشه‌زایی در این پژوهش، ترکیب تیماری سویه A4 در ریزنمونه برگ و محیط کشت ۱/۲MS و تحت شرایط تلقیح T6 (تلقیح ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط استوسرینگون (۱۰۰ میکرومولار) و T2 (تلقیح ۱۰ دقیقه و هم‌کشتی ۷۲ ساعت تحت شرایط بدون استوسرینگون) می باشند. علاوه براین، والرنیک اسید در ریشه‌های مویین تکثیر شده سنبل‌الطیب در شرایط درون‌شیشه‌ایی تولید و تجمع می‌یابد. این نتایج می‌توانند در تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش مانند والرنیک اسید در گیاه سنبل‌الطیب از طریق کشت ریشه‌ی مویین مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

۱- پارسا، م.، و زینالی، ا.، ۱۳۹۶. تأثیر الیسیتورهای جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات بر میزان تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *Hyoscyamus niger* L.، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست شناسی ایران)، ۳۰ (۴)، صفحات ۷۹۱-۷۷۸.

۲- سلطانی، ن.، ۱۳۹۳. تأثیر محرک‌ها بر تولید متابولیت ثانویه و فعالیت آنزیمی در ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، صفحات ۷۶-۷۲.

۳- سهرابی‌نژاد، ز.، مرعشی، ح.، و مشتاقی، ن.، ۱۳۹۷. بهینه‌سازی کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula*

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

.officinalis L) به‌منظور تولید ترکیب دارویی اولئانولیک اسید، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۳۱ (۳)، صفحات ۶۵۴-۶۴۰.

4- Ahlawat, S., Saxena, P., Ram, M., Alam, P., nafis, T., Mohd, A., and Zainul Abdin, M., 2012. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots for enhanced production of artemisinin in *Artemisia annua* L. plants. African Journal of Biotechnology, 35, PP: 8684-8691.

5- Akramian, M., Fakhr Tabatabaei, S.M., and Mirmasoumi, M., 2008. Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 3(5), PP: 759-763.

6- Bandyopadhyay, M., Jha, S., and Tepfer, D., 2007. Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*, Plant Cell, Reports, 26, B PP: 599-609.

7- Barik, D.P., Mohapatra, U., and Chand, P.K., 2005. Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.,), factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration, Plant Cell Reports, 24, PP: 523-531.

8- Barnes, J., Anderson, L.A., and Philipson, J.D., 2002. Herbal medicines. A Guide Healthcare Professionals, 2th edition. Pharmaceutical Press, London, 565 pp.

9- Baskaran, P., and Jayabalan, N., 2009. Psoralen production in hairy roots and adventitious roots cultures of *Psoralea coryfolia*, Biotechnology Letters, 31, PP: 1073-1077.

10- Bivadi, V., Zakaria, R.A., Zare, N., and Yazdani, B., 2014. Effects of different tissue culture conditions in hairy roots induction in *Hypericum perforatum* L. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 8, PP: 597-604.

11- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, Plant Science, 161, PP: 839-851.

12- Cardoza, V., and Stewart, C.N., 2003. Increased *Agrobacterium*- mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants, Plant Cell Reports, 21, PP: 599-604.

13- Crane, C., Wright, E., Dixon, R.A., and Wang, Z.Y., 2006. Transgenic Medicago truncatula plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots, Planta, 223, PP: 1344-1354.

14- De Clercq, J., Zambre, M., VanMontagu, M., Dillen, W., and Angenon, G., 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for Phaseolus acutifolius, Plant Cell Reports, 21, PP: 333–340.

15- Dini Torkamani, M.R., Jafari, M., Abbaspour, N., Heidari, R., and Safaie, N., 2014. Enhanced production of valerinic acid in hairy root culture of *Valeriana officinalis* by elicitation, Central European Journal of Biology, 9, PP: 853-863.

16- Doyle, J.J., and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue, Focus, 12, PP: 13-15.

17- Gelvin, S.B., 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and interaction. Annu. Rev. Plant, Physiol, Plant Molecular Biology, 51, PP: 223-256.

18- Giri, A., and Lakshmi-Narasu, M., 2001. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances, 18, PP: 1-22.

19- Granicher, F., Christen, P., and Kapetanidis, I., 1995. Essential oils fram normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var, sambucifolia, Phytochemistry, 40, PP: 1421-1424.

20- Hu, Z.B., and Alferman, A.W., 1993. Diterpenoid production in hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza*. Phytochemistry, 32, PP: 699-703.

21- Jenifer, U., Francina Cecilia, K., and Ravindhran, R., 2012. In vitro adventitious root and hairy root cultures in Boerhaavia diffusa L., International Journal of oral care Reaserch, 4 (1), PP: 65 – 7

22- Karmarkar, S.H., and Keshavachandran, R., 2001. Genetic transformation and hairy root induction in Holostemma ada-kodien K. Schum-a vulnerable medicinal plant. Indian Journal of Experimental Biology, 39, PP: 1263-1267.

23- Khatodia, S., and Biswas, K., 2014. A comparative study of hairy root culture induction efficiency in four medicinally important plants using *Agrobacterium rhizogenes*. International Journal Microbiology Applied Sciences, 3 (5), PP: 625 – 33

24- Khelifi, L., Zarouri, B., Amdoun, R., Harfi, B., Morsli, A., and Khelifi-Slaoui, M., 2011. Effects

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

of elicitation and permeabilization on hyoscyamine content in *Datura stramonium* hairy roots. Plant biology, 5 (2), PP: 329 - 34.

25- Kim, K.H., Lee, Y.H., Kim, D., Park, Y.H., Lee, J.Y., Hwang, Y.S., and Kim, Y.H., 2004. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports, 23, PP: 386-390.

26- Kumar, V., Sharma, A., Prasad, B,C,N., Gururaj, H.B., and Ravishankar, G.A., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. Electronic Journal of Biotechnology, 9, PP: 349-357.

27- Lee Young, S., Kim, S.K., Lee, Y.C., Park, I.N., and Park, U.S., 2010. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in *Rubia akane* Nakai. Romanian Biotechnology Letters 15(4), PP: 5405-5409.

28- Mehrota, T., Kukreja, A.K., Khanuja, S., and Mishra, B.N., 2008. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyyhiza glabra* in bioreactor. Electronic Journal of Biotechnology, 11(2), PP: 1-7.

29- Nam, S.M., Choi, J.H., Yoo, Dae, Y., and Kim, W., 2013. *Valeriana officinalis* extract and its main component, Valerenic acid, ameliorate D-galactose-induced reductions in memory, cell proliferation, and neuroblast differentiation by reducing corticosterone levels and lipid peroxidation, Experimental Gerontology, 48, PP: 1369-1377.

30- Namdeo, A. G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites, Pharmacognosy Reviews, 11, PP: 69-79.

31- Ooi, C.T., Syahida, A., Stanslas, J., and Maziah, M., 2013. Efficiency of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction in *Solanum mammosum*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(3), PP: 421-430.

32- Pakdin Parizi, A., Farsi, M., Nematzadeh, G. A., and Mirshamsi, A., 2014. Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis* L., Acta agriculturae Slovenica, 103, PP: 299-305

33- Park, S. U., Li, X., Eom, S. H., Lee, C. Y., and Lee, S.Y., 2010. E-P-Methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *Scrophularia buergeriana* miquel. Archives of Biological Sciences, 62, PP: 649-652.

34- Pawar, P.K., and Maheshwari, V.L., 2003. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family *Solanaceae*. Indian Journal of Biotechnology, 3, PP: 414-417.

35- Pirian, K., piri, K.H., 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 Vol 3, 3, PP: 642-649.

36- Sah, S.P., Mathela, C.S., and Chopra, K., 2010. Elucidation of possible mechanism of analgesic action of *Valeriana wallichii* DC chemotype (patchouli alcohol) in experimental animal models. Indian Journal of Experimental Biology, 48, PP: 289-93.

37- Sivanandhan, G., Arunachalam, C., Vasudevan, V., Kapildev, G., Sulaiman, A. A., Selvaraj, N., Ganapathi, A., and Lim, P. Y., 2016. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Hybanthus enneaspermus* L., Plant Biotechnology Reports, 10, PP: 49–60.

38- Sujatha, G., Zdravkovic-Korac, S., alic, D., Flamini, G., and Ranjitha Kumaria, B.D., 2012. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis, Industrial Crops and Products, 6341, PP: 1-10.

39- Tomilov, A., Tomilova, N., and Yoder, J. I., 2007. *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic plant Triphysaria versicolor retain parasitic competence, Planta, 225, PP: 1059–1071.

40-Vasconsuelo, A., and Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science, 172, PP: 861-875.

41- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites, Phytochemistry Reviews 1, PP: 13-25.

42- Wegner, H., Jurcic, K., and Schaette, R., 1990. Comparative studies on the sedative action of *Valeriana extracts*, valepotriates and their degredation products, Planta ,39, PP: 358-65.

43- Wolanin, P., Thomason, P., and Stock, J., 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. Genome Biology, 3, PP: 3013-3018.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.4.8

44- Zare, N., Farjaminezhad, R., Asghari-Zakaria, R., and, Farjaminezhad, M., 2014. Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding, Natural Product Research 28, PP: 711–717.

Factors affecting hairy roots induction efficiency via *Agrobacterium rhizogenes* and evaluation of valerenic acid production in the hairy root cultures of medicinal plant *Valeriana officinalis* L.

Zare N.*, Madani V., Jamali A. and Asghari-Zakaria R.

Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

Abstract

Hairy root cultures due to their higher genetic and biological stability, high growth rate and rapid growth on hormone-free medium are an effective alternative method for production of secondary metabolites. In this research, the effects of different factors including type of *Agrobacterium rhizogenes* strain (A4, 15834 and 2656), type of explants (leaf and petiole), inoculation conditions (inoculation time (10 and 15 minutes), co-cultivation time (48 and 72 hours), use and non-use of acetosyringone) and salts concentration of medium (MS and 1/2MS) on induction of hairy roots in valerian were investigated. Among the *Agrobacterium* strains, the highest percentage of hairy root induction and the number of roots per explant was obtained using A4 strain. Also, the percentage of hairy root induction and the number of roots per explant in the leaf explant were significantly higher than those of petiole explant. Among the different inoculation conditions, the highest percentage of hairy root induction was obtained in 10 minutes inoculation and 72 hours of co-cultivation and the highest number of roots per explant was obtained in 10 minutes inoculation and 72 hours co-cultivation in medium containing 100 µM acetosyringone. Also, the percentage and number of roots per explant on ½ salt concentration of MS medium were significantly higher than those of MS medium. The HPLC results showed that valerenic acid is produced at 3.77 mg/l in *V. officinalis* hairy root cultures. The results obtained from the present study indicated that the type of bacterial strain and explant, and optimization of the culture conditions play key role in the process of gene transfer to the cells, hairy root induction and biomass production from *V. officinalis* hairy roots. The most suitable treatment for hairy root induction and growth in *V. officinalis* included 10 minutes inoculation and 72 hours co-cultivation of leaf explants with A4 strain of *Agrobacterium* and culture on ½ MS medium.

Keywords: Agrobacterium strains, Explant type, Medicinal plant, Secondary metabolite, *Valeriana officinalis* L.