Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 4, Winter 2020 (803-813)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.262611.1484

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۸ (ص ۸۱۳-۸۰۳)

امکان‌سنجی القای ریشه مویین در دو گونه زوفا (*Hyssopus officinalis* و *Hyssopus angustifolius*)

سمیه طایفه[۱]، سید کمال کاظمی تبار[۲]، ولی اله قاسمی عمران[۳] و ناصر مهنا[۴*]
۱ و ٤. دانشجوی دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
۲. دانشیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران
۳. استادیار، پژوهشکده ژنتیک دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲٤- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۰)

چکیده

در این پژوهش، القای ریشه مویین از دو ریزنمونه برگ و ساقه دو گونه زوفای دارویی (*H. officinalis*) و زوفای باریک برگ (*H. angustifolius*) توسط چهار سویه آگروباکتری شامل A4، ATCC15834، LB9404 و 2656 و در سه محیط کشت MS و MS ۱/۲ و B5 آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. هر دو ریزنمونه برگ و ساقه در سه محیط کشت تولید ریشه مویین کردند. ماهیت تراریختی ریشه‌های مذکور از طریق ردیابی بخشی از ژن *rol B* وارد شده به ژنوم ریشه های تراریخت با استفاده از PCR به اثبات رسید. نتایج نشان داد سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes* و محیط کشت در دو گونه زوفا اثر معنی‌داری بر درصد ریشه زایی و اندازه ریشه مویین داشتند. بیشترین درصد ریشه مویین (۷۱) و طول ریشه (٤/۷ سانتی‌متر) در ریزنمونه ساقه گونه باریک برگ، با تلقیح سویه ATCC15834 حاصل شد. در گونه دارویی بالاترین درصد ریشه مویین (۵۵) و طول ریشه مویین (۱/٦ سانتی‌متر) برای ریزنمونه برگ، با تلقیح سویه A4 به‌دست آمد. محیط کشت MS برای هر دو گونه زوفا مناسب‌ترین بود. این نتایج می‌تواند در انتقال ژن و کشت ریشه های مویین زوفا به منظور تولید تجاری متابولیت‌های ثانوی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه مویین، زوفا، محیط کشت.

Feasibility of hairy root induction in two *Hyssopus* species (*H. officinalis* and *H. angustifolius*)

Somayeh Tayefeh [1], Seyed Kamal Kazemitabar[2] and Valiollah Ghasemi-Omran[3] and Nasser Mahna[4*]
1, 4. Ph.D. Candidate and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Assistant Professor, Genetics Research Center, Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran
(Received: Aug. 15, 2018- Accepted: Dec. 01, 2018)

ABSTRACT

In the present study, hairy root induction from leaf and stem explants in two *Hyssopus* species (*H. officinalis* and *H. angustifilius*) was assessed using four *Agrobacterium rhizogenes* strains including A4, ATCC15834, LB9404 and 2656 on three culture media (MS, ½ MS, B5) as a factorial experimental based on a completely randomized design with three replicates. Almost all leaf and stem explants produced hairy roots. A fragment of transferred *rol B* was amplified through PCR from the genomic DNA extracted from transformed roots. Different *A. rhizogenes* strains and culture media and *Hyssopus* species had significant effects on hairy root percentage and root length. The highest rooting percentage (%71) and root length (4.7 cm) were resulted from stem explants of *H. angustifolius* co-cultivated with the strain ATCC15834 on MS culture medium. While, the leaf explants of *H. officinalis* co-cultivated with the strain A4 on MS culture medium showed the rooting percentage of 55% and the root length of 1.6 cm at most. The MS medium was the best culture medium for both species. These results can be useful in genetic manipulation of hyssop and its hairy root culture to produce high-value secondary metabolites.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, culture media, *Hyssopus*, transformed root.

* Corresponding author E-mail: mahna@tabrizu.ac.ir; n.mahna@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاه زوفا با نام علمی *Hyssopus officinalis* L. متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد که از نظر خصوصیات ظاهری، گیاهی علفی و چندساله می‌باشد. گونه دیگر زوفا *H. angustifolius* (که این گونه در برخی منابع به‌عنوان زیرگونه *H. officinalis* بیان شده است) در بعضی استان‌های کشور نظیر مازندران، آذربایجان شرقی و غربی و سیستان و بلوچستان به‌صورت خودرو رشد می‌کند (Dzhumaev, 1986).

ترکیبات گوناگونی به‌عنوان ترکیبات اصلی زوفا توسط محققین مختلف شناسایی شده است که از جمله آن ها می توان به میتلیوگنول (۳۸ درصد) (Gorunovic et al., 1995)، ۱و ۸- سینئول (۵۳ درصد)، (Vallejo et al., 1995)، پینوکامفون (۴۹/۱ درصد) (Garg et al., 1999)، ایزوپینوکامفون (Mitic & dordevic, 2000)، پینوکاروول (۳۶/۳ درصد) (Ozer et al., 2005)، ایزوپینوکاروول (۵۷/۲۷ درصد) (Kizil et al., 2010)، بتا- پینن، لیمونن، پینو-کامفون، بتاپینن، (Kizil et al., 2008)، سیس- پینوکامفن (۲۶/۸۵ درصد) (Said-al ahl et al., 2015)، پینوکامفن، ایزوپینوکامفون و بتا- پینن (Mojab et al., 2002) اشاره کرد.

اسانس زوفا به‌عنوان طعم‌دهنده در بسیاری از محصولات غذایی و لوازم آرایشی به‌کار می‌رود. اسانس این گیاه از ترکیبات فلاونوئیدی و تانن تشکیل شده است که به‌عنوان مقوی و ضدعفونی‌کننده در کاهش اختلالات گوارشی، درمان التهاب حنجره و سرعت بخشیدن به بهبود زخم در طب سنتی استفاده می‌شود. همچنین به‌عنوان خلط‌آور، ضد نفخ، ضدالتهاب و ضداسپاسم (Kizil *et al.*, 2008) در رفع عفونت‌های ویروسی، ضدباکتری، ضدقارچ و همچنین برای سرماخوردگی، سرفه، گلودرد، برونشیت و آسم استفاده می‌شود و نیز مسکن دندان‌درد در بسیاری از نقاط جهان می‌باشد (Wesołowska *et al.*, 2010).

ریشه‌های مویین مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فعال در ریشه‌های طبیعی و حتی عملکرد سایر اندام‌های گیاهی را انجام می‌دهند. چنین ریشه‌هایی جهت تولید متابولیت‌های ثانوی به‌خصوص متابولیت‌های با خاصیت دارویی به‌دلیل پایداری و بالابودن میزان تولید آن‌ها در محیط‌های کشت مورد توجه است. حتی میزان تولید این متابولیت‌ها در ریشه‌های مویین بالاتر از ریشه‌های طبیعی یا سایر بافت‌ها می‌باشد. باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز، باعث تشکیل ریشه‌های زیاد در ناحیه آلوده می‌گردد که ریشه‌های مویین نامیده می‌شوند. این آلودگی با انتقال یک قطعه DNA به DNA کروموزومی سلول گیاه ایجاد می‌شود. حاصل این انتقال تولید ریشه مویین توسط سلول‌های تراریخت است. به‌علاوه اپین‌ها به‌عنوان غذای مخصوص برای باکتری تولید می شوند. ریشه‌های مویین به سرعت رشد می‌کنند و در محیط بدون هورمون‌های گیاهی به‌خوبی تکثیر شده تولید انشعابات فرعی می‌نمایند. براساس نوع اپین تولید شده، سویه‌های *A. rhizogenes* در ۵ گروه اکتوپین- اگروپین- نوپالین- مانوپین و کوکومپین تقسیم‌بندی می‌شوند (Kittipongpatana *et al.*, 2002). تعدادی از گونه‌های گیاهی از جمله بسیاری از گیاهان دارویی به‌وسیله آگروباکتریوم رایزوژنز تراریخته شده و نتایج منتشرشده حاکی از توان تولید متابولیت‌های با ارزش دارویی توسط این ریشه‌ها می‌باشد (Hasanloo, 2006). بسیاری از گیاهان دارویی به‌طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از *A. rhizogenes* تراریخته شده و ریشه‌های مویین القاشده تولید نسبتاً بالایی از متابولیت ثانوی (که دارای ارزش دارویی می‌باشد) را نشان داده‌اند (Brijwal & Tamta, 2015).

در طی تحقیقی که Kochan *et al.* (1999) روی میزان رزمارینیک اسید و دیگر فنولیک اسیدها در ریشه مویین *H. officinalis* انجام دادند، بیشترین مقدار رزمارینیک اسید (حدود ۶ درصد وزن خشک) در ریشه‌های مویین رشد یافته در محیط مایع B5 گامبورگ شامل ۱۰ درصد ساکارز، به‌دست آمد که این مقدار حداقل ۶۰ درصد بیشتر از مقدار ماده یافت‌شده، در گیاه است. تجمع متابولیت‌های ثانوی در سلول‌های گیاهی بستگی به ترکیب محیط کشت، نوع و ترکیب هورمون‌های رشد، نمک‌های معدنی و منبع کربن دارد. عوامل محیطی نظیر دما، نور و ترکیب گازی محیط کشت نیز در این امر دخیل می‌باشند (Chen *et al.*, 2000).

با توجه به اهمیت گیاه زوفا به‌دلیل داشتن

www.SID.ir

Archive of SID

متابولیت‌های ثانوی با ارزش، یافتن راهی برای تولید ارزان و سریع آن‌ها از طریق ریشه‌های مویین ضروری به نظر می‌رسد. به این منظور در این تحقیق بهینه سازی شرایط القای ریشه‌های مویین با استفاده از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، سه نوع محیط کشت و دو ریزنمونه برگ و ساقه در دو گونه زوفا، به‌عنوان اولین گام موثر در کشت ریشه‌های مویین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی القای ریشه مویین به‌صورت آزمایش فاکتوریل (چهار فاکتور شامل سه محیط کشت، چهار سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز و دو ریزنمونه برگ و ساقه و نیز دو گونه زوفا می‌باشد) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و پنج مشاهده در هر تکرار انجام گرفت. ریزنمونه‌هایی که با باکتری تلقیح نشده بودند، به‌منزله شاهد در نظر گرفته شدند. برای پی‌بردن به کیفیت القای ریشه در ریزنمونه‌های گونه‌های تحت آزمایش دو شاخص درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌های مویین ارزیابی شد.

مواد گیاهی

در این تحقیق در فصل برداشت (اواخر تابستان)، بذر زوفای باریک برگ (بومی ایران) از طبیعت (بخش دودانگه از توابع ساری، ۸۰ کیلومتری جنوب ساری، کد هرباریومی ۱۲۵، گروه گیاه شناسی، مرکز تحقیقات منابع طبیعی مازندران) جمع‌آوری شد و توسط مرکز تحقیقات کشاورزی استان مازندران شناسایی شد، همچنین بذر زوفای دارویی ازشرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به منظور تهیه گیاهچه استریل، بذرهای زوفای باریک برگ و دارویی در محیط کشت جامد MS (Murashige & Skoog, 1962) بدون هورمون کشت شدند. ظرف‌های کشت در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهچه‌های به‌دست آمده برای تهیه ریزنمونه (برگ و ساقه) به‌منظور تلقیح با اگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی و تلقیح ریزنمونه‌ها

جهت تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، از برگ‌ها و ساقه‌های جوان گیاهچه‌های چهارهفته‌ای دو گونه زوفا استفاده شد. ریزنمونه با استفاده از اسکالپل به قطعات دو سانتی‌متری تقسیم شدند.

کشت‌های باکتریایی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه (rpm) به‌مدت ۱۴ تا ۱۸ ساعت نگهداری شد. پس از اینکه تراکم نوری محیط کشت باکتریایی به ۰/۴ تا ۰/۸ رسید، محیط کشت باکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه و ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفت، سپس رسوب سلول‌های باکتری در محیط کشت مایع MS که حاوی سه درصد ساکارز است، حل گردید. از سوسپانسیون باکتری حاصل برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد.

القای ریشه مویین

کشت باکتریایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۵۰۰۰rpm رسوب داده شد و پلیت باکتری در محیط کشت MS حاوی استوسرینگون به‌آرامی حل شد. ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون تلقیح به‌مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شده و پس از خشک‌کردن روی کاغذ صافی استریل، بر روی محیط کشت مناسب با pH، ۵/۷ کشت شد. پلیت‌های حاوی ریزنمونه‌های گیاهی در تاریکی، به‌مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۴۸ ساعت پس از انجام تلقیح، به منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط کشت جامد حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شد. عمل انتقال، چند مرتبه تا حذف کامل باکتری تکرار شد. پس از ایجاد ریشه مویین به بررسی صفات مورفولوژی شامل اندازه‌گیری طول ریشه مویین بعد از دو هفته و درصد ریشه مویین پرداخته شد.

تأیید مولکولی تراریختی ریشه‌های مویین

استخراج DNA ژنومی ریشه‌های مویین و ریشه‌های غیر تراریخت (شاهد منفی) به‌روش Doyle & Doyle (1987) انجام پذیرفت. به‌منظور استخراج پلاسمید باکتریایی از روش‌های متداول استفاده شد

www.SID.ir

Archive of SID

(Sambrook & Russell, 2001). سپس DNA به‌دست‌آمده، به‌همراه دو جفت آغازگر اختصاصی با توالی‌های 5-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3 و 5-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3 برای تکثیر قطعه‌ای از ژن *rol B* (۴۳۰bp) وارد واکنش PCR شد. سپس، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ به‌مدت ۲ ساعت در کنار نشانگر اندازه (با اندازه ۵۰ جفت باز شرکت Fermentas) الکتروفورز شدند. ژل پس از رنگ‌آمیزی در حمام اتیدیوم برماید در دستگاه ژل داک مدل Gel Logic 212 Pro مشاهده شد.

محاسبات آماری داده‌ها

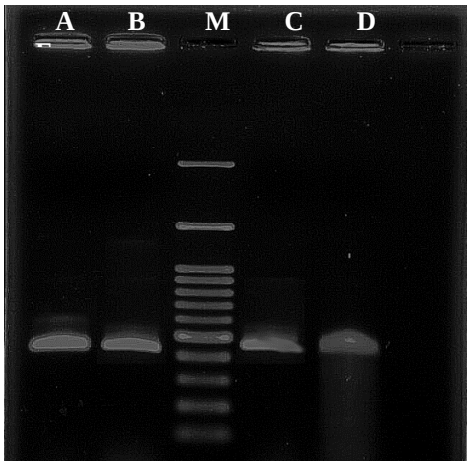
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

حدود یک هفته پس از تلقیح ریزنمونه با باکتری، از محل بریدگی و زخم ریزنمونه‌ها، ریشه‌های مویین ظاهر شدند. سویه‌های مختلف باکتری قابلیت متفاوتی در القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های گونه‌های زوفا داشتند و بیشترین درصد ریشه‌زایی از تلقیح گونه‌های دارویی و باریک برگ زوفا به‌ترتیب با باکتری سویه A4 و ATCC15834 و در محیط کشت MS حاصل شد.

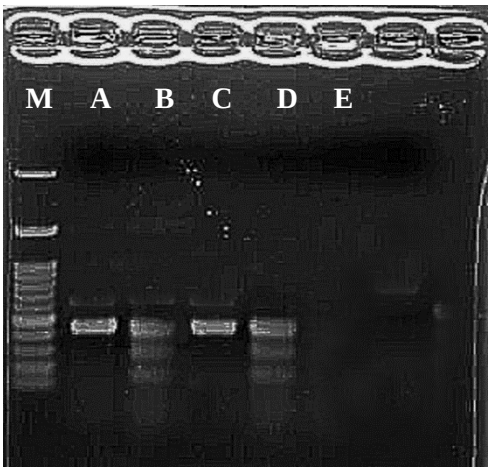
در هر دو ریزنمونه و همچنین چهار سویه مورد مطالعه ریشه مویین تولید شد، اما تفاوت معنی داری در بین چهار سویه در میزان تولید ریشه مویین و همچنین کیفیت ریشه‌های تولیدی وجود داشت.

ریشه‌های مویین به‌دست‌آمده، با استفاده از ردیابی قسمتی از ژن *rol B* بررسی شد. واکنش PCR با DNA استخراج شده از ریشه‌های مویین تراریخت شده موجب تکثیر قطعاتی با طول حدود ۴۳۰ جفت باز شد، ولی این ژن در DNA به‌دست‌آمده از ریشه غیرتراریخت گیاه مشاهده نشد، همچنین، محصولات PCR حاوی DNA استخراج‌شده از پلاسمید هر چهار سویه باکتری با اندازه یکسان ایجاد شد، که حضور T-DNA در ژنوم ریشه‌های مویین را تأیید می‌کند (شکل ۱).



شکل ۱. تحلیل PCR با آغازگر اختصاصی ژن *rol B*. A و B) به‌ترتیب DNA پلاسمید *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌های A4 و ATCC15834، M) نشانگر اندازه 1 kb، C و D) به‌ترتیب DNA ریشه‌های مویین گونه زوفای دارویی (*Hyssopus officinalis*) و زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*)، E) ریشه غیرتراریخت گونه (*Hyssopus officinalis*)

Figure 1. PCR detection of *rol B* gene, A-B: plasmid of different *Agrobacterium rhizogenes* strains including: A4 and ATCC15834, M: DNA molecular weight (1 Kb), C-D: DNA of two hairy roots including: *Hyssopus officinalis* and *H. angustifolius* and E: non-transformed roots of *Hyssopus officinalis*



شکل ۲. تحلیل PCR با آغازگر اختصاصی ژن *rol B*. M) نشانگر اندازه 1KB، A و B) به‌ترتیب DNA پلاسمید *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌های 2656 و LB9404، C و D) به‌ترتیب DNA ریشه‌های مویین گونه زوفای دارویی (*Hyssopus officinalis*) و زوفای باریک برگ (*Hyssopus angustifolius*)، E) ریشه غیر تراریخت گونه (*Hyssopus officinalis*)

Figure 2. PCR detection of *rol B* gene, M: DNA molecular weight (1 Kb), A-B: plasmid of different *Agrobacterium rhizogenes* strains including: LB9404 and 2656, C-D: DNA of two hairy roots including: *Hyssopus officinalis* and *H. angustifolius* and E: non-transformed roots of *Hyssopus officinalis*.

www.SID.ir

Archive of SID

براساس نتایج تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری میان دو گونه زوفا، محیط‌های کشت، سویه‌های مورد مطالعه باکتری آگروباکتریوم و ریزنمونه‌ها با صفات مورد مطالعه شامل درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌ها مشاهده شد (جدول ۱).

براساس جدول مقایسه میانگین تقریباً ریشه‌زایی در هر دو گونه و تمام سویه‌های باکتری آگروباکتریوم صورت گرفته است. بیشترین درصد ریشه‌زایی در گونه زوفای معمولی در نتیجه تلقیح با باکتری آگروباکتریوم سویه A4 و ATCC15834 به‌ترتیب به مقدار ۵۵ و ۳۵ درصد بود. همچنین بیشترین میزان درصد ریشه‌زایی در گونه گیاهی زوفای باریک برگ به مقدار ۷۱/۶ و ۶۳/۳ درصد به‌ترتیب در اثر تلقیح با سویه‌های ATCC15834 و A4 مشاهده شد. اندازه ریشه و کیفیت ریشه مویین در گونه معمولی به میزان ۲/۱ و ۱/۶ سانتی‌متر به‌ترتیب در نتیجه تلقیح با سویه‌های ATCC15834 و A4 مشاهده شد. اندازه ریشه مویین تولیدشده در گونه زوفای باریک برگ ۴/۷ و ۳/۱ سانتی‌متر در نتیجه القا با سویه‌های ATCC15834 و 2656 به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر محیط کشت، گونه، سویه باکتری و ریز نمونه بر درصد ریشه‌زایی و اندازه ریشه دو گونه زوفا

Table 1. The analysis of variance effect of medium culture, species, strain and explant on rooting percentage and root size in two hyssop species

Source of Variance	Degree of Freedom	Mean of Squares (rooting percentage)	Mean of Squares (root size)
Medium (A)	2	1552.778**	2.738**
Species (B)	1	1056.250**	5.921**
Strain (C)	3	1958.333**	1.528**
Explant (D)	1	1600.000**	7.200**
A × B	2	952.083**	1.653**
A × C	6	311.111**	1.365**
A × D	2	325.000**	3.765**
B × C	3	274.769**	1.888**
B × D	1	1284.028**	0.303*
C × D	3	1304.630**	7.845**
A × B × C	6	73.380**	1.357**
A × B × D	2	146.528**	0.748**
B × C × D	3	406.250**	0.320**
A × B × C × D	12	211.690**	2.635**
Error	96	19.444**	0.060**
Coefficient of Variation (%)	19.35		

**: Significant at 1% probability level. **: تفاوت عنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۲. مقایسه میانگین برهمکنش محیط کشت (A)، گونه (B)، سویه (C) و ریزنمونه (D) بر صفات مورد مطالعه در دو گونه زوفا

Table 2. Mean comparison interaction effect of medium culture (A), species (B), strain (C) and explant (D) for studied traits in two hyssop species

Medium culture	Species	Strain	Explant	Rooting percentage	Root length after two weeks (cm)
MS	*H. officinalis*	LB9404	Stem	18.333 ± 1.667 $^{h-k}$	1.733 ± 0.133 $^{d-h}$
			Leaf	10.000 ± 0.000 ^{k}	0.700 ± 0.000 $^{n-r}$
		ATCC15834	Stem	35.000 ± 2.887 ^{e}	2.100 ± 0.208 $^{c-e}$
			Leaf	18.333 ± 1.667 $^{h-k}$	0.867 ± 0.067 $^{l-q}$
		2656	Stem	18.333 ± 1.667 $^{h-k}$	1.467 ± 0.067 $^{g-k}$
			Leaf	0.000 ± 0.000 ^{l}	0.000 ± 0.000 ^{s}
		A4	Stem	26.667 ± 3.333 $^{f-h}$	1.167 ± 0.167 $^{j-n}$
			Leaf	55.000 ± 2.887 ^{c}	1.600 ± 0.100 $^{f-j}$
	H. angustifolius	LB9404	Stem	26.667 ± 3.333 $^{f-h}$	1.767 ± 0.233 $^{d-h}$
			Leaf	13.333 ± 3.333 ^{jk}	0.567 ± 0.067 $^{p-r}$
		ATCC15834	Stem	71.667 ± 4.410 ^{a}	4.733 ± 0.406 ^{a}
			Leaf	13.333 ± 3.333 ^{jk}	1.167 ± 0.167 $^{j-n}$
		2656	Stem	33.333 ± 3.333 ^{ef}	3.100 ± 0.208 ^{b}
			Leaf	20.000 ± 0.000 $^{h-j}$	0.500 ± 0.000 ^{qr}
		A4	Stem	43.333 ± 3.333 ^{d}	0.733 ± 0.033 $^{m-r}$
			Leaf	63.333 ± 3.333 ^{b}	3.067 ± 0.233 ^{b}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن ندارند.

There is no statically difference at p<0.05 between means with the same letters.

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول ۲. مقایسه میانگین برهمکنش محیط کشت (A)، گونه (B)، سویه (C) و ریزنمونه (D) بر صفات مورد مطالعه در دو گونه زوفا

Continued table 2. Mean comparison interaction effect of medium culture (A), species (B), strain (C) and explant (D) on studied traits in two hyssop species

Medium culture	Species	Strain	Explant	Rooting percentage	Root length after two weeks (cm)
1/2MS	*H. Officinalis*	LB9404	Stem	13.333 ± 3.333 ^{jk}	1.733 ± 0.133 $^{d-h}$
			Leaf	20.000 ± 0.000 $^{h-j}$	1.000 ± 0.000 $^{k-p}$
		ATCC15834	Stem	26.667 ± 3.333 $^{f-h}$	1.767 ± 0.145 $^{d-h}$
			Leaf	23.333 ± 3.333 $^{g-i}$	1.533 ± 0.033 $^{f-j}$
		2656	Stem	16.667 ± 3.333 $^{i-k}$	1.300 ± 0.153 $^{h-l}$
			Leaf	30.000 ± 0.000 $^{e-g}$	0.600 ± 0.000 $^{o-r}$
		A4	Stem	23.333 ± 3.333 $^{g-i}$	0.567 ± 0.120 $^{p-r}$
			Leaf	26.667 ± 3.333 $^{f-h}$	1.767 ± 0.219 $^{d-h}$
	H. angustifolius	LB9404	Stem	16.667 ± 3.333 $^{i-k}$	2.333 ± 0.240 ^{c}
			Leaf	10.000 ± 0.000 ^{k}	0.500 ± 0.000 ^{qr}
		ATCC15834	Stem	53.333 ± 3.333 ^{c}	0.433 ± 0.088 ^{qr}
			Leaf	10.000 ± 0.000 ^{k}	2.000 ± 0.000 $^{c-f}$
		2656	Stem	23.333 ± 3.333 $^{g-i}$	3.333 ± 0.133 ^{b}
			Leaf	13.333 ± 3.333 ^{jk}	1.000 ± 0.200 $^{k-p}$
		A4	Stem	36.667 ± 3.333 ^{de}	2.100 ± 0.379 $^{c-e}$
			Leaf	36.667 ± 3.333 ^{de}	2.200 ± 0.115 ^{cd}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون تفاوت آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن ندارند.

There is no statically difference at p<0.05 between means with the same letters.

ادامه جدول ۲. مقایسه میانگین برهمکنش محیط کشت (A)، گونه (B)، سویه (C) و ریزنمونه (D) برای صفات مورد مطالعه در دو گونه زوفا

Continued table 2. Mean comparison interaction effect of medium culture (A), species (B), strain (C) and explant (D) for studied traits in two hyssop species

Medium culture	Species	Strain	Explant	Rooting percentage	Root length after two weeks (cm)
B5	*H. officinalis*	Lb9404	Stem	10.000 ± 0.000 ^{k}	1.600 ± 0.100 $^{f-j}$
			Leaf	20.000 ± 0.000 $^{h-j}$	1.200 ± 0.000 $^{i-m}$
		Atcc15834	Stem	23.333 ± 3.333 $^{g-i}$	1.667 ± 0.167 $^{e-i}$
			Leaf	20.000 ± 0.000 $^{h-j}$	1.000 ± 0.000 $^{k-p}$
		2656	Stem	20.000 ± 0.000 $^{h-j}$	1.000 ± 0.000 $^{k-p}$
			Leaf	13.333 ± 3.333 ^{jk}	0.467 ± 0.067 ^{qr}
		A4	Stem	13.333 ± 3.333 ^{jk}	0.500 ± 0.000 ^{qr}
			Leaf	20.000 ± 0.000 $^{h-j}$	1.600 ± 0.000 $^{f-j}$
	H. angustifolius	Lb9404	Stem	20.000 ± 0.000 $^{h-j}$	1.400 ± 0.000 $^{h-k}$
			Leaf	10.000 ± 0.000 ^{k}	0.867 ± 0.067 $^{l-q}$
		Atcc15834	Stem	23.333 ± 3.333 $^{g-i}$	0.333 ± 0.033 ^{rs}
			Leaf	10.000 ± 0.000 ^{k}	1.000 ± 0.000 $^{k-p}$
		2656	Stem	10.000 ± 0.000 ^{k}	0.400 ± 0.000 $^{q-s}$
			Leaf	10.000 ± 0.000 ^{k}	1.067 ± 0.067 $^{k-o}$
		A4	Stem	23.333 ± 3.333 $^{g-i}$	1.900 ± 0.153 $^{c-g}$
			Leaf	20.000 ± 0.000 $^{h-j}$	2.167 ± 0.167 ^{cd}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن ندارند.

There is no statically difference at p<0.05 between means with the same letters.

امروزه بهره‌گیری از کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارویی جهت تولید ترکیبات ارزشمند دارویی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. معمولاً توانایی ایجاد ریشه مویین توسط سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* متفاوت است. از این‌رو، نخستین گام در کشت ریشه‌های مویین یافتن مناسب‌ترین سویه باکتری و بهترین نوع ریزنمونه گیاهی و بهترین محیط کشت در گونه‌های گیاهی است. در این پژوهش، تولید ریشه‌های مویین در دو گونه گیاهی زوفا مورد بررسی قرار گرفت.

محیط کشت یک عامل تأثیرگذار بر تولید ریشه‌زایی در گونه‌های مختلف گیاهی می‌باشد. محیط کشت‌های مورد بررسی نیز تأثیر به‌سزایی در درصد ریشه‌زایی و اندازه ریشه داشت به این صورت که در هر دو گونه زوفا، محیط کشت MS بیشترین تولید ریشه مویین داشت و محیط B5 کمترین مقدار ریشه مویین را داشتند. مطالعات پیشین نیز نشان داد علاوه بر توانایی و قابلیت درونی ریزنمونه استفاده شده، شرایط و محیط کشت نیز به‌دلیل دارا بودن خاصیت تغذیه‌ای و تحریک‌کنندگی، نقش به‌سزایی در رشد ریشه‌های مویین و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارند (Xu *et al*., 2009; Srivastava

www.SID.ir

Archive of SID

& Srivastava, 2007). همچنین پژوهش‌های مختلفی نشان می‌دهد که محیط کشت‌های مختلف به‌دلیل تفاوتشان در اجزا و غلظت، می‌توانند بر بیان تعداد قابل‌توجهی از ژن‌ها، به‌ویژه ژن‌های آنزیم‌های مرتبط با بیوسنتز و استفاده از ذخایر غذایی تأثیر بگذارند و از این طریق تولید متابولیت‌های ثانویه را تنظیم نمایند. از طرفی پتانسیل اسمزی محیط کشت می‌تواند رشد ریشه‌های مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار دهد (Asghari & Salimian Rizi, 2008; Do & Cormier, 1990).

در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد بیشترین رشد و میزان ریشه مویین در محیط کشت، MS، که دارای بیشترین قدرت یونی (۹۵/۸ mM) در میان محیط کشت‌ها می‌باشد، حاصل گردید (George *et al*., 2008). در یک بررسی، از میان سه محیط کشت MS، B5 و WPM که در کشت ریشه‌های مویین گیاه *Basilicum ocimum* به‌کار گرفته شدند، بیشترین میزان رشد در محیط کشت MS حاصل گردید (Tada *et al*., 1996)، همچنین در بررسی تأثیر چهار نوع محیط کشت مختلف شامل B5، WPM، MS و NN بر کشت ریشه‌های مویین گیاه *Forskolii coleus*، بیشترین رشد در محیط کشت MS حاصل گردید (Li *et al*., 2005). نتایج فوق با مشاهدات به‌دست‌آمده از آزمایش حاضر در توافق است. در توجیه این پدیده می‌توان گفت، احتمالاً بالابودن غلظت اجزای تشکیل‌دهنده محیط کشت MS و در نتیجه بالابودن ارزش تغذیه‌ای این محیط، سبب افزایش میزان تنفس در ریشه‌های مویین می‌گردد که این شرایط جهت تولید ریشه مویین مطلوب است (George *et al*., 2008).

یکی دیگر از فاکتورهای مورد بررسی ریزنمونه بود که در این پژوهش از دو ریزنمونه برگ و ساقه استفاده شد. باتوجه به نتایج می‌توان دریافت که در زوفای دارویی در سه سویه ATCC15834، LB9404 و 2656 آگروباکتریوم بیشترین میزان ریشه‌زایی در نمونه ساقه بوده است و فقط سویه A4 بیشترین ریشه‌زایی در نمونه برگ را داشت. نکته قابل تأمل این است که سویه ۲۶۵۶ در ریزنمونه برگی زوفا دارویی هیچ ریشه موییننی حاصل نشده است که دلیل آن قهوه‌ای شدن نمونه‌ها و از بین رفتن آن‌ها بود. نمونه ساقه در گونه زوفای باریک برگ نیز ریشه‌زایی خوبی در هر چهار سویه باکتری داشت ، البته نمونه برگی با سویه A4 در زوفای باریک برگ، ریشه‌زایی خوبی را نشان داد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، پاسخ متفاوت ریزنمونه‌های برگ و ساقه به آگروباکتریوم رایزوژنز می‌تواند ناشی از چند عامل باشد؛ اول اینکه ممکن است در زمان تلقیح محل زخم در ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ، بیشتر در تماس با باکتری قرار گرفته باشد. عامل دوم ممکن است به‌دلیل تفاوت در شرایط فیزیولوژیکی باشد، زیرا قابلیت ریزنمونه‌ها در پاسخ به آگروباکتریوم رایزوژنز در بافت‌های مختلف یک گیاه متفاوت است. همچنین فاکتورهایی مثل هورمون‌ها، فشار تورژسانس و کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs) در گسترش و تمایز این سلول‌ها تأثیرگذار می‌باشند (Ishida *et al*., 2011).

تحقیقات پیشین نشان می‌دهد، قهوه‌ای‌شدن برخی ریزنمونه‌های برگی *Arctum lappa* در اثر هم‌کشتی با *A rhizogenes*. سویه AR 15834 موجب از دست رفتن شادابی و کاهش توانایی تکثیر سلولی ریزنمونه‌ها و در نهایت مرگ آن‌ها می‌شود. این پدیده مشابه پاسخ طبیعی گیاه به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده است و می‌توان آن را ناشی از سازوکار دفاعی گیاه در مقابل آلودگی توسط باکتری و یا زخم‌شدن دانست (Soleimani *et al*., 2012). نتایج مشابه در هم‌کشتی گیاه *Phalaenopsis violacea* با باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه Eha101 گزارش شده است (Sreeramanan *et al*., 2008). در بررسی القای ریشه مویین در دو گیاه از تیره بادمجانیان نیز مشاهده شد قطعات ساقه و هیپوکوتیل هیچ‌پاسخی به تلقیح با آگروباکتریوم ندادند و تشکیل ریشه مویین فقط در ریزنمونه برگی مشاهده شد (Pawar & Maheshwari, 2004). همچنین ریزنمونه‌های برگی گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) نسبت به ریزنمونه دم‌برگ از استعداد بیشتری برای تولید ریشه‌های مویین برخوردارند (Wang *et al*., 2006). در یکسری موارد نشان داده شده که ریزنمونه برگی نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها ریشه مویین کمتری تولید می‌کند (Brijwal & Tamta, 2015; Lee *et al*., 2017). تفاوت در وضعیت

www.SID.ir

Archive of SID

فیزیولوژیکی، سنتز DNA و تقسیم سلولی در بافت‌های مختلف، ممکن است دلیل توانایی متفاوت آنها برای تولید ریشه مویین باشد (Pirian *et al*., 2012).

تاکنون تأثیر سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* بر القای ریشه مویین در بسیاری از گیاهان مطالعه شده است. هر گونه گیاهی دارای ساختار دیواره سلولی، وضعیت فیزیولوژیکی و مولکول‌های علامت دهنده متفاوتی است که ممکن است موجب تفاوت در توانایی تشکیل ریشه مویین در گونه‌های مختلف باشد (Kuzovkina & Schneider, 2006). در این مطالعه تأیید شد که توانایی سویه‌های مختلف در انتقال ژن به سلول گیاهی متفاوت است. از بین سویه‌های بررسی شده در این آزمایش، سویه‌های ATCC15834 و A4 بیشترین کارایی را در تشکیل ریشه‌های مویین داشتند (شکل‌های ۳ و ۴). این تفاوت در بیماری‌زایی باکتری و ریشه‌زایی گیاه، به پلاسمیدهای قرار گرفته در سویه‌های باکتری مرتبط است (Ooi *et al*., 2013).

شکل ۳. ریشه مویین القاشده با سویه A4 در گونه دارویی زوفا
Figure 3. Hairy roots of hyssop (*Hyssopus officinalis*) induced by A4 strain

شکل ۴. ریشه مویین القاشده با سویه ATCC15834 در گونه زوفای باریک برگ
Figure 4. Hairy roots of hyssop (*Hyssopus angustifolius*) induced by ATCC15834 strain

همچنین دلیل دیگر این تفاوت‌ها، بیان متفاوت ژن‌های T-DNA در ریشه‌های تراریخت، تعداد کپی‌های متعدد T-DNA وارد شده و اثرات محل ورود T-DNAبه ژنوم گیاه می‌باشد (Akramian *et al*., 2008). همچنین، مشخص شده است انتقال و بیان پایدار انواع ژن‌های *rol* نقش به‌سزایی در تولید و سرعت رشد ریشه‌هایی مویین دارند، زیرا موجب افزایش حساسیت سلول‌ها به اکسین‌های درون‌زاد می شوند (Bonhomme *et al*., 2000). سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* از نظر القای ریشه مویین در یک ژنوتیپ گیاهی معین توانایی متفاوتی دارند (Christensen *et al*., 2009; Ercan *et al*., 1999; Mahesh & Jeyachandran, 2011).

فرایند انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به درون ژنوم سلول‌های گیاه میزبان مستلزم مشارکت باکتری و سلول گیاهی است، در گام بعدی، نوع گیرنده‌های دیواره سلولی گیاهی اهمیت ویژه‌ای در اتصال باکتری به سلول گیاه دارد (Tepfer, 1990). پدیده ریشه‌زایی مویین در اثر انتقال T-DNA آگروباکتریوم به ژنوم گیاه، نوعی رابطه دو جانبه میان باکتری و گیاه است و از این‌رو، لازم است به‌منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه‌های باکتری و ژنوتیپ گیاهی، مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی روی ژنوتیپ موردنظر آزمون شوند. از سوی دیگر، اطلاعات ژنتیکی انتقال‌یافته از پلاسمید Ri شامل ژن‌هایی است که سبب بیوسنتز اوپین‌های ویژه‌ای از قبیل آگروپین، مانوپین و کوکوموپین می‌شود که به‌منزله منبع کربن و نیتروژن برای باکتری عمل می‌کنند (Petersen *et al*., 1989). برخی مطالعات نشان می‌دهد سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* براساس نوع اوپین ساخته‌شده در بافت تراریخت شده توسط آن‌ها، توانایی‌های متفاوتی برای تلقیح بافت‌های گیاهی دارند. معمولاً سویه‌های آگروپینی توانایی بیشتری در تلقیح بافت‌های گیاهی دارند (Dessaux *et al*., 1993; Slightom *et al*., 1986). دو سویه ATCC15834 و A4 از نوع کوکوموپینی (Combard & Baucher, 1988) بوده و در پژوهش حاضر این دو سویه توانایی بالاتری برای تولید ریشه مویین داشتند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری کلی

تحقیق حاضر، اولین گزارش القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی زوفای باریک برگ است که با استفاده از سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز، به‌عنوان یک ناقل طبیعی و نیز القاکننده ریشه در گیاهان، به‌طور موفقیت‌آمیز به انجام رسیده است. نتایج نشان داد سویه‌های مختلف باکتری قابلیت متفاوتی در القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های گونه‌های زوفا داشتند و بیشترین درصد ریشه‌زایی از تلقیح گونه دارویی و باریک برگ زوفا به ترتیب با باکتری سویه A4 و ATCC15834 و در محیط کشت MS حاصل شد. نتایج حاصل از این تحقیق اطلاعات پایه مناسبی را جهت انتقال ژن و القای ریشه مویین به‌کمک اگروباکتریوم رایزوژنز در ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های جوان فراهم می‌کند. این نتایج می‌تواند به‌ویژه در تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش مانند ۱و ۸- سینئول، آلفا و بتا-پینن، پینوکامفون، ایزوپینوکامفون، کامفور، پینوکاروول و ایزوپینوکاروول در گیاه زوفا از طریق کشت ریشه‌های مویین مفید واقع شود.

REFERENCES

1. Akramian, M., Fakhr Tabatabaei, S.M. & 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), 759-763.
2. Asghari, Gh. & Salimian Rizi, T. (2008). The influence of fructose, glucose and sucrose on flavolignans formation in *Silybum marinum* callus culture. *Journal of Medicinal Plants*, 7, 16-23.
3. Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D. & Fliniaux, M.A. (2000). Effects of the *rol C* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. *Journal of Natural Products*, 63, 1249-1252.
4. Brijwal, L. & Tamta, S. (2015). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. *Springer Plus*, 4, 443-453.
5. Chandran, R.P. & Potty, V. (2008). Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 129-132.
6. Chen, H. & Chen F. (2000). Induction ofInfluence of different strains of *Agrobacterium* phytoalexin formation in crown gall and hairy rootrhizogenes on induction of hairy roots and culture of *Salvia miltiorrhiza* by methyl viologen. *Biotechnology Letters*, 22, 715-20.
7. Chilton, Md., Tepfer, Da., Petit, A., David, C. Casse-Delbart & Tepe, G. (1982*), Agrobacterium rhizogenes* insert T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 295, 432-4.
8. Christensen, B., Sriskandarajah, S. & Müller, R. (2009). Transformation of *Hibiscus rosa-sinensis* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84, 204-208.
9. Combard, A. & Baucher, M.F. (1988). A common organization of the *T-DNA* genes expressed in plant hairy roots induced by different plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology*, 10, 499-509.
10. Dessaux, Y., Petit, A. & Tempe, J. (1993). Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. *Phytochemistry*, 34, 31-38.
11. Do, CB. & Cormier, F. (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape *(Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9, 143-146.
12. Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bull*, 19, 11-15.
13. Dzhumaev, Kh.K. (1986). Dynamics of essential oil accumulation in *Hyssopus seravschanicus*. *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal*, 6, 31-33.
14. Ercan, A.G., Taşkin, K.M., Turgut, K. & Yüce, S. (1999). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 23, 373-378.
15. Garg, S., Naqvi, A.A., Singh, A., Ram, G. & Kumar, S. (1999). Composition of essential oil from an annual crop of *Hyssopus officinalis* grown in Indian plains. *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 170-172.
16. George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.J.D. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Volume 1. Springer, Netherlands.
17. Gollapudi, S., Shara, H.A., Aggarval, S., Byers, L.D., Ensley, H.E. & Gupta S. (1995). Isolation of a previously unidentified polysacharide (MAR-10) from *Hyssopus officinalis* that exhibits strong activity agains human imunodeficiency virus type 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210, 145-151.

www.SID.ir

Archive of SID

18. Gorunovic, M., Bogavac, P., Chalchat, J. & Chabardi J. (1995). Essential oil of *Hyssopus officinalis* L. Lamiaceae of Montenegro original. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 39-43.
19. Hasanloo, T. (2006). *Study of some secondary metabolites in Silybum marianum from different area of Iran and its cell and tissue culture for production of silymarin*. Ph.D. Thesis. Iranshahr University Iran.
20. Hu, Z.B. & Du, M. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48, 121-127.
21. Ishida, J.K., Yoshida, S., Ito, M., Namba, S. & Shirasu, K. (2011). *Agrobacterium rhizogenes*- mediated transformation of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *PloS One*, 6(10), e25802.
22. Kittipongpatana, N., Darryl, L., Davis & John, R. Porter. (2002). Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 71, 65 - 75.
23. Kizil, S., Toncer, O., Ipek, A., Arslan, N., Saglam, S. & Khawar, K.M. (2008). Blooming stages of Turkish hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) affect essential oil composition. *Acta Agriculture Scandinavia, Section B-Soil and Plant Science*, 58(3), 273-279.
24. Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilin, E. & Karatas H. (2010). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3), 99-103.
25. Kochan, E., Wysokinska, H. & Chmiel A. (1999). Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*. *Der Naturforscher*. 54c, 11.16182-16185.
26. Kuzovkina, I.N. & Schneider, B. (2006). *Progress in botany*. Springer, Berlin, Heidelberg. (pp: 275-314).
27. Lee, S.Y., Xu, H., Kim, Y.K. & Park, S.U. (2007). Rosmarinic acid production in hairy root cultures of Kuntze. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, 969-972.
28. Li, W., Koike, K., Asada, Y., Yoshikawa, T. & Nikaido, T. (2005). Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80, 151-155.
29. Mahesh, A. & Jeyachandran, R. (2011). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root induction in *Taraxacum officinale* and analysis of sesquiterpene lactones. *Plant Biosystems*, 145, 620-626.
30. Mitic, V. & Dordevic, S. (2000). Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Serbia. *Facta Universitatis- Series*: *Physics Chemistry and Technology*, 2, 105-108.
31. Mojab, F., Mosadegh, M., Monsefesfahani, H.R. & Najari, A. (2002). Examination of retail journalism and identification of components essential oil *Hyssopus officinalis*. *Journal of Pazhohandeh*, 8(2), 9-15. (In Farsi)
32. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
33. Nanova, Z., Slavova, Y., Nenkova, D. & Ivanova, I. (2007). Microclonal propagation of *Hyssopus officinalis*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13, 213- 219.
34. Nguyen, C., Bourgaud, F., Forlot, P. & Guckert, A. (1992). Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Reports*, 11, 424-427.
35. Omidbagi, R., Borna, F., Borna, T. & Inotai, K. (2009). Sowing dates affecting on the essential oil content of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* l) and its constituents. *Journal of Bearing Plants*, 15(5), 580-5.
36. Ooi, C.T., Syahida, A., Stanslas, J. & Maziah, M. (2013). Efficiency of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction in *Solanum mammosum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(3), 421-430.
37. Ozer, H., Sahin, F., Kilic, H. & Gulluce, M. (2005). Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. subsp. Angustifolius (Bieb.) Archangelic from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 42 44.
38. Pawar, P.K. & Maheshwari, V.L. (2004). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 414-417.
39. Petersen, S.G., Stummann, B.M., Olesen, P. & Henningsen, K.W. (1989). Structure and function of rootinducing (Ri) plasmids and their relation to tumorinducing (Ti) plasmids. *Physiologia Plantarum*. 77, 427-435.
40. Pirian, K., Piri, K. & Ghiyasvand, T. (2012). Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to noradrenaline's production. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 642-649.
41. Rechinger, K.H. (1982). Labiatae. *Flora Iranica*. Akademische Drucku-Verlagsanstalt, *Graz*, (598 pp).
42. Rechinger, K.H. (1984). Alliaceae. *Flora Iranica*, Akademische Drucku-Verlagsanstalt, *Graz*, (85 pp).
43. Said-Al Ahl, H., Abbas, Z., Sabra, A. & Tkachenko, K. (2015). Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* cultivated in Egypt. *International Journal of Plant Research*, 1 (2), 49-53
44. Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2344 pp).

www.SID.ir

Archive of SID

45. Slightom, J.L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L. & Tepfer, D. (1986). Nucleotide sequence analysis of TLDNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 108-121.
46. Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, K.H. & Hasanloo, T. (2012). Hairy root induction in burdock (*Arctium lappa* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 44, 176-184.
47. Sreeramanan, S., Vinod, B., Sashi, S. & Xavier, R. (2008). Optimization of the transient *Gusa* gene transfer of Phalaenopsis *Violacea orchid* via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. *Advances in Natural & Applied Sciences*, 2, 77-89.
48. Srivastava, S. & Srivastava, A.K. (2007) Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 29-43.
49. Tada, H., Murakami, Y., Omoto, T., Shimomura, K. & Ishimaru, K. (1996). Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 42, 431-434.
50. Tao, J. & Li, L. (2006). Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany*, 72, 211-216.
51. Tepfer, D. (1990). Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiology*, 79, 140-146.
52. Vallejo, M., Herraiz, J., Perez-Alonso, M. & Velasco Negueruela, A. (1995). Volatile oil of *Hyssopus officinalis* L. from Spain. *Journal*. *Essential Oil Research*, 7, 567-568.
53. Vanhala, L., Hiltunen, R. & Oksman-Caldentey, K.M. (1995). Virulence of different *Agrobacterium* strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Reports*, 14, 236-240.
54. Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L. & Zhang, Y. (2006). Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53, 101-104.
55. Wang, Q.J., Zheng, L.P., Yuan, H.Y. & Wang, J. (2013). Propagation of *Salvia miltiorrhiza* from hairy root explants via somatic embryogenesis and tanshinone content in obtained plants. *Industrial Crops and Products*, 50, 648-653.
56. Wesołowska, A., Jadczak, D. & Grzeszczuk, M. (2010). Essential oil composition of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) cultivated in north-western Poland. *Herba Polonica*, 56 (1), 57-65.

www.SID.ir