

القای ریشه های مویین در گیاه ماریتغال (*Silybum marianum* L.)
از طریق سویه های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز

Hairy root induction in *Silybum marianum* L. through
diverse *Agrobacterium rhizogenes* strains

محمدعلی اعظمی^{۱*}، الهام رحمانی^۱ و محمدباقر حسن پور اقدام^{۱،۲}

Mohammadali Ali Aazami^{1*}, Elham Rahmani¹ and Mohammad Bagher
Hassanpouraghdam^{1, 2}

۱- گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۲- مرکز پژوهش های مجلس شورای اسلامی، تهران، ایران

1. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Maragheh University,
Maragheh, Iran

2. Islamic Parliament Research Center, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aazami58@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۹/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۵)

چکیده

واژه های کلیدی

آگروباکتریوم رایزوزنز،

ریز نمونه،

ریشه مویین،

ماریتغال،

متابولیت های ثانویه

خارمریم یا ماریتغال با نام علمی *Silybum marianum* L. عضوی از خانواده کاسنی (Asteraceae) است. گیاهی یک یا دو ساله که در تمام مناطق شمالی، غرب و جنوب ایران می-روید. میوه این گیاه حاوی ترکیبی فلاونوئیدی به نام سیلی مارین است. این تحقیق به منظور بهینه-سازی شرایط کشت ریشه های مویین و بررسی تأثیر عوامل مختلف (سن و نوع ریزنمونه و نوع سویه باکتری) بر القا و رشد ریشه های مویین توسط آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه ماریتغال صورت گرفت. برای این منظور، ابتدا بذور گیاه ماریتغال بر روی محیط MS جامد کشت شده و در اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از جوانه زنی بذور و رشد گیاهچه ها، ریزنمونه هایی از برگ، هیپوکوتیل و ریشه در سنین مختلف ۵، ۱۰ و ۱۵ روزه انتخاب شدند و با سویه های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز (R1000 و ATCC15834) تلقیح شدند. روش تلقیح و بهینه سازی محیط کشت و تأثیر غلظت های مختلف ساکارز بر ایجاد ریشه های مویین بررسی گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ریز نمونه هیپوکوتیل ۵ روزه تلقیح یافته با سویه ATCC15834 درصد ریشه های مویین بیشتری تولید کرد، کم ترین درصد القای ریشه مویین مربوط به سویه R1000 و ریزنمونه برگ ۱۵ روزه مشاهده شد. بین دو روش تلقیح غوطه وری و تزریق از لحاظ آماری تفاوت معنی دار وجود داشته و بیش ترین درصد القای ریشه های مویین مربوط به روش غوطه وری بود. تأثیر غلظت های مختلف ساکارز نشان داد که بیش ترین درصد القایی ریشه های مویین مربوط به محیط حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود.

مقدمه

تأمین ترکیبات شیمیایی با استفاده از کشت سلولی به عنوان جایگزین کشت زراعی گیاهان دارویی و یا جمع‌آوری آنان از طبیعت مزایای زیادی از جمله مصون بودن از آفات و بیماری‌های گیاهی، کنترل نوسانات کیفیت و کمیت تولید، کوتاه و پرسرعت بودن زمان فرآیند تولید و غیره را دارا می‌باشند (Alfermann and Petersen., 1995). در بعضی از گونه‌های گیاهی ژن‌های مسئول مراحل کلیدی مسیرهای بیوسنتزی در کشت سوسپانسیون، دست نخورده باقی مانده و فقط در زمان تمایز و سازمان یافتگی سلول-ها فعال می‌شوند. این مشاهده علاقه به راهبرد استفاده از کشت ریشه‌های موین که دارای سرعت رشد سریع می‌باشند را افزایش داده است. ریشه‌های موین تولید شده توسط آگروباکتریوم رایزوزنز، اندامی مناسب جهت تولید متابولیت‌های ثانویه هستند (Shen et al. 1988). بیوسنتز شیمیایی ترکیبات با ارزش دارویی به دلیل پیچیدگی ساختمان آن‌ها مشکل بوده و به همین دلیل ریشه‌های موین که اندام‌های تمایز یافته و تغییر شکل یافته هستند، باعث تسهیل در دسترسی به عملکردهای بالاتری از متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با ریشه‌های معمولی گیاه می‌شوند. به علت پایداری و تولید زیاد این اندام‌ها در شرایط کشت عاری از هورمون، گونه‌های دارویی زیادی، با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز جهت تولید متابولیت‌های ثانویه بهینه شده‌اند (Hasanloo et al. 2008). توانایی آگروباکتریوم رایزوزنز در القای ریشه موین، در تعدادی از گیاهان منجر به استفاده از ریشه‌های موین به عنوان منبعی برای تولید فرآورده‌های دارویی گردیده است (Subroto et al. 1996; Cai et al. 1995). کلون‌های ریشه-های موین به علت الحاق تصادفی T-DNA به ژنوم گیاه، تنوع رشدی و الگوی تجمع متابولیت‌های متفاوتی را نشان می‌دهند (Mano et al. 1989).

بزرگ‌ترین مزیت ریشه‌های موین، توان بالای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در مقایسه با گیاهان مادری است. کشت ریشه‌های موین قادر به بیوسنتز و تجمع بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با ارزش هستند که در شرایط طبیعی در ریشه سنتز می‌شوند و

همچنین متابولیت‌های ثانویه‌ای که فقط در قسمت‌های هوایی یک گیاه تجمع می‌یابند برای مثال، ریشه‌های موین *Scutellaria baicalensis* به جای مشتقات گلوکز فلاونوئیدهای گلوکوزیدی را تولید نمودند (Nishikawa et al. 1997). ثبات ژنتیکی نیز از دیگر ویژگی‌های ریشه‌های موین بوده که در آزمایشات مختلف به اثبات رسیده است (Bagnhalian et al. 2000).

فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی بر رشد و تولید ریشه‌های موین تأثیر گذارند. بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت جهت دستیابی به بالاترین میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موین ضروری می‌باشد. نوع سویه باکتری، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه، منبع کربن و غلظت آن، غلظت یون‌های موجود در محیط کشت، pH محیط کشت، نور، فیتوهورمون‌ها و دما همگی بر رشد و متابولیسم ثانویه ریشه‌های موین مؤثر هستند (Morgan et al. 2000; Vanhala et al. 1998). استفاده از روش‌هایی نظیر الیسیتاسیون، تغذیه با پیش‌سازها، تراواسازی، به دام انداختن مولکول‌های آزاد شده در محیط مایع و سیستم کشت توأم از جمله روش‌هایی هستند که به منظور بهبود تولید در کشت ریشه‌های موین بکار گرفته شده‌اند (Wu, 2007).

مواد کربنی نیز به شدت در رشد و تولید متابولیت‌ها در ریشه‌های موین مؤثر می‌باشند. برای مثال استفاده از فروکتوز به جای ساکارز، باعث دو برابر شدن تولید کاتارانتین در پروانش شد با این وجود، رشد در حدود ۴۰ درصد کاهش یافت که برای رفع این مشکل از یک سیستم کشت دو مرحله‌ای استفاده شد، ابتدا ریشه‌ها در ساکارز رشد داده شدند و سپس برای افزایش تولید متابولیت ثانویه به داخل محیط حاوی فروکتوز منتقل شدند (Hashimoto et al. 1993). با افزایش غلظت ساکارز در محیط کشت میزان رشد ریشه‌ها نیز افزایش یافت (Wu, 2007).

انتخاب نوع سویه آگروباکتریوم رایزوزنز که ژنوتیپ گیاهی مورد نظر را به نحو مطلوب آلوده نماید و انتخاب ریزنمونه مناسب گیاهی جهت تلقیح با باکتری از جمله عوامل مؤثر در انتقال ژن به گیاهان می‌باشد (Kabirnetaj et al. 2012). ریشه‌های موین در گیاه مارتیغال بوسیله تزریق و غوطه‌وری ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، برگ و کوتیلدون با آگروباکتریوم رایزوزنز (AR15834) القا شد (Rahnama et al. 2008). در مطالعه دیگر

طول مدت کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت (تلقیح در محیط کشت LB مایع و سپس همکشتی در محیط کشت 1/2 MS)، درصد القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌ها ثبت گردید. در آزمایش دوم مقایسه دو روش تلقیح (روش غوطه‌وری و تزریق) بر درصد القای ریشه‌های مویین در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گردید. مقایسه مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین پس از تلقیح توسط باکتری در ریزنمونه‌های مختلف گیاه ماریتیغال بررسی شد. هر پتری‌دیش یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و داخل هر پتری‌دیش ۱۵ عدد ریزنمونه کشت گردید. در آزمایش سوم پس از مشخص شدن بهترین سویه و بهترین ریزنمونه جهت القاء ریشه‌های مویین در گیاه ماریتیغال دو نوع محیط کشت (MS و 1/2 MS) با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشخص شدن بهترین محیط کشت مایع جهت استقرار ریشه‌های مویین در مرحله قبلی، تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز (۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر) بر میزان تولید ریشه‌های مویین مورد بررسی قرار گرفت.

کشت باکتری، تلقیح و هم کشتی ریزنمونه: دو سویه آگروباکتریوم رایزوزنز (R1000 و 15834) جهت القای ریشه‌های مویین مورد استفاده قرار گرفت. جهت کشت باکتری‌ها از محیط کشت LB (Bertani, 1952) جامد و جهت تهیه سوسپانسیون باکتری به منظور تلقیح از محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک ری‌فامپسین با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر استفاده گردید. تک کلون هر یک از سویه‌های باکتری در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی-لیتری که هر یک حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت LB مایع و حاوی ۱۵۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک ری‌فامپسین با غلظت ۵۰۰ میلی-گرم در لیتر بودند، کشت گردید. رشد باکتری در داخل شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور دقیقه در شرایط تاریکی، به مدت ۴۸ ساعت انجام گردید. غلظت بهینه باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD₆₀₀) توسط دستگاه اسپکتوفتومتر تقریباً بین ۰/۷-۰/۶ قرائت گردید. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، برگ و ریشه‌ی ۵، ۱۰ و ۱۵ روزه جهت تلقیح با باکتری آماده شدند. بدین منظور ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های مادری جدا شده و در داخل پتری‌دیش استریل به صورت جداگانه قرار گرفتند. در مرحله بعد جهت نفوذ بهتر باکتری به درون ریزنمونه‌ها، در سطح

فقط از برگ‌های کوتیلدونی برای القای ریشه‌های مویین با آگروباکتریوم رایزوزنز (AR15834) در گیاه ماریتیغال استفاده گردید (Khalili et al 2010).

این پژوهش به منظور القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و ریشه گیاه ماریتیغال توسط سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز (R1000 و ATCC15834) و بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌ها در محیط کشت MS جامد در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ریز نمونه گیاهی: بذور گیاه ماریتیغال از شرکت پاکان بذور اصفهان تهیه و جهت کشت در شرایط درون شیشه‌ای و تهیه ریزنمونه‌های استریل جهت القای ریشه‌های مویین در این گیاه مورد استفاده قرار گرفتند. حدود ۵ ساعت قبل از کشت، برای شکستن دوره‌ی خواب، بذرها در محلول جیبرلین خیسانده شد و ضدعفونی بذور با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس در الکل ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه انجام گرفت و شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. بذور استریل شده در محیط کشت MS جامد شامل ۸ گرم در لیتر آگار کشت شدند. کشت‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به منظور جوانه‌زنی نگهداری شدند. القای ریشه‌های مویین در سه ریزنمونه مختلف از گیاه ماریتیغال مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌هایی ۵، ۱۰ و ۱۵ روز به عنوان ریزنمونه برای تلقیح با باکتری استفاده گردیدند.

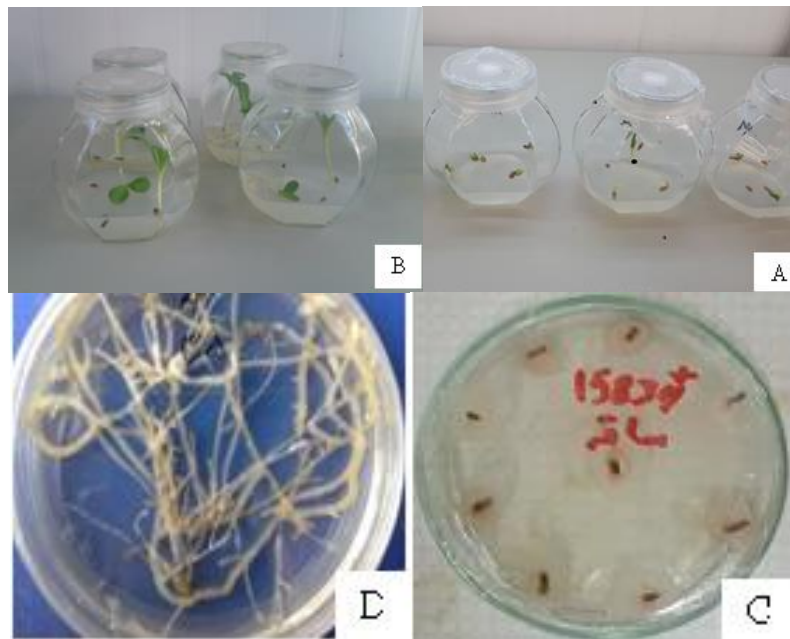
آزمایش اول به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل سویه باکتری (R1000 و 15834)، سن ریزنمونه جهت تلقیح (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) و ریزنمونه‌های مختلف گیاه ماریتیغال (هیپوکوتیل، برگ و ریشه) در سه تکرار انجام شد. هر پتری‌دیش به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و داخل هر پتری‌دیش ۱۵ عدد ریزنمونه تلقیح یافته کشت گردید. نمونه‌های کنترل نیز بدون تلقیح کشت گردید. در

واکنش زنجیره ای پلی مرز به منظور تأیید حضور ژن *rolB* آگروباکتریوم رایزوترز در ریشه های موین انجام گردید. توالی آغازگرها به صورت زیر بود. 5'-
' 3- ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTCCACGA- (آغازگر مستقیم)- و ' 3- TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTACTGCAGC- 5' (آغازگر معکوس). به منظور تکثیر قطعات 780bp ژن *rolB* مورد استفاده قرار گرفتند. جهت آماده سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش، از ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (آغازگرهای مستقیم و معکوس) با غلظت ۱۰ میکرومول در لیتر، ۱۲/۵ میکرولیتر از کیت آماده PCR master mix شرکت Cinna Gen (حاوی بافر 10xPCR، آنزیم 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. لازم به ذکر است که تمامی مراحل تهیه PCR mix تحت شرایط استریل زیر هود لامینار و بر روی یخ انجام گردید. برنامه PCR شامل واسرشت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۹۴ درجه سانتی گراد، سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل: مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی - گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود که با دستگاه Bio-RAD Mj-mini انجام شد. به منظور مشخص شدن اندازه قطعات حاصل، از DNA مارکر 1kb شرکت Cinna Gen استفاده گردید. جهت تعیین کیفیت، ۶ میکرولیتر از DNA استخراج شده در داخل ۳ میکرولیتر آب دیونیزه حل شده و حدود ۳ میکرولیتر بافر رنگ آمیزی متیلن بلو به آن اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل، درون چاهک های ایجاد شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در دستگاه الکتروفورز افقی قرار گرفت. ژل آگارز توسط نور UV با استفاده از دستگاه ژل داگ (KiAGEN, Model: CCD-5) آشکارسازی گردید.

ریزنمونه ها به وسیله اسکالپل و به صورت تصادفی، زخم هایی ایجاد گردید. سوسپانسیون باکتری آماده شده برای هر سویه نیز به درون پتری دیش های جداگانه ریخته شده و ریزنمونه ها درون سوسپانسیون هر یک از سویه های باکتری به طور جداگانه و به مدت ۱۵ دقیقه غوطه ور شدند. ریزنمونه های تلقیح شده به محیط کشت MS جامد (محیط هم کشتی ریزنمونه با باکتری) منتقل شدند. نمونه شاهد نیز بدون تلقیح با باکتری در محیط کشت قرار گرفت. محیط های کشت به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی - گراد، تحت شرایط تاریکی و به مدت ۴۸ ساعت منتقل شدند.

باکتری زدایی و بهینه سازی ظهور ریشه های موین: بعد از گذشت ۴۸ ساعت جهت حذف باکتری، ریزنمونه ها پس از حذف رطوبت اضافی آن ها به وسیله کاغذ صافی استریل، به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم فاقد هورمون های گیاهی منتقل شدند. عمل واکنش ریزنمونه ها و انتقال به محیط MS جدید حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم تا چهار نوبت و تا حذف کامل باکتری ادامه یافت. پس از ظهور ریشه های موین در ریزنمونه ها، جهت افزایش رشد ریشه ها در محیط جامد، هر یک از ریزنمونه های ریشه دار، به صورت تکی به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون های گیاهی و حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. عمل واکنش ریزنمونه - ها در محیط جدید هر دو هفته یکبار صورت گرفت و در هر بار واکنش، اندکی از بافت ریزنمونه حذف گردید و در نهایت با حذف کامل ریزنمونه، ریشه های موین بدون نیاز به بافت ریزنمونه، به راحتی و با سرعت زیاد در محیط کشت تکثیر یافتند. حداقل ۴ بار عمل واکنش ریشه های موین در محیط کشت MS جامد انجام گردید و هر بار غلظت آنتی بیوتیک سفوتاکسیم به نصف کاهش یافت (شکل ۱).

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه های موین: جهت اثبات تراریخت بودن ریشه های موین تولید شده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی هر یک از ریشه های موین با استفاده از روش CTAB (Khan et al. 2007) استخراج گردیدند.



شکل ۱- الف) کشت درون شیشه ای بذور گیاه ماریتیغال ب) گیاهچه های رشد یافته در محیط MS پ- ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه ماریتیغال تلقیح شده با باکتری سویه ATCC15834 جهت باکتری زدایی پس از گذشت ۴۸ ساعت ج- ظهور ریشه های موین از ریزنمونه های هیپوکوتیلی ۵ روزه تلقیح شده با سویه ATCC15834 گیاه ماریتیغال در محیط کشت MS جامد

Fig 1. A. *In vitro* culture of *S. marianum* seeds. **B.** Seedlings grown on MS medium. **C.** Hypocotyl explants of *S. marianum* inoculated with ATCC15834 strain for bacterial removal after 48 hrs. **D.** Hairy roots emergence on 5-days old hypocotyl explants inoculated with ATCC15834 strain on solid MS medium.

نتایج و بحث

درصد تولید ریشه موین

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که فاکتورهای مورد استفاده شامل سویه های باکتری، سن ریزنمونه، نوع ریزنمونه و همچنین اثر متقابل دوگانه بین سویه های مختلف باکتری و سن ریزنمونه، سویه های مختلف باکتری و نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه و نوع ریزنمونه و همچنین اثر متقابل سه گانه بین سویه باکتری، سن ریزنمونه و نوع ریزنمونه در سطح یک درصد معنی دار بودند (جدول ۱).

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه (شکل ۲) نشان داد که از بین سویه های مورد مطالعه، سویه 15834 در ریزنمونه هیپوکوتیل ۵ روزه در مقایسه با تیمارهای همین سویه در تلقیح ریزنمونه ریشه و برگ و همچنین سویه R1000 در هر سه ریزنمونه درصد ریشه های موین بیشتری (۶۷ درصد) حاصل نمود، در حالی که کمترین درصد ریشه زایی (۲۳ درصد) مربوط به سویه R1000 در ریزنمونه برگ ۱۵ روزه مشاهده شد. در

ریزنمونه های هیپوکوتیل ۱۱ روز، در ریزنمونه های برگ ۱۳ روز و ریشه ۱۵ روز بعد از هم کشتی و شستشو با آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۵۰۰ میلی گرم در لیتر) و انتقال به محیط فاقد هورمون ریشه های موین ظاهر شدند. در این بررسی مشاهده شد که زمان تشکیل ریشه موین بر اساس تعداد روز بعد از تلقیح با سویه های متفاوت آگروباکتریوم رایزوزنز در هر سه نوع ریزنمونه متفاوت بود، به طوری که در ریزنمونه هیپوکوتیل تلقیح شده با سویه 15834 نسبت به سویه R1000 مدت زمان ظهور ریشه های موین بعد از هم کشتی ریزنمونه ها کمتر بود. لذا کارایی تراریختی در سویه 15834 بهتر از سویه R1000 بود. ریشه های موین در ریزنمونه های برگ تلقیح یافته با هر دو سویه تقریباً به طور همزمان دیده شد. ریزنمونه ریشه نسبت به سایر ریزنمونه ها در مدت زمان طولانی تری ریشه های موین را ظاهر نمود. احتمالاً این امر به دلیل ماهیت سلول های ریشه به واکنش پذیری و تهییج دیرتر و کمتر این اندام ها بخاطر بیوستت و محتوای بالای اکسین می باشد که مانع ریشه زایی و نمو متعاقب ریشه ها می شود (Shen et al. 1988).

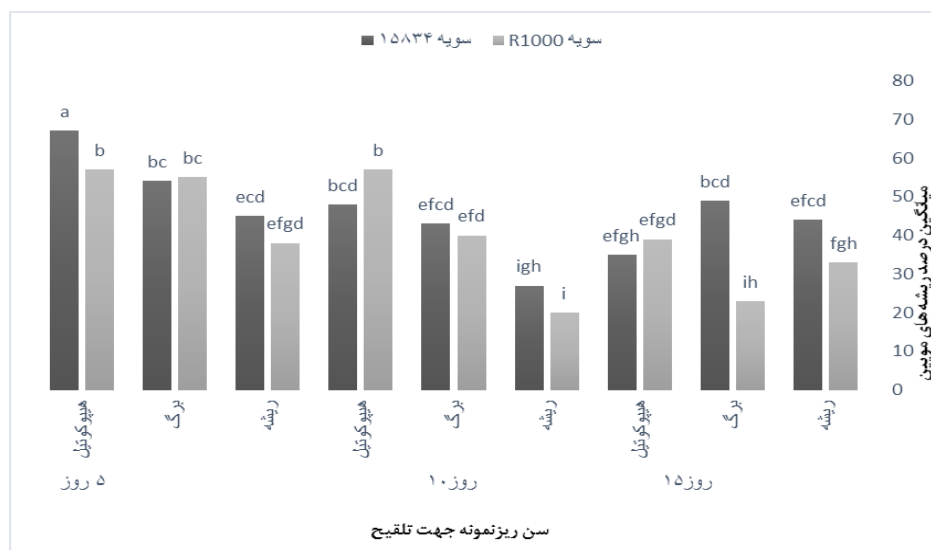
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر نوع سویه ، سن و نوع ریزنمونه بر القاء ریشه های موپین گیاه ماریتیغال

Table 1. Analysis of variance for the effects of strain type, age and type of explant on hairy root induction of *S. marianum*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد القای ریشه موپین
سویه باکتری (A)	۱	۰/۰۳۴**
سن ریزنمونه (B)	۲	۰/۱۳۰**
نوع ریزنمونه (C)	۲	۰/۱۲۳**
سویه باکتری * سن ریزنمونه (A*B)	۲	۰/۰۱۵**
سویه باکتری * نوع ریزنمونه (A*C)	۲	۰/۰۲۰**
سن ریزنمونه * نوع ریزنمونه (B*C)	۴	۰/۰۴۲**
سویه باکتری * سن ریزنمونه * نوع ریزنمونه (A*B * C)	۴	۰/۰۱۵**
خطا آزمایش	۳۶	۰/۰۰۴۱
ضرب تغییرات		۱۴/۷۱

ns, **: به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۱٪

ns, **: non-significant, significant at 1% probability level, respectively

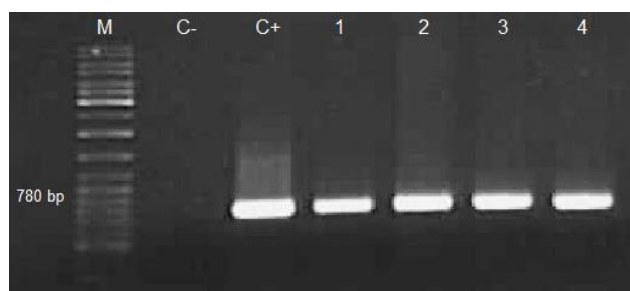


شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع سویه ، سن و نوع ریزنمونه بر القاء ریشه های موپین گیاه ماریتیغال

Fig 2. Mean comparison for the interaction of strain type, age and type of explant on hairy root induction of *S. marianum*

ریشه های طبیعی دارای الگوی رشدی ژئوتروپیک (زمین گرا) بوده، درحالی که ریشه های موپین پاسخ رشدی پلاژیوتروپیک (عدم زمین گرایی) را نشان می دهند که احتمالاً رشد پلاژیوتروپیک به دلیل فقدان پلاستیدهای مختلف از جمله آمیلوپلاست در دانه های نشاسته ای ریشه های موپین می باشد. ویژگی بارز دیگر، وجود انشعابات بیشتر و کوتاه تر ریشه های موپین می باشد که دلیل آن احتمالاً بیوستز بیشتر اکسین در ریشه های موپین (تراریخت) است چرا که افزایش غلظت اکسین در ریشه ها باعث ایجاد ریشه - های فرعی بیشتر و کوتاه شدن طول ریشه ها می شود. اکسین در مرحله شروع ریشه زایی نقش به سزایی دارد (Shen et al. 1988). در این پژوهش، درصد بالای تراریختی در ریزنمونه های ۵ روزه ای می تواند ناشی از حساسیت بالای این ریزنمونه به باکتری در مقایسه با سایر ریزنمونه های به کار رفته باشد که این حساسیت به وضعیت فیزیولوژیکی بافت ها نیز بستگی دارد (Pawar et al. 2003). ریزنمونه های جوان تر بیشترین پاسخ تراریختی را نشان دادند. با توجه به روند تولید ریشه موپین در شکل ۲ احتمالاً سن ریزنمونه گیاهی تأثیر مهمی بر تولید ریشه های موپین داشت

ریشه های طبیعی دارای الگوی رشدی ژئوتروپیک (زمین گرا) بوده، درحالی که ریشه های موپین پاسخ رشدی پلاژیوتروپیک (عدم زمین گرایی) را نشان می دهند که احتمالاً رشد پلاژیوتروپیک به دلیل فقدان پلاستیدهای مختلف از جمله آمیلوپلاست در دانه های نشاسته ای ریشه های موپین می باشد. ویژگی بارز دیگر، وجود انشعابات بیشتر و کوتاه تر ریشه های موپین می باشد که دلیل آن احتمالاً بیوستز بیشتر اکسین در ریشه های موپین (تراریخت) است چرا که افزایش غلظت اکسین در ریشه ها باعث ایجاد ریشه - های فرعی بیشتر و کوتاه شدن طول ریشه ها می شود. اکسین در مرحله شروع ریشه زایی نقش به سزایی دارد (Shen et al. 1988). در این پژوهش، درصد بالای تراریختی در ریزنمونه های ۵ روزه ای می تواند ناشی از حساسیت بالای این ریزنمونه به باکتری در مقایسه با سایر ریزنمونه های به کار رفته باشد که این حساسیت به وضعیت فیزیولوژیکی بافت ها نیز بستگی دارد (Pawar et al. 2003). ریزنمونه های جوان تر بیشترین پاسخ تراریختی را نشان دادند. با توجه به روند تولید ریشه موپین در شکل ۲ احتمالاً سن ریزنمونه گیاهی تأثیر مهمی بر تولید ریشه های موپین داشت



شکل ۳- واکنش زنجیره ای پلی مرز جهت تأیید حضور ژن *rolB* در ریشه های تراریخت گیاه ماریتغال. M: DNA نشانگر 10000 bp (cinna Gen)، C⁻: ریشه های شاهد غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی، C⁺: آگروباکتریوم سویه 15834 به عنوان کنترل مثبت، لاین ۱ تا ۴: ریشه های موین القا شده در ریز نمونه های هیپوکوتیل گیاه ماریتغال توسط آگروباکتریوم ریزوژن

Fig 3. PCR for the verification of *rolB* gene presence on the transformed hairy roots of *S. marianum*. M: 1kb DNA ladder (Cinna gene), C⁻: non-transformed strains as negative control, C⁺: *Agrobacterium rhizogenes* 15834 strain as positive control, Lines 1-4: Hairy roots induced on the hypocotyl explants of *S. marianum* by the inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس تأثیر نوع سویه و نوع ریزنمونه بر مدت

زمان ظهور ریشه های موین در گیاه ماریتغال

Table 2. Analysis of variance for the effects of strain and explant type on the time needed for hairy roots induction in *S. marianum*

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۵/۵*	۱	سویه باکتری
۳۴۵/۷*	۲	ریزنمونه
۵/۰۵*	۲	سویه * ریزنمونه
۰/۸۸	۱۲	خطا آزمایش
۴/۷۴		ضرب تغییرات

ns, **, * : به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

ns, * and **: non-significant, significant at 1% and 5 % probability levels, respectively

مدت زمان ظهور ریشه های موین

با توجه به اینکه ریزنمونه های ۵ روزه در آزمایشات قبلی نتایج بهتری نشان داده است در آزمایشات مربوط به مدت زمان ظهور فقط ریزنمونه های ۵ روزه انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه گیاهی در مدت زمان ظهور ریشه های موین در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که سریع ترین زمان ظهور ریشه های موین توسط سویه 15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل در مدت زمان ۱۰ روز و دیرترین زمان ظهور، در ریزنمونه های برگ

(Kabiirnetaj et al. 2012). در تحقیقی که بر روی گیاه *Gmelina arborea* انجام گردید، ریزنمونه های ۵ روزه، ۱۵-۲۰ روزه و ۲۵-۳۰ روزه انتخاب و با سویه ATTCC15834 تلقیح یافت، که ریزنمونه های ۵ روزه بیشترین میزان القای ریشه موین (۳۲ درصد) را داشتند (Dhakulkar et al. 2004).

پاسخ محل زخم، فاکتور مهمی برای فرآیند انتقال ژن می باشد چرا که زخم، باعث تولید ترکیبات متعددی در نزدیکی محل زخم می شوند که در باززایی و فرآیند انتقال ژن مؤثراند. در فرآیند ایجاد پاسخ زخم، ریزنمونه های مختلف به زخم، پاسخ های متفاوتی را نشان می دهند (Potrykus et al. 1990). سلول های ریزنمونه، در بیوسنتز DNA و توانایی تقسیم سلولی به علت بلوغ فیزیولوژیکی متفاوت سلول ها، تفاوت دارند. مشخص است که توانایی سویه های مختلف در انتقال ژن به سلول گیاهی متفاوت است. از بین سویه های بررسی شده در این آزمایش سویه 15834 بیشترین کارایی در تشکیل ریشه های موین را داشت. این تفاوت در بیماریزایی به پلاسمیدهای قرار گرفته در سویه های باکتری مرتبط است (Nin et al. 1992). هم چنین دلیل دیگر این تفاوت ها بیان متفاوت ژن های T-DNA ریشه های تراریخته، تعداد کپی های متعدد T-DNA وارد شده و اثرات محل ورود T-DNA به ژنوم گیاه می باشد (Akramian et al. 2011).

تأیید تراریختی ریشه های موین با واکنش PCR

نتایج الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز برای ریشه های تراریخت احتمالی، حضور قطعه ۷۸۰ bp مربوط به ژن *rolB* را در ریشه های حاصل در ریزنمونه های مختلف توسط سویه های آگروباکتریوم ریزوژن به کار رفته، نشان داد (شکل ۳) همچنین در DNA حاصل از ریشه های طبیعی گیاه (به عنوان کنترل منفی) هیچ باند تکثیری در PCR مشاهده نگردید. به عبارت دیگر، حضور باند قوی در منطقه ۷۸۰ bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور ژن *rolB* در ریشه های موین بود (شکل ۳).

اجزای محیط کشت، گاهی اوقات می تواند نرخ رشد ریشه های مویین و میزان متابولیت های تجمع یافته را تغییر دهند. محیط های کشت MS، 1/2MS و B5، سه نوع محیط کشت استاندارد هستند که به صورت گسترده جهت کشت ریشه های مویین بسیاری از گیاهان استفاده می گردند. استنباط شده است که تفاوت در میزان یون های محیط کشت، اولین فاکتور مؤثر بر میزان رشد ریشه های مویین می باشد (Wu, 2007). در هر سه محیط MS، 1/2MS و B5، مقدار فسفر و کلسیم تقریباً مشابه است در حالی که مقدار نیتروژن متفاوت می باشد بنابراین مقدار نیتروژن می تواند به عنوان یک فاکتور مهم و کلیدی، رشد ریشه های مویین را تحت تأثیر قرار دهد (Wu, 2007). تأثیر محیط های کشت مختلف (MS، 1/2MS، B5، 1/2B5، WP و 1/2WP) بر القای ریشه های مویین در گیاه *Pueraria candollei* مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج نشان داد که، محیط 1/2 MS بیشترین وزن خشک ریشه مویین (0.13 ± 0.03 گرم) را تولید نمود و کمترین وزن خشک ریشه در محیط 1/2B5 حاصل شد (Udomsuk et al. 2009). ریشه های مویین شیرین بیان در محیط کشت NB در مقایسه با محیط WP، MS و B5 بهترین رشد (بیشترین وزن تر) را نشان داد (Mehrotra et al. 2008).

تأثیر غلظت های مختلف ساکارز بر میزان رشد ریشه های مویین

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها (شکل ۶) نشان داد که بیشترین درصد (۶۰ درصد) ریشه های مویین مربوط محیط حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود که این تیمار نسبت به سایر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی داری داشت. نتایج این مطالعه مشابه نتایج بررسی شریفی و همکاران جهت بررسی ریشه های مویین بر روی گیاه *Papaver bracteatum* است (Sharafi et al. 2013). ریشه های تولید شده در غلظت ۴۰ گرم در لیتر ساکارز از نظر مورفولوژی خیلی مناسب نبودند و رنگ متمایل به قهوه ای داشته اند که احتمالاً علت آن غلظت بیش از نیاز ساکارز برای جذب توسط گیاه است. به طور کلی غلظت های بالاتر ساکارز به دلیل از بین بردن توازن عناصر محیط اثرات سوئی در القای ریشه های مویین دارند (Gritothe et al. 2002).

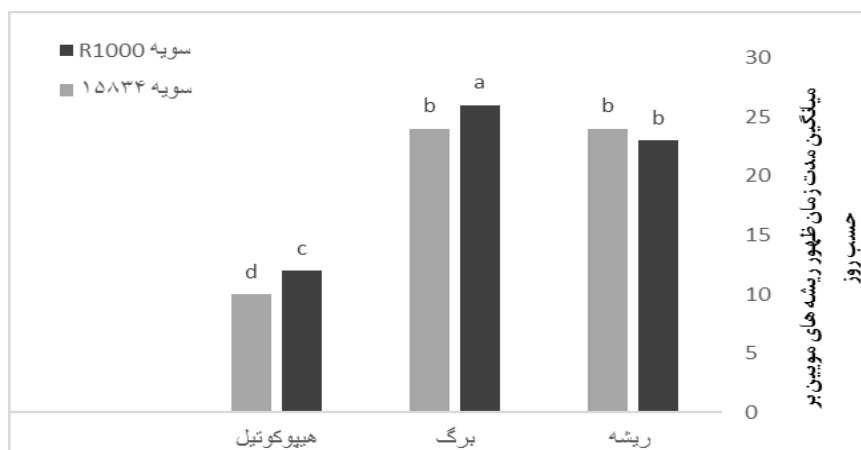
تلقیح یافته توسط سویه R1000 و در مدت زمان ۲۶ روزه مشاهده شد (شکل ۴). پاسخ های مختلف در زمان القای ریشه مویین، به سویه آگروباکتریوم رایزورژن و واکنش متقابل آن با گیاه میزبان و نوع بافت بستگی دارد (Veena and Taylor, 2007).

بررسی اثر روش های تلقیح (تزریق و غوطه وری) بر ریزنمونه هیپوکوتیل ۵ روزه توسط سویه 15834 آگروباکتریوم

مقایسه میانگین داده ها نشان داد که بین دو روش تلقیح غوطه وری و تزریق از لحاظ آماری تفاوت معنی دار وجود داشته و بیشترین درصد (۶۲ درصد) تلقیح مربوط به روش غوطه وری بوده در حالی که روش تزریق فقط کارایی ۵۲ درصدی داشته است که این برتری روش غوطه وری تایید کننده بررسی های Rahnema و همکاران (2008) در گیاه ماریتغال است. احتمالاً دلیل کارایی بهتر روش غوطه وری زخم نمودن ریزنمونه و تماس بیشتر سلول های ریزنمونه با سویه باکتری است که در این صورت باکتری دسترسی کامل برای نفوذ به بافت را دارد (Akbarian et al. 2011).

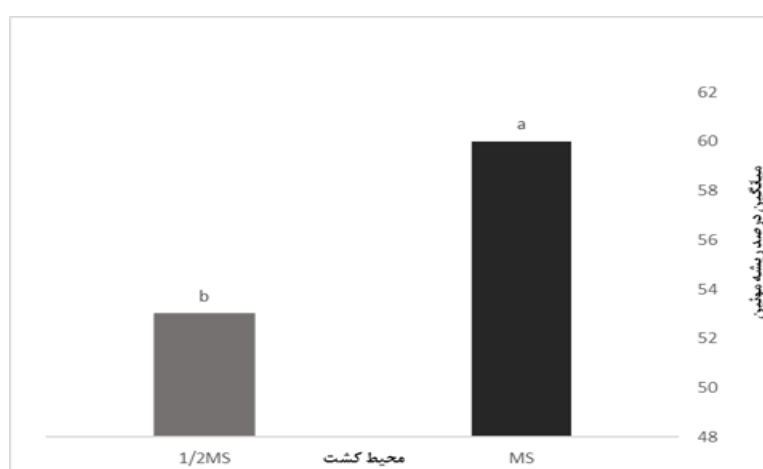
بررسی اثر نوع محیط کشت (MS، 1/2MS) بر ریزنمونه هیپوکوتیل ۵ روزه توسط سویه 15834 آگروباکتریوم

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر نوع محیط کشت (MS، 1/2MS) بر درصد ریشه زایی معنی دار بود. نمودار مقایسه میانگین داده ها نشان داد که محیط MS بیشترین درصد ریشه مویین (۶۰ درصد) را حاصل نمود در حالی که محیط 1/2MS درصد ریشه مویین کمتری (۵۳ درصد) تولید کرده است (شکل ۵). در مطالعات پیشین نیز برتری محیط MS در میزان رشد ریشه های مویین القاء شده در گیاه *Cichorium intybus* گزارش شده است (Kabirnotaj et al. 1391). طبق نتایج به دست آمده می توان محیط کشت MS را به منظور القای ریشه های مویین و تثبیت کشت آن ها معرفی نمود. در تحقیقات بسیاری اثر محیط کشت بر رشد ریشه های مویین را مورد بررسی قرار داده اند. عوامل تغذیه ای ممکن است بر تعداد و طول انشعابات ریشه تأثیرگذار باشند (Hilton et al. 1990). رشد سلول گیاهی و تولید متابولیت های ثانویه در سلول های کشت شده وابسته به غلظت و تعادل مواد غذایی موجود در محیط کشت می باشد (Wu, 2007).



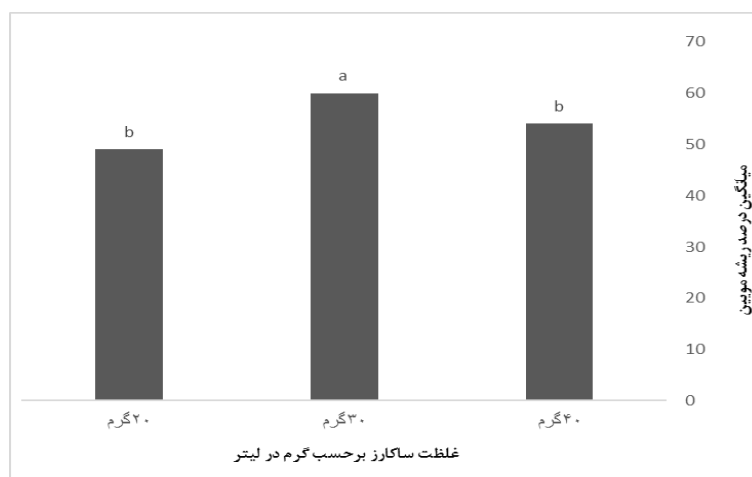
شکل ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه گیاهی در مدت زمان ظهور ریشه های موپین گیاه ماریتیغال

Fig 4. Mean comparison for the interaction of bacterial strain and explant type on the time needed for hairy roots emergence of *S. marianum*



شکل ۵- مقایسه میانگین اثرات نوع محیط کشت بر تشکیل ریشه های موپین گیاه ماریتیغال

Fig 5. Mean comparison for the effects of growing media type on the formation of hairy roots in *S. marianum* in vitro culture



شکل ۶- مقایسه میانگین غلظت های مختلف ساکارز بر درصد القای ریشه های موپین گیاه ماریتیغال

Fig 5. Mean comparison for the diverse sucrose concentration effects on hairy root formation of *S. marianum*

کشت بیشتر اوقات میزان رشد ریشه ها و تجمع متابولیت های ثانویه را افزایش می دهد (Bensaddek et al. 2008).

فاکتورهای مختلفی بر تولید ریشه های موپین موثر می باشند. بهینه سازی ترکیبات محیط کشت جهت دستیابی به بالاترین میزان رشد و تولید متابولیت های ثانویه در ریشه های موپین ضروری می باشد. نوع سویه باکتری، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه، منبع کربن و غلظت بر القا و تولید ریشه های موپین مؤثر هستند. نتایج حاصل از آزمایش القاء ریشه های موپین با سویه های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز و سنین مختلف و نوع ریزنمونه نشان داد که سویه 15834 و ریز نمونه ها با سن ۵ روزه هیپوکوتیل بهترین سویه و ریز نمونه جهت القاء ریشه های موپین در گیاه مارتیغال بود. روش غوطه وری کارایی بیشتری در القاء ریشه های موپین این گیاه داشت. بیشترین درصد تشکیل ریشه های موپین مارتیغال در محیط کشت MS با ساکارز ۳۰ گرم در لیتر مشاهده شد و با افزایش ساکارز درصد تشکیل ریشه ها کاهش یافت. پتانسیل بالای سیستم ریشه های موپین برای تولید متابولیتها شاخص مهمی است تا در آینده نزدیک محققان زیست فناوری از ریشه های موپین به عنوان ابزاری قدرتمند برای دستیابی به منابع نهفته گیاهی استفاده نمایند.

منابع

- Akbarian R, Hasanloo T, Khosroshahli M. 2011. Evaluation in production *Trigonella foenum-graecum* hairy root cultures of two Iranian masses. *Plants Omics Journal* 4(7), 408- 412.
- Alfermann AW, Petersen M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture Journal* 43(2), 199-205.
- Bensaddek L, Villarreal ML, Fliniaux MA. 2008. Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electronic Journal of Integrative Bioscience* 3(1), 2-9.
- Bertani G. 1952. Studies on lysogenesis I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*1. *Journal of Bacteriology* 62(3), 293.
- Choi HJ, Widholm JM, Tanaka N, Nakanishi Y, Murooka Y. 1998. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch). *Plant Science* 138(1), 53-65.
- Dhakulkar S, Ganapathi TR, Bhargava S, Bapat VA. 2004. Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and

سیاری از اجزای محیط کشت از عوامل مهم در رشد و تولید متابولیت های ثانویه می باشند. قندها علاوه بر منبع کربن، به عنوان ترکیبات ایجاد سیگنال در تولید متابولیت های ثانویه در کشت ریشه های موپین عمل می کنند (Gritothe et al. 2002). بهینه سازی ترکیبات محیط کشت، سبب افزایش میزان رشد ریشه های موپین و تجمع متابولیت های ثانویه می گردد. این تغییرات شامل تغییر در منابع قند، نیتروژن و فسفر می باشد (Bensaddek et al. 2008). گلوکز و ساکارز منابع ترجیحی برای کشت بافت هستند. مطالعات نشان می دهند که ساکارز کربوهیدرات منتخب در تعداد زیادی از گیاهان بوده و به عنوان منبع کربن و انرژی به کار می رود (murashing and Skoog, 1962). ساکارز منبع مهم کربن جهت کشت سلول گیاهی و بیوسنتز متابولیت های ثانویه می باشد (Shinde et al. 2010). کاهش رشد ریشه ها در غلظت های بالای ساکارز احتمالاً ناشی از تنش اسمزی می باشد (Nguyen et al. 1992). غلظت های بالای ساکارز به شدت سبب کاهش رشد ریشه های موپین گونه های مختلف گیاه *Psoralea* گردید (Nguyen et al. 1992). به طور کلی سرعت رشد ریشه های موپین عموماً زیاد می باشد، اما برخی عوامل نیز قادر به ایجاد تغییر در میزان رشد ریشه های موپین هستند، بهینه سازی ترکیبات محیط

production of verbascoside in hairy roots. *Plant science* 169(5), 812-818.

- Ercan AG, TAŞKIN KM, 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(6), 373-378.
- Gritothe H, Abascal K, Yarnell E, Ladas E. 2002. "Clinical Applications of *Silybum marianum* in Oncology". *Integrative Cancer Therapies* 6(2), 158-65.
- Hasanloo T, Rezazadeh SH, Rehnema H. 2008. Hairy roots source for the production of valuable medicinal compounds. *Journal of Medicinal Plants* 29, 34- 42.
- Hilton MG, Rhodes MJC. 1990. Factors affecting the growth and hyocyanine production during batch culture of transformed roots of *Datura stramonium*. *Planta Med* 59, 340-344.
- Kabirnotaj S, zolalla J, Nematzadeh Gh, Shokri E. 1391. Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Agriculture Biotechnology Journal* 4, 61-75.

- Kai G, Yang S, Zhang Y, Luo X, Fu X, Zhang A, Xiao J. 2012.** Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. *Molecular Biology Reports* 39(2), 1721-1729.
- Kebimetaj MJ, Sarasan V, Roberts A V, Yokoya K, Wentworth J, Sieber, VK. 2012.** Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theoretical and Applied Genetics* 107(7), 1195-1200.
- Khan S, Qureshi MI, Alam T, Abidin, MZ. 2007.** Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology* 6(3), 175.
- Mehrotra S, Kumar Kukreja A, Singh Khanuja SP, Nath Mishra B. 2008.** Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(2), 69-75.
- Pawar PK, Maheshwari VL. 2003.** *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family Solanaceae. *Indian Journal of Biotechnology* 3, 414- 417.
- Potrykus I. 1990.** Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 125-134.
- Rahnama H, Hasanloo T, Shams MR, Sepehrifar R. 2008.** *Silymarin* production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Iranian Journal of Biotechnology* 6(2), 113-118.
- Sharafi A, Hashemi Sohi H, Mousavi A, Azadi P, Razavi KH, Otang Ntui V. 2013.** A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. *Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113, 1-9.
- Shen WH, Petit A, Guern J, Tempé J. 1988.** Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(10), 3417-3421.
- Shinde A, Malpathak N, Fulzele D. 2010.** Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. *Journal of Natural Medicines* 64, 346–353.
- Veena V, Taylor, C.G. 2007.** *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43(5), 383-403.
- Wu X. 2007.** Establishment and Chemical Analysis of Hairy Roots of *Eucommia ulmoides* (Doctoral dissertation, Shanghai University).

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

Hairy root induction in *Silybum marianum* L. through diverse *Agrobacterium rhizogenes* strains

Mohammadali Ali Aazami^{1*}, Elham Rahmani¹ and Mohammad Bagher Hassanpouraghdam^{1, 2}

1. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran

2. Islamic Parliament Research Center, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: aazami58@gmail.com

Abstract

Silybum marianum L. from the Asteraceae is an annual or biennial plant widely distributed in the north, west and south of Iran. The fruits are containing medicinal flavonoids such as silymarin. This study was conducted to optimize the growing conditions for hairy roots and to assay the diverse factors affecting the induction and growth of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes*. The seeds were cultured on MS medium and were kept in the growth chamber. After germination and seedling growth; explants from the leaves, hypocotyl and roots were taken behind growth and after 5, 10 and 15 days. The explants were inoculated (treated) with two (R1000 and 15834) *Agrobacterium rhizogenes* strains. Furthermore, the effects of two inoculation methods (floating and injection) were assayed on the hairy roots emergence percentage. MS and 1/2 MS growing media were compared regarding the establishment of the hairy roots in the liquid medium. In a separate experiment, the effect of sucrose amount (20, 30 and 40 gL⁻¹) were evaluated on hairy root induction and the roots emergence percentage was recorded. To verify the transgenic identity, PCR test with specific marker genes was carried out. The results revealed that 15834 strain was the strain of choice in 5 days old hypocotyl explants and produced more hairy roots than other strain. The best rooting percentage belonged to leaf explants at 15 days-old, treated with R1000. Floating was the method of choice for inoculation. 30 gL⁻¹ sucrose was the best treatment for the root induction as well.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Explant, Hairy root, *Silybum marianum* L., Secondary Metabolite