مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۹
صفحه ٦٦-۵۵

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

القای ریشه های مویین در گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) از طریق سویه های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز

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

محمدعلی اعظمی*[۱] ، الهام رحمانی [۱]و محمدباقر حسن پور اقدم[۱،۲]

Mohammadali Ali Aazami[1*], Elham Rahmani[1] 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

خارمریم یا ماریتیغال 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 می‌روید. میوه این گیاه حاوی ترکیبی فلاونوئیدی به‌نام سیلی‌مارین است. این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه‌های مویین و بررسی تأثیر عوامل مختلف (سن و نوع ریزنمونه و نوع سویه باکتری) بر القا و رشد ریشه‌های مویین توسط آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه ماریتیغال صورت گرفت. برای این منظور، ابتدا بذور گیاه ماریتیغال بر روی محیط MS جامد کشت شده و در اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌هایی از برگ، هیپوکوتیل و ریشه در سنین مختلف ۵، ۱۰ و ۱۵ روزه انتخاب شدند و با سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (R1000 و ATCC15834) تلقیح شدند. روش تلقیح و بهینه‌سازی محیط کشت و تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر ایجاد ریشه‌های مویین بررسی گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ریز نمونه هیپوکوتیل ۵ روزه تلقیح یافته با سویه ATCC15834 درصد ریشه‌های مویین بیشتری تولید کرد، کم‌ترین درصد القای ریشه مویین مربوط به سویه R1000 و ریزنمونه برگ ۱۵ روزه مشاهده شد. بین دو روش تلقیح غوطه‌وری و تزریق از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار وجود داشته و بیش‌ترین درصد القای ریشه‌های مویین مربوط به روش غوطه‌وری بود. تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز نشان داد که بیشترین درصد القایی ریشه‌های مویین مربوط به محیط حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم رایزوژنز،
ریزنمونه،
ریشه‌مویین،
ماریتیغال،
متابولیت‌های ثانویه

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 سلول‌ها فعال می‌شوند. این مشاهده علاقه به راهبرد استفاده از کشت ریشه‌های مویین که دارای سرعت رشد سریع می‌باشند را افزایش داده است. ریشه‌های مویین تولید شده توسط آگروباکتریوم رایزوژنز، 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 مویین که اندام‌های تمایزیافته 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 رایزوژنز جهت تولید متابولیت‌های ثانویه بهینه شده‌اند (Hasanloo *et al.* 2008). توانایی آگروباکتریوم رایزوژنز در القای ریشه مویین، در تعدادی از گیاهان منجر به استفاده از ریشه‌های مویین به‌عنوان منبعی برای تولید فرآورده‌های دارویی گردیده است (Subroto *et al.* 1996; Cai *et al.* 1995). کلون‌های ریشه‌های مویین 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 مویین، توان بالای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در مقایسه با گیاهان مادری است. کشت ریشه‌های مویین 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 مویین *Scutellaria baicalensis* به جای مشتقات گلوکز فلاونوئیدهای گلوکوزیدی را تولید نمودند (Nishikawa *et al.* 1997). ثبات ژنتیکی نیز از دیگر ویژگی‌های ریشه‌های مویین بوده که در آزمایشات مختلف به اثبات رسیده است (Bagnhalian *et al.* 2000).

فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی بر رشد و تولید ریشه‌های مویین تأثیر گذارند. بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت جهت دست‌یابی به بالاترین میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین 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 مویین 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 مویین بکار گرفته شده‌اند(Wu, 2007).

مواد کربنی نیز به شدت در رشد و تولید متابولیت‌ها در ریشه‌های مویین 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 رایزوژنز 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 مویین در گیاه ماریتیغال بوسیله تزریق و غوطه‌وری ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، برگ و کوتیلدون با آگروباکتریوم رایزوژنز (AR15834) القا شد (Rahnama et al. 2008). در مطاله دیگر

فقط از برگهای کوتیلدونی برای القا ریشه‌های مویین با آگروباکتریوم رایزوژنز (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 رایزوژنز (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 بذر 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه و سپس در الکل ۷۰ درصد بمدت 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 کاملا تصادفی با سه فاکتور شامل سویه باکتری (R1000 و 15834)، سن ریزنمونه جهت تلقیح (۱۰،۵ و ۱۵روز) 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 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 (1/2 MS و 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.

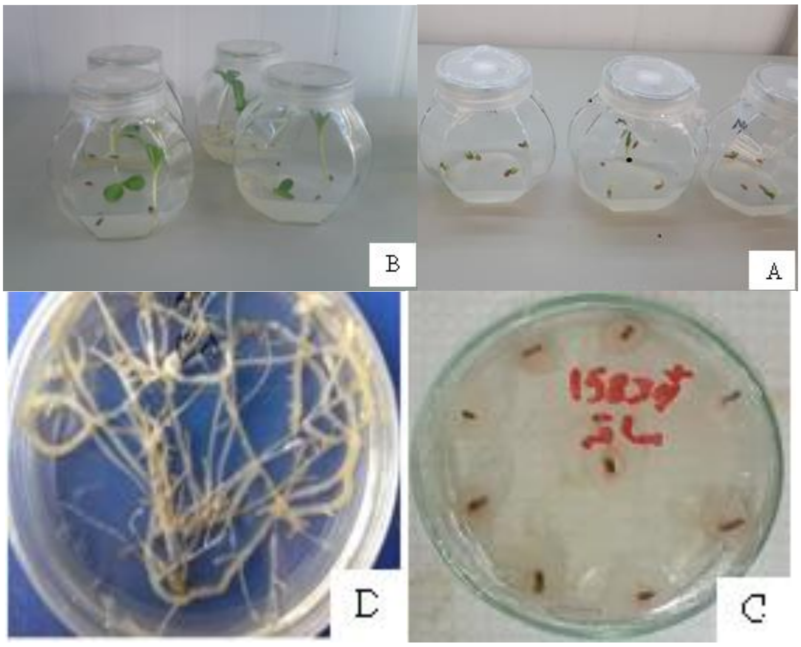
کشت باکتری، تلقیح و هم کشتی ریزنمونه: دو سویه آگروباکتریوم رایزوژنز (R1000 و 15834) جهت القای ریشه‌های مویین مورد استفاده قرار گرفت. جهت کشت باکتری‌ها از محیط کشت LB (Bertani, 1952) جامد و جهت تهیه سوسپانسیون باکتری به منظور تلقیح از محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک ریفامپسین با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر استفاده گردید. تک کلون هر یک از سویه‌های باکتری در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که هر یک حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت LB مایع و حاوی ۱۵۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بودند، کشت گردید. رشد باکتری در داخل شیکر انکباتور 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 (OD_{600}) 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

ریزنمونه‌ها به وسیله اسکالپل و به صورت تصادفی، زخم‌هایی ایجاد گردید. سوسپانسیون باکتری آماده شده برای هر سویه نیز به درون پتری‌دیش‌های جداگانه ریخته شده و ریزنمونه‌ها درون سوسپانسیون هر یک از سویه‌های باکتری به طور جداگانه و به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت MS جامد (محیط هم‌کشتی ریزنمونه با باکتری) منتقل شدند. نمونه شاهد نیز بدون تلقیح با باکتری در محیط کشت قرار گرفت. محیط‌های کشت به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط تاریکی و به مدت ٤٨ ساعت منتقل شدند.

باکتری زدایی و بهینه سازی ظهور ریشه‌های موبین: بعد از گذشت ٤٨ ساعت جهت حذف باکتری، ریزنمونه‌ها پس از حذف رطوبت اضافی آن‌ها به وسیله کاغذ صافی استریل، به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم فاقد هورمون‌های گیاهی منتقل شدند. عمل واکشت ریزنمونه‌ها و انتقال به محیط MS جدید حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم تا چهار نوبت و تا حذف کامل باکتری ادامه یافت. پس از ظهور ریشه‌های موبین در ریزنمونه‌ها، جهت افزایش رشد ریشه‌ها در محیط جامد، هر یک از ریزنمونه‌های ریشه‌دار، به صورت تکی به محیط کشت MS جامد عاری از هورمون‌های گیاهی و حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. عمل واکشت ریزنمونه‌ها در محیط جدید هر دو هفته یک‌بار صورت گرفت و در هر بار واکشت، اندکی از بافت ریزنمونه حذف گردید و در نهایت با حذف کامل ریزنمونه، ریشه‌های موبین بدون نیاز به بافت ریزنمونه، به راحتی و با سرعت زیاد در محیط کشت تکثیر یافتند. حداقل ٤ بار عمل واکشت ریشه‌های موبین در محیط کشت MS جامد انجام گردید و هر بار غلظت آنتی بیوتیک سفوتاکسیم به نصف کاهش یافت (شکل ۱).

اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موبین: جهت اثبات تراریخت بودن ریشه‌های موبین تولید شده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی هر یک از ریشه‌های موبین با استفاده از روش CTAB (Khan *et al.* 2007) استخراج گردیدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور تأیید حضور ژن *rol*B آگروباکتریوم رایزوژنز در ریشه‌های موبین انجام گردید. توالی آغازگرها به صورت زیر بود. 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3' (آغازگر مستقیم)- و 5'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3' (آغازگر معکوس). به منظور تکثیر قطعات 780bp ژن *rol*B مورد استفاده قرار گرفتند. جهت آماده‌سازی 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، $MgCl_2$ (٤ میلی‌مول 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 واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در حرارت ٩٤ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل: مرحله واسرشت‌سازی در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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، ٦ میکرولیتر از DNA استخراج شده در داخل ۳ میکرولیتر آب دیونیزه حل شده و حدود ۳ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی متیلن‌بلو به آن اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل، درون چاهک‌های ایجاد شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید اضافه و به مدت ٤٥ دقیقه با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در دستگاه الکتروفورز افقی قرار گرفت. ژل آگارز توسط نور UV با استفاده از دستگاه ژل‌داک (KiAGEN, Model: CCD-5) آشکارسازی گردید.



شکل ۱- الف) کشت درون شیشه‌ای بذور گیاه ماریتیغال ب) گیاه‌چه‌های رشد یافته در محیط MS پ- ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه ماریتیغال تلقیح شده با باکتری سویه ATCC15834 جهت باکتری زدایی پس از گذشت ٤٨ ساعت ج- ظهور ریشه‌های مویین از ریزنمونه‌های 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 مویین

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فاکتورهای مورد استفاده شامل سویه‌های باکتری، سن ریزنمونه، نوع ریزنمونه و همچنین اثر متقابل دوگانه بین سویه‌های مختلف باکتری و سن ریزنمونه، سویه‌های مختلف باکتری و نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه و نوع ریزنمونه و همچنین اثرمتقابل سه گانه بین سویه باکتری، سن ریزنمونه و نوع ریزنمونه در سطح یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۱).

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه (شکل ۲) نشان داد که از بین سویه‌های 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 ریشه‌های مویین بیشتری (٦٧ درصد) حاصل نمودند، در حالی که کم‌ترین درصد ریشه‌زایی (٢٣ درصد) مربوط به سویه R1000 در ریزنمونه برگ ۱۵ روزه مشاهده شد. در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۱۱ روز، در ریزنمونه‌های برگی ۱۳ روز و ریشه ۱۵ روز بعد از هم‌کشتی و شستشو با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و انتقال به محیط فاقد هورمون ریشه‌های مویین ظاهر شدند. در این بررسی مشاهده شد که زمان تشکیل ریشه مویین بر اساس تعداد روز بعد از تلقیح با سویه‌های متفاوت آگروباکتریوم رایزوژنز در هر سه نوع ریزنمونه متفاوت بود، به طوری‌که در ریزنمونه هیپوکوتیل تلقیح شده با سویه 15834 نسبت به سویه R1000 مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین بعد از هم‌کشتی ریزنمونه‌ها کمتر بود. لذا کارایی تراریختی در سویه 15834 بهتر از سویه R1000 بود. ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگی تلقیح یافته با هر دو سویه تقریباً به‌طور همزمان دیده شد. ریزنمونه ریشه نسبت به سایر ریزنمونه‌ها در مدت زمان طولانی‌تری ریشه‌های مویین را ظاهر نمود. احتمالاً این امر به دلیل ماهیت سلول‌های ریشه به واکنش پذیری و تهییج دیرتر و کمتر این اندام‌ها بخاطر بیوسنتز و محتوای بالای اکسین می‌باشد که مانع ریشه‌زایی و نمو متعاقب ریشه‌ها می‌شود (Shen *et al*. 1988).

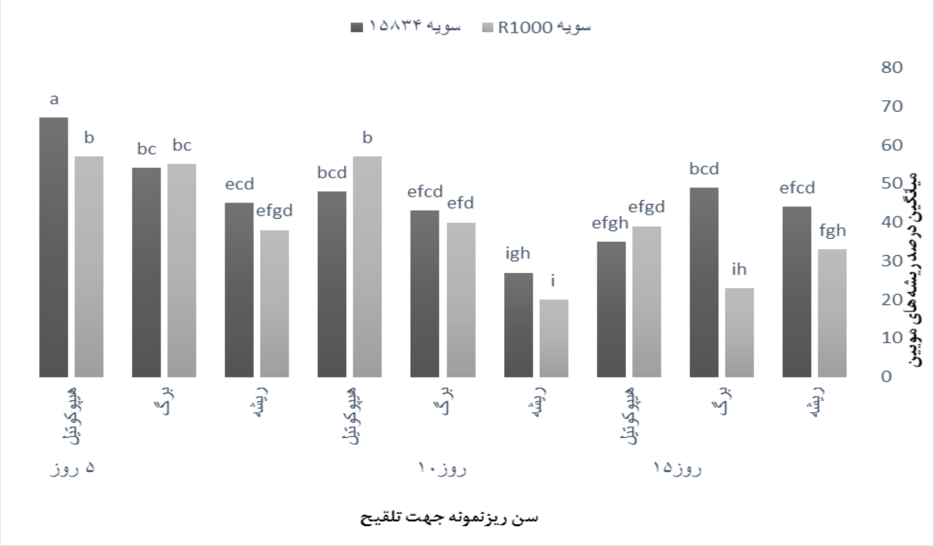
جدول۱- تجزیه واریانس تأثیر نوع سویه ، سن و نوع ریزنمونه بر القاء ریشه‌های مویین گیاه ماریتیغال

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 مویین
سویه باکتری(A)	۱	۰/۰۳٤**
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)	٤	۰/۰٤۲**
سویه باکتری* سن ریزنمونه* نوع ریزنمونه (A*B * C)	٤	۰/۰۱۵**
خطا آزمایش	۳٦	/۰۰٤۱
ضریب تغییرات		۱٤/۷۱

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 ، نوع و سن ریزنمونه بر القاء ریشه‌های مویین گیاه ماریتیغال

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

ریشه‌های طبیعی داری الگوی رشدی ژئوتروپیک (زمین‌گرا) بوده، درحالی‌که ریشه‌های مویین پاسخ رشدی پلاژیوتروپیک (عدم زمین‌گرایی) را نشان می‌دهند که احتمالا رشد پلاژیوتروپیک به دلیل فقدان پلاستیدهای مختلف از جمله آمیلوپلاست در دانه‌های نشاسته‌ای ریشه‌های مویین می‌باشد. ویژگی بارز دیگر، وجود انشعابات بیشتر و کوتاه‌تر ریشه‌های مویین می‌باشد که دلیل آن احتمالا بیوسنتز بیشتر اکسین در ریشه‌های مویین (تراریخت) است چرا که افزایش غلظت اکسین در ریشه‌ها باعث ایجاد ریشه‌های فرعی بیشتر و کوتاه شدن طول ریشه‌ها می‌شود. اکسین در مرحله شروع ریشه‌زایی نقش به سزایی دارد (Shen *et al.* 1988).

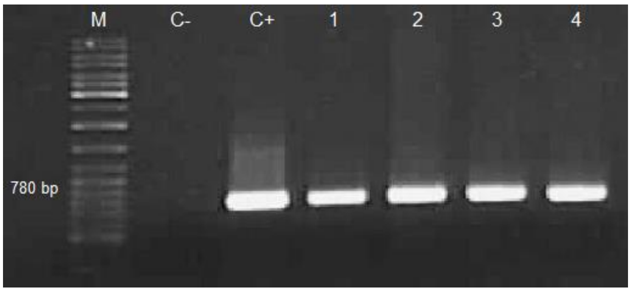
در این پژوهش، درصد بالای تراریختی در ریزنمونه‌های ۵ روزه‌ای می‌تواند ناشی از حساسیت بالای این ریزنمونه به باکتری در مقایسه با سایر ریزنمونه‌های به‌کار رفته باشد که این حساسیت به وضعیت فیزیولوژیکی بافت‌ها نیز بستگی دارد (Pawar *et al.* 2003). ریزنمونه‌های جوان‌تر بیشترین پاسخ تراریختی را نشان دادند. با توجه به روند تولید ریشه مویین در شکل ۲ احتمالا سن ریزنمونه گیاهی تأثیر مهمی بر تولید ریشه‌های مویین داشت

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

پاسخ محل زخم، فاکتور مهمی برای فرآیند انتقال ژن می‌باشد چرا که زخم، باعث تولید ترکیبات متعددی در نزدیکی محل زخم می‌شوند که در باززایی و فرآیند انتقال ژن مؤثراند. در فرآیند ایجاد پاسخ زخم، ریزنمونه‌های مختلف به زخم، پاسخ‌های متفاوتی را نشان می‌دهند (Potrykus *et al.* 1990). سلول‌های ریزنمونه، در بیوسنتز DNA و توانایی تقسیم سلولی به علت بلوغ فیزیولوژیکی متفاوت سلول‌ها، تفاوت دارند. مشخص است که توانایی سویه‌های مختلف در انتقال ژن به سلول گیاهی متفاوت است. از بین سویه‌های بررسی شده در این آزمایش سویه 15834بیشترین کارایی در تشکیل ریشه‌های مویین را داشت. این تفاوت در بیماریزایی به پلاسمیدهای قرار گرفته در سویه‌های باکتری مرتبط است (Nin *et al.* 1992). هم‌چنین دلیل دیگر این تفاوت‌ها بیان متفاوت ژن‌های T-DNA ریشه‌های تراریخته، تعداد کپی‌های متعدد T-DNA وارد شده و اثرات محل ورود T-DNA به ژنوم گیاه می‌باشد (Akramian *et al.* 2011).

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین با واکنش PCR

نتایج الکتروفوز ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ریشه‌های تراریخت احتمالی، حضور قطعه bp ۷۸۰ مربوط به ژن *rolB* را در ریشه‌های حاصل در ریزنمونه‌های مختلف توسط سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز به کار رفته، نشان داد (شکل۳) همچنین در DNA حاصل از ریشه‌های 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 *rol*B در ریشه‌های مویین بود (شکل ۳).



شکل ۳- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تأیید حضور ژن *rolB* در ریشه‌های تراریخت گیاه ماریتیغال. M: DNA نشانگر 10000 bp (cinna Gen)، C^-: ریشه‌های شاهد غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی، C^+ : آگروباکتریوم سویه 15834 به عنوان کنترل مثبت، لاین۱ تا ٤: ریشه‌های مویین القا شده در ریز نمونه‌های هیپوکوتیل گیاه ماریتیغال توسط آگروباکتریوم رایزوژنز

Fig 3. PCR for the verification of *rolB* gene presence on the transformed hary roots of *S.marianum.* M: 1kb DNA ladder (Cinna gene), C^-:non-transformed roots 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 inoculaion with *Agrobacterium rhizogenes*

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس تأثیر نوع سویه و نوع ریزنمونه بر مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین در گیاه ماریتیغال

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
سویه باکتری	۱	۵/۵*
ریزنمونه	۲	۳٤۵/۷*
سویه * ریزنمونه	۲	۵/۰۵*
خطاآزمایش	۱۲	۰/۸۸
ضریب تغییرات		٤/۷٤

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

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

مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین

با توجه به اینکه ریزنمونه های ۵ روزه در آزمایشات قبلی نتایج بهتری نشان داده است در آزمایشات مربوط به مدت زمان ظهور فقط ریزنمونه‌های 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 ریشه‌های مویین در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول۲).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که سریع‌ترین زمان ظهور ریشه‌های مویین توسط سویه 15834 و ریزنمونه هیپوکوتیل در مدت زمان ۱۰ روز و دیرترین زمان ظهور، در ریزنمونه‌های برگ

تلقیح یافته توسط سویه R1000 و در مدت زمان ۲٦ روزه مشاهده شد (شکل٤). پاسخ‌های مختلف در زمان القای ریشه مویین، به سویه آگروباکتریوم رایزوژنز و واکنش متقابل آن با گیاه میزبان و نوع بافت بستگی دارد (Veena and Taylor, 2007).

بررسی اثر روش‌های تلقیح (تزریق و غوطه‌وری) بر ریزنمونه هیپوکوتیل ۵ روزه توسط سویه 15834 آگروباکتریوم

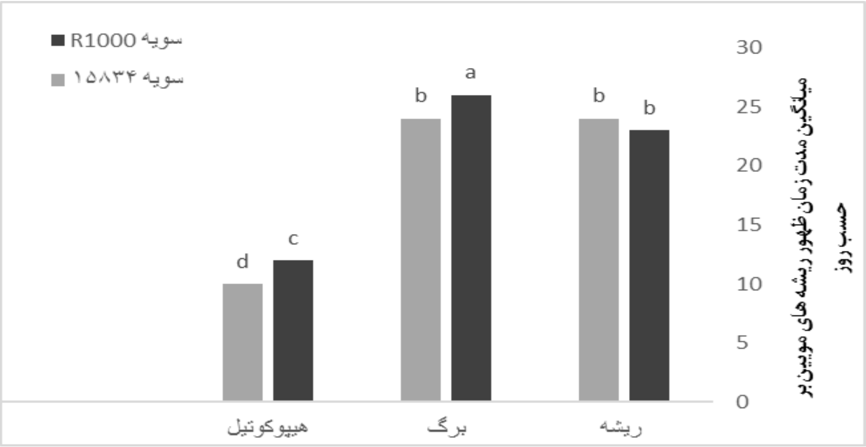
مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بین دو روش تلقیح غوطه‌وری و تزریق از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار وجود داشته و بیشترین درصد (٦۲ درصد) تلقیح مربوط به روش غوطه‌وری بوده در حالی‌که روش تزریق فقط کارایی ۵۲ درصدی داشته است که این برتری روش غوطه وری تایید کننده بررسی های Rahnama و همکاران (2008) در گیاه ماریتیغال است. احتمالا دلیل کارایی بهتر روش غوطه وری زخم نمودن ریزنمونه و تماس بیشتر سلول‌های 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 داده‌ها نشان داد که اثر نوع محیط کشت (MS،1/2MS) بر درصد ریشه‌زایی معنی دار بود. نمودار مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که محیط MS بیشترین درصد ریشه مویین (٦۰ 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 ریشه‌های مویین القاء شده در گیاه *Cichorium intybus* گزارش شده است (Kabirnotaj et al. 1391). طبق نتایج به‌دست آمده می‌توان محیط کشت MS را به منظور القای ریشه‌های مویین و تثبیت کشت آن‌ها معرفی نمود. در تحقیقات بسیاری اثر محیط کشت بر رشد ریشه‌های مویین را مورد بررسی قرار داده‌اند. عوامل تغذیه‌ای ممکن است بر تعداد و طول انشعابات ریشه تأثیرگذار باشند (Hilton *et al.* 1990). رشد سلول گیاهی و تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های کشت شده وابسته به غلظت و تعادل مواد غذایی موجود در محیط کشت می‌باشد (Wu, 2007). اجزای محیط کشت، گاهی اوقات می‌تواند نرخ رشد ریشه‌های مویین و میزان متابولیت‌های تجمع یافته را تغییر دهند. محیط‌های کشت MS، 1/2MS و B5، سه نوع محیط کشت استاندارد هستند که به‌صورت گسترده جهت کشت ریشه‌های مویین بسیاری از گیاهان استفاده می‌گردند. استنباط شده است که تفاوت در میزان یون‌های محیط کشت، اولین فاکتور مؤثر بر میزان رشد ریشه‌های مویین می‌باشد (Wu, 2007). در هر سه محیط MS، 1/2MS و B5، مقدار فسفر و کلسیم تقریباً مشابه است در حالی‌که مقدار نیتروژن متفاوت می‌باشد بنابراین مقدار نیتروژن می‌تواند به عنوان یک فاکتور مهم و کلیدی، رشد ریشه‌های مویین را تحت تأثیر قرار دهد (Wu, 2007). تأثیر محیط‌های کشت مختلف (MS، 1/2MS، B5، 1/2B5، WP و 1/2WP) بر القای ریشه‌های مویین در گیاه *Pueraria candollei* مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج نشان داد که، محیط 1/2 MS بیشترین وزن خشک ریشه مویین (۰/۰۳ ± ۰/۱۳ گرم) را تولید نمود و کمترین وزن خشک ریشه در محیط 1/2B5 حاصل شد (Udomsuk *et al.* 2009). ریشه‌های مویین شیرین‌بیان در محیط کشت NB در مقایسه با محیط WP، MS و B5 بهترین رشد (بیشترین وزن تر) را نشان داد (Mehrotra *et al.* 2008).

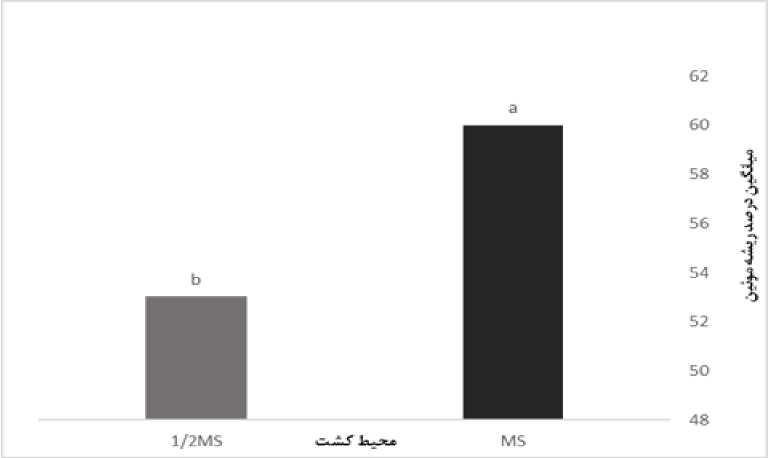
تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان رشد ریشه‌های مویین

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ٦) نشان داد که بیشترین درصد (٦۰ درصد) ریشه‌های مویین مربوط محیط حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود که این تیمار نسبت به سایر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت. نتایج این مطالعه مشابه نتایج بررسی شریفی و همکاران جهت بررسی ریشه‌های مویین بر روی گیاه *Papaver bracteatum* است (Sharafi *et al.* 2013). ریشه‌های تولید شده در غلظت ٤۰ گرم درلیتر ساکارز از نظر مورفولوژی خیلی مناسب نبودند و رنگ متمایل به قهوه‌ای داشته‌اند که احتمالا علت آن غلظت بیش از نیاز ساکارز برای جذب توسط گیاه است. به‌طور کلی غلظت‌های بالاتر ساکارز به دلیل از بین بردن توازن عناصر محیط اثرات سوئی در القای ریشه‌های مویین دارند (Gritothe et al. 2002) .



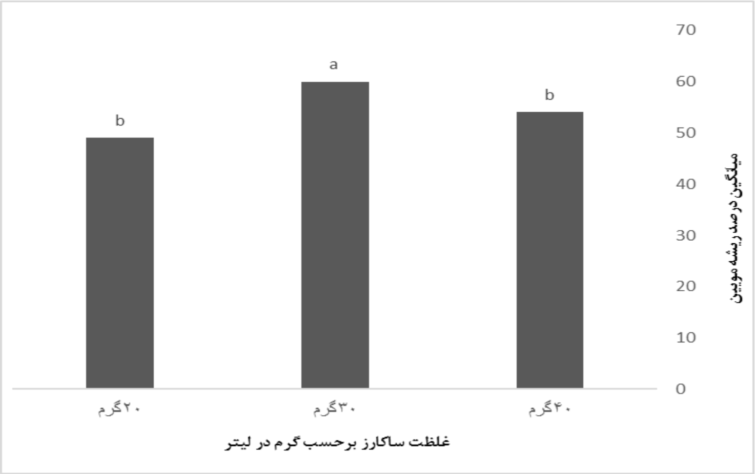
شکل ٤- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه گیاهی در مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین گیاه ماریتیغال

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



شکل ٥- مقایسه میانگین اثرات نوع محیط کشت بر تشکیل ریشه‌های مویین 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



شکل٦- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف ساکارز بر درصد القای ریشه‌های مویین گیاه ماریتیغال

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

بسیاری از اجزای محیط کشت از عوامل مهم در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. قندها علاوه بر منبع کربن، به عنوان ترکیبات ایجاد سیگنال در تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین عمل می‌کنند (Gritothe *et al.* 2002). بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت، سبب افزایش میزان رشد ریشه‌های مویین و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌گردد. این تغییرات شامل تغییر در منابع قند، نیتروژن و فسفر می‌باشد (Bensaddek *et al.* 2008). گلوکز و ساکارز منابع ترجیحی برای کشت بافت هستند. مطالعات نشان می‌دهند که ساکارز کربوهیدرات منتخب در تعداد زیادی از گیاهان بوده و به عنوان منبع کربن و انرژی به‌کار می‌رود (murashing and Skoog, 1962). ساکارز منبع مهم کربن جهت کشت سلول گیاهی و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Shinde *et al.* 2010). کاهش رشد ریشه‌ها در غلظت‌های بالای ساکارز احتمالاً ناشی از تنش اسمزی می‌باشد (Nguyen *et al.* 1992). غلظت‌های بالای ساکارز به شدت سبب کاهش رشد ریشه‌های مویین گونه‌های مختلف گیاه *Psoralea* گردید (Nguyen *et al.* 1992). به‌طور کلی سرعت رشد ریشه‌های مویین عموماً زیاد می‌باشد، اما برخی عوامل نیز قادر به ایجاد تغییر در میزان رشد ریشه‌های مویین هستند، بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت بیشتر اوقات میزان رشد ریشه‌ها و تجمع متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Bensaddek *et al.* 2008).

فاکتورهای مختلفی بر تولید ریشه‌های مویین موثر می‌باشند. بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت جهت دست‌یابی به بالاترین میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین ضروری می‌باشد. نوع سویه باکتری، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه، منبع کربن و غلظت بر القا و تولید ریشه‌های مویین مؤثر هستند. نتایج حاصل از آزمایش القاء ریشه‌های مویین با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز و سنین مختلف و نوع ریزنمونه نشان داد که سویه 15834 و ریز نمونه‌ها با سن ۵ روزه هیپوکوتیل بهترین سویه و ریز نمونه جهت القاء ریشه‌های مویین در گیاه ماریتیغال بود. روش غوطه‌وری کارایی بیشتری در القاء ریشه‌های مویین این گیاه داشت. بیشترین درصد تشکیل ریشه‌های مویین مارتیغال در محیط کشت MS با ساکارز ۳۰ گرم در لیتر مشاهده شد و با افزایش ساکارز درصد تشکیل ریشه‌ها کاهش یافت. پتانسیل بالای سیستم ریشه‌های مویین برای تولید متابولیتها شاخص مهمی است تا در آینده نزدیک محققان زیست فناوری از ریشه های مویین 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-greacum* 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 coli1*. 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 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 hyocyamine 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, Abdin, 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 onproduction 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 Rahmani[1] 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