مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال چهارم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

تأثیر نوع ریزنمونه و سویه‌ی اگروباکتریوم رایزوژنز بر القای ریشه‌های مویین در گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum– graecum* L.)

ندا تاریوردی زاده[۱]، مهدی محب‌الدینی[*۱] ، اسماعیل چمنی[۱]، اصغر عبادی[۱] و شهاب شعبانی[۱]

چکیده

ریشه‌های مویین القا شده به وسیله‌ی باکتری *Agrobacterium rhizogenes* به علت پایداری و تولید زیاد ریشه‌ها در شرایط کشت بدون هورمون و در زمان کوتاه، بافتی مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه است. شنبلیله از جمله گیاهان دارویی ارزشمند از تیره‌ی *Fabaceae* می‌باشد. برگ‌های شنبلیله حاوی کلسیم، آهن، فسفر، کاروتن، اسیدآسکوربیک، پروتئین، تیامین و ریبوفلاوین می‌باشد. همچنین این گیاه به طور گسترده‌ای به‌عنوان گیاه ضددیابت، پایین آورنده‌ی قند خون و کلسترول، ضدسرطان، ضدباکتری و چاشنی غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق، ریشه‌های مویین از طریق ریزنمونه‌ی گیاهچه‌ی کامل و کوتیلدون و هیپوکوتیل به روش تزریقی توسط *A. rhizogenes* سویه‌های A4، ATCC11325 و ATCC15834 تولید شدند. تأثیر نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه (گیاهچه‌ی کامل، هیپوکوتیل و کوتیلدون) برکارایی ریشه‌های مویین بررسی شد. ریز نمونه‌ها در محیط کشت B5 در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار کشت شده و ریشه‌های مویین بعد از گذشت دو الی سه هفته در ریزنمونه‌های تلقیح شده با باکتری ظاهر شدند. بیشترین میزان تراریختی (۹۳ درصد) و تعداد ریشه‌های مویین (۱۰/۴۳عدد ریشه) و بیشترین طول ریشه (۶/۶۴ سانتی متر) در ریزنمونه گیاهچه‌ی کامل ۱۰ روزه و سویه A4 مشاهده شد و در ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل در هر سه سویه ریشه‌های مویین مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: شنبلیله، ریشه‌های مویین، اگروباکتریوم رایزوژنز، متابولیت‌های ثانویه

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی. * نویسنده مسئول، ایمیل: mohebodini@uma.ac.ir

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین منابع دارویی می‌باشند که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند. ویژگی دارویی برخی از گیاهان به علت وجود ترکیبات متنوعی است که متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند (Chaudhuri et al., 2005; Wu et al., 2007). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید آن‌ها لازم است، بنابراین تولید متابولیت‌های دارویی با استفاده از گیاهان وحشی اقتصادی نبوده و به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه آن‌ها بهتر است که از فنون کشت سلول و بافت گیاهی به طور بهینه استفاده شود (Ionkova., 2007). بررسی‌ها نشان داده است که میزان متابولیت‌های ثانویه‌ی موجود در گیاهان کشت بافت شده خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه طبیعی است و حتی سلول‌های گیاهان کشت بافت شده، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود.

اگروباکتریوم رایزوژنز یک باکتری خاکزی است که موجب تولید ریشه مویین در محل زخم می‌شود. انتقال ناحیه T-DNA موجود در پلازمید Ri از این باکتری به سلول‌های گیاهی موجب القای ریشه‌های نابجا با انشعابات فراوان و کرک مانند موسوم به ریشه‌های مویین می‌شود. طی سال‌های اخیر کشت ریشه‌های مویین به منظور تولید متابولیت‌های با ارزش در تعدادی از گونه‌های گیاهان دارویی در مقیاس تجاری صورت گرفته است (Yang et al., 2011). استفاده از *A. rhizogenes* و کشت ریشه‌های مویین به علت رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گستره‌ای از ترکیبات شیمیایی مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید (Giri and Narasu., 2000). رویکرد روزافزون استفاده از گیاهان دارویی و فرآورده‌های حاصل از آن نقش این گیاهان را در چرخه‌ی اقتصادی جهانی پررنگ‌تر کرده، به‌طوری که مصرف رو به افزایش آن‌ها تنها به کشورهای در حال توسعه محدود نبوده بلکه در کشورهای پیشرفته نیز توسعه‌ی فراوانی یافته‌اند (Anwar et al., 2005). یکی از این گونه‌های دارویی با ارزش، گیاه شنبلیله است که بومی ایران بوده و از گذشته به‌عنوان گیاه دارویی مصرف شده است.گیاه شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum– graecum* L. از تیره‌ی بقولات بوده و گیاهی علفی، یکساله و ارتفاع آن تا ۵۰ سانتی‌متر می‌باشد که به‌عنوان یک گیاه دارویی، زراعی، مرتعی، آرایشی و بهداشتی حائز اهمیت فراوان است (نجف‌پور نوایی، ۱۳۷۳). دانه‌ها به رنگ زرد نارنجی و گاهی قهوه‌ای رنگ است. شنبلیله به‌عنوان یک سبزی، گیاه دارویی و ادویه‌ی معطر خوراکی، مهم بوده که برگ‌های تازه، خشک شده و همچنین بذرهای آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. برگ‌های شنبلیله حاوی کلسیم، آهن، فسفر، کاروتن، اسیدآسکوربیک، پروتئین، تیامین و ریبوفلاوین می‌باشد. همچنین این گیاه به طورگسترده‌ای به‌عنوان گیاه ضد دیابت، پایین آورنده‌ی قندخون و کلسترول، ضدسرطان، ضد باکتری و چاشنی غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sadeghzadeh-Ahari et al., 2009) بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که از فنون کشت بافت برای ریشه‌زایی بهینه‌ی این گیاه استفاده به عمل آید. به همین دلیل در این پژوهش، با استفاده از سویه‌های A4، ATCC11325 و ATCC15834 اگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه‌زایی گیاه دارویی شنبلیله در شرایط درون شیشه‌ای مورد آزمون قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریز نمونه

بذر گیاه شنبلیله از شرکت آرتان بذر تبریز تهیه شد. به منظور استریل نمودن، بذور در زیر هود لامینار به مدت ۱ دقیقه دراتانول ۷۰ درصد وسپس به مدت ۱۰ دقیقه درهیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی شدند و پس ازسه بار آبکشی با آب مقطر استریل درمحیط کشت MS (Murashige and Skoog., 1962) جامد کشت و در

دمای ^{o}c ۲±۲۵ و درشرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. از گیاهچه‌ی کامل، هیپوکوتیل و کوتیلدون ۱۰ روزه به عنوان ریزنمونه برای تلقیح با باکتری استفاده گردید.

آماده‌سازی سویه باکتری و تلیقح ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم رایزوژنز

به منظور القای ریشه‌های مویین، از سویه‌های A4، ATCC11325 و ATCC15834 اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شد. سویه‌ی باکتری در محیط کشت LB (Bertani, 1952) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک ریفامپسین کشت و بر روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد قرار داده و بعد ازگذشت ۲۴ ساعت برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. برای آلوده کردن گیاهچه‌ها و ریز نمونه‌ها از روش تزریق با سوزن سرنگ انسولین استفاده شد. در مرحله‌ی بعد ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت B5 انتقال داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. نمونه شاهد نیز بدون تلقیح با باکتری در محیط کشت قرار گرفت. این پژوهش بصورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. سه روز بعد از هم کشتی، ریز نمونه‌ها به منظور حذف باکتری به محیط B5 جامد حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند وکشت ها در فواصل دو هفته‌ای تا حذف کامل باکتری واکشت شدند. ریشه‌های مویین بعد از گذشت دو الی سه هفته ظاهر شدند. پس از ظهور چهار هفته از ظهور ریشه‌ها، درصد القای ریشه‌های مویین، تعداد و طول ریشه‌ها محاسبه گردید.

آنالیز مولکولی ریشه‌ها از طریق واکنش زنجیرهای پلی مراز (PCR)

استخراج DNA ژنومی ریشه های مویین و طبیعی به روش CTAB انجام شد. به منظور آنالیز مولکولی تایید حضور قطعه T–DNA پلاسمید Ti در ریشه‌ها از پرایمر های ژن *rol*B، با توالی آغازگرها به صورت زیر بود: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3' (آغازگر مستقیم) و 5'-TAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3' (آغازگر معکوس). برنامه‌ی PCR شامل یک چرخه واسرشتگی اولیه در دمای ^{o}c ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ^{o}c ۹۴ با مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ^{o}c ۵۸ به مدت ۱ دقیقه، بسط در دمای ^{o}c ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ^{o}c ۷۲ به مدت ۱ دقیقه بود. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه ژل داک مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

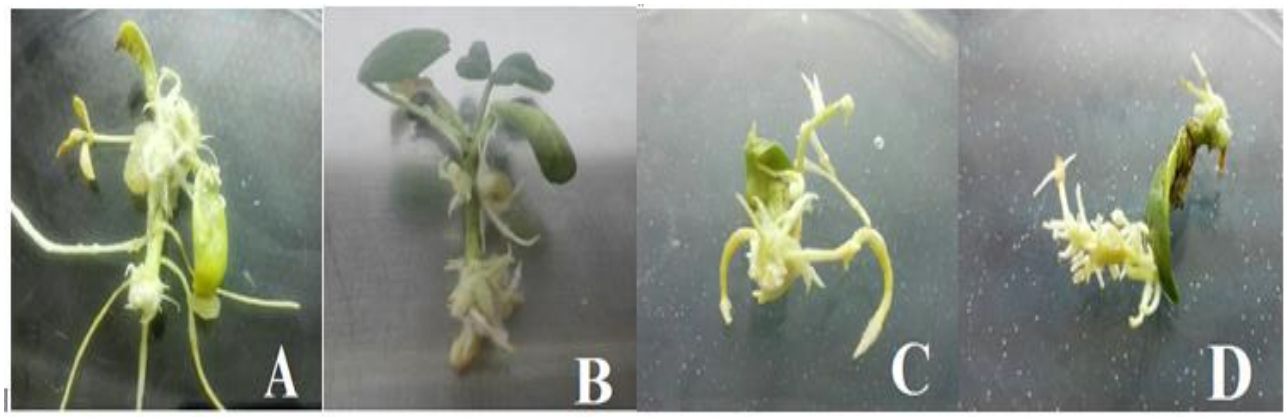
تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16 و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام گردید.

نتایج و بحث

تأثیر نوع ریزنمونه و نوع سویه باکتری در میزان القای ریشه‌های مویین

در این پژوهش قدرت بیماری‌زایی اگروباکتریوم رایزوژنز توسط کارایی ترانسفورماسیون و درصد تشکیل ریشه‌های مویین، تعداد و طول ریشه در ریزنمونه‌های گیاهچه‌ی کامل، هیپوکوتیل و کوتیلدون تعیین گردید. نتایج نشان داد از بین سویه‌های مورد مطالعه سویه‌های A4 ، 15834 و 11325 در ریزنمونه گیاهچه‌ی کامل و سویه‌های 11325 و 15834 در ریزنمونه‌ی کوتیلدون موفق به القای ریشه مویین شدند (شکل ۱). محل ظهور ریشه‌ها، محل‌های زخم ایجاد شده بر روی ریزنمونه‌ها بود اینجا محلی است که باکتری می‌تواند با سلول گیاهی ارتباط ایجاد کرده و DNA خود را به دورن ژنوم میزبان ملحق کند. در این بررسی مشاهده شد که کارایی ترانسفرماسیون در انواع ریزنمونه و سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز متفاوت می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش بین

سویه‌های مختلف باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و انواع ریزنمونه‌های گیاهچه‌ی کامل، هیپوکوتیل و کوتیلدون بر درصد تشکیل ریشه‌ی مویین در سطح ۱% معنی‌دار بود. همچنین در میانگین تعداد و طول ریشه، اثر متقابل نوع سویه و نوع ریزنمونه و اثر اصلی نوع ریزنمونه در سطح ۱% معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که سویه A4 در ریزنمونه گیاهچه‌ی کامل، بالاترین درصد تشکیل ریشه مویین (۹۳%) را دارد و اختلاف معنی‌داری با ترکیب تیماری سویه A4 و ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون (۰%) نشان داد. همچنین در اثر تلقیح با سویه‌های 11325 و 15834 به ترتیب ۸۱% و ۶۸% ریشه مویین در ریزنمونه گیاهچه‌ی کامل تولید شد. کمترین میزان درصد القای ریشه مویین از ترکیب تیماری سویه A4 و ریزنمونه کوتیلدون بدست آمد، هیچکدام از سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز قادر به القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل نبودند. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که سویه‌ی A4 در ریزنمونه گیاهچه‌ی کامل بیشترین تعداد و طول ریشه را نشان داد. بین ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون تلقیح شده با سویه‌های 15834 و 11325 در میانگین تعداد و طول ریشه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲).

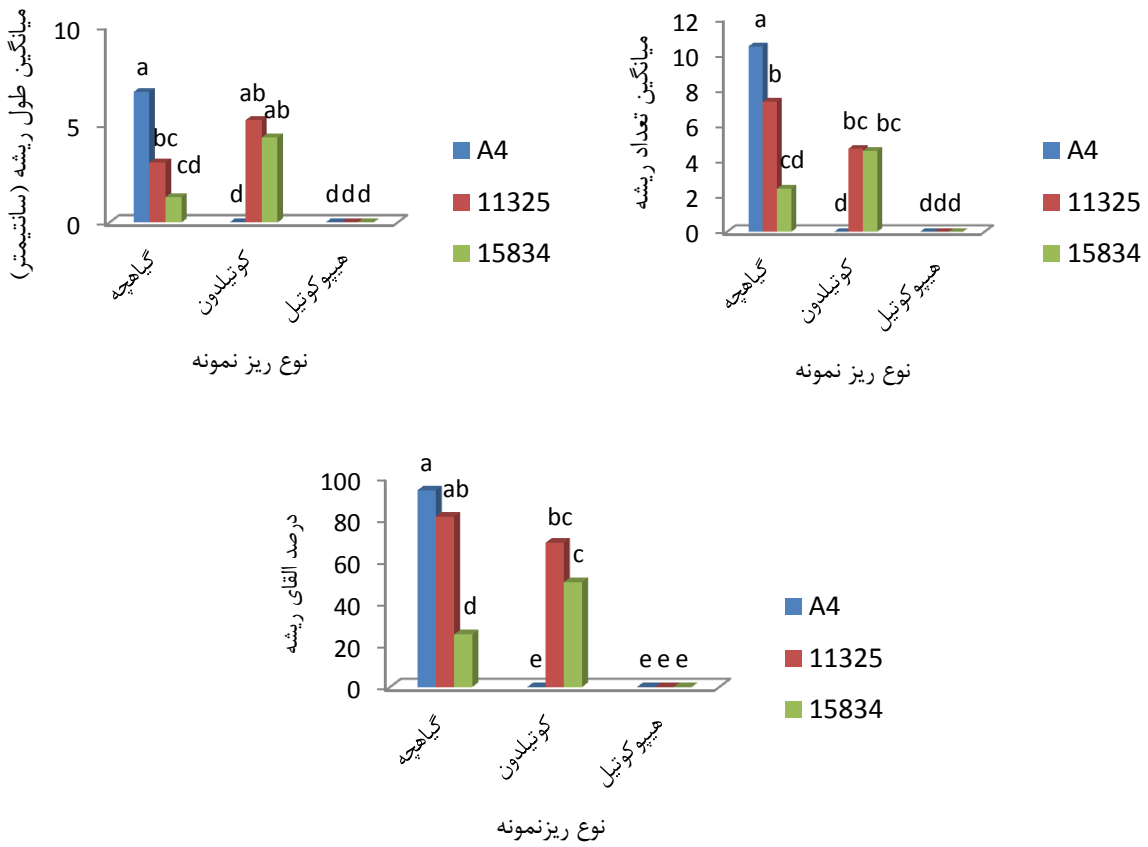


شکل ۱- القای ریشه‌ی مویین به واسطه‌ی تلقیح با *A. rhizogenes* در گیاه شنبلیله. A و B: ریشه‌های مویین القا شده در ریزنمونه‌ی گیاهچه‌ی کامل C و D: ریشه‌های مویین القاشده در کوتیلدون

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه گیاهی و سطوح مختلف سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز بر ریشه‌های مویین

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد القای ریشه	میانگین تعداد ریشه	میانگین طول ریشه
نوع ریز نمونه	۲	۱۳۴۸۹/۵۸**	۱۳۶/۱۶۱**	۴۷/۵۸۳**
نوع سویه	۲	۲۰۳۱/۲۵۰**	۸/۷۲۴^{ns}	۲/۳۹۴^{ns}
نوع ریز نمونه × نوع سویه	۴	۴۱۹۲/۷۰۸**	۴۲/۴۱۷**	۲۹/۲۷۱**

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



شکل۲ - تأثیر نوع ریزنمونه بر درصد القای ریشه‌های مویین، میانگین تعداد ریشه و طول ریشه‌های مویین

در سال‌های اخیر، کشت ریشه مویین به‌عنوان یک راهکار مناسب برای توسعه گیاهان دارویی انتخاب شده است. از جمله مزایای کشت ریشه‌های مویین، افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه برای اهداف صنعتی و همچنین پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی آن‌ها می‌باشد. به طور کلی عوامل متعددی می‌تواند بر روی درصد تراریختگی ریشه‌های مویین توسط اگروباکتریوم رایزوژنز در گونه‌های مختلف گیاهان نقش مؤثری داشته باشند. روش‌های انتقال ژن به گیاه، نوع و سن ریز نمونه عوامل مهم و تأثیرگذار در افزایش تراریختگی ریشه‌های مویین و افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه آن‌ها می‌باشند. در این تحقیق ریزنمونه‌های مختلف پاسخ متفاوتی از نظر القاء ریشه مویین نشان دادند. این تفاوت در بیماری‌زایی، به پلاسمیدهای قرار گرفته در سویه‌های باکتری مرتبط است. 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. بهترین ریزنمونه‌ها به منظور القاء ریشه مویین با فراوانی بالا در گیاه شنبلیله، به ترتیب گیاهچه‌کامل و گوتیلدون بود. البته وابستگی القای ریشه مویین به نوع ریزنمونه در گونه‌های مختلف گیاهی نیز گزارش شده است. در این تحقیق از ریزنمونه‌های گیاهچه‌ی کامل، کوتیلدون و هیپوکوتیل ۱۰ روزه همچنین از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شده است. علی‌رغم اهمیت این گیاه با ارزش، تحقیقات اندکی در زمینه‌ی القا و کشت ریشه‌های مویین در این گیاه انجام گرفته است. از جمله نتایج تحقیقی Akbarian و همکاران (۲۰۱۱) میزان تولید تریگونلین در

ریشه‌های مویین تولید شده در دو توده‌ی شنبلیله‌ی ایرانی (زنجان و بورازجان) با استفاده از سه سویه‌ی A. rhizogenes (15834، 11325و A4) و به دو روش غوطه‌ورسازی و تزریقی را بررسی کردند که پس از سه هفته القای ریشه مویین صورت گرفته است. و نتایج بدست آمده نشان داد که بالاترین میزان القا و رشد ریشه به ترتیب در دو سویه‌ی 15834 و 11325 بدست آمد. همچنین، Merkli و همکاران (۱۹۹۷) تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر افزایش تولید دیوسژنین در ریشه‌های مویین شنبلیله را بررسی کردند. به این منظور، ریزنمونه‌ی ساقه‌ی گیاهچه‌ی دو هفته‌ای را با سویه‌یA4 *A. rhizogene*s تلقیح کردند. گزارش کردند در ریزنمونه‌ی ساقه‌ی دو هفته‌ای القای ریشه صورت گرفته است. به عنوان نتیجه‌گیری کلی در این مطالعه می‌توان گفت که ریزنمونه‌های گیاهچه‌ی کامل و کوتیلدون استفاده شده موفق به تولید ریشه‌های مویین شدند. سویه‌های A4، 15834 و 11325 اگروباکتریوم رایزوژنز قادر به القای ریشه مویین در گیاه شنبلیله بوده و سویه A4 و ریزنمونه‌ی گیاهچه‌ی کامل بهترین کارایی را در القای ریشه‌های مویین داشته‌اند. در حالی که در ریزنمونه هیپوکوتیل آغشته به باکتری، پس از گذشت یک ماه القای ریشه‌های مویین مشاهده نشد و ریزنمونه‌های تهیه شده قهوه‌ای و سیاه شدند.

منابع

مظفریان، و. (۱۳۷۵). فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. تهران، انتشارات فرهنگ معاصر، ص ۷۵۶.

نجف‌پور نوایی، م. (۱۳۷۳). مطالبی پیرامون گیاه دارویی شنبلیله. چاپ اول، تهران، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ص ۱۸.

Akbarian, R., Hasanloo, T. and Khosroshahli, M. (2011). Evaluation of trigonelline production in Trigonella foenum- graecum hairy root cultures of two Iranian masses. Journal of Plant Molecular Biology & Omics, 4, 408-412.

Ahari, D.S., Kashi, A.K., Hassandokht, M.R., Amri, A. and Alizadeh, K. (2009). Assessment of drought tolerance in Iranian Fenugreek landraces. Journal of Food, Agriculture & Environment, 7 (3 & 4), 414-419.

Anwar, M., Patra, D.D., Chand, S., Alpesh, K., Naqvi, A.A. and Khanuja, S.P.S. (2005). Effect of organic manures and inorganicfertilizer on growth, herb and oil yield, nutrient accumulation, and oil quality of French Basil. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 36, 1737-1746.

Bertani, G . (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 62 (3), 293–300.

Billaud, C. and Adrian, J. (2001). Fenugreek composition, nutritional value, and physiological properties. Sciences des Aliments, 21, 3-26.

Chaudhuri, K.N., Ghosh, B., Tepfer, D. and Jha, S. (2005). Genetic transformation of Tylophora indica with Agrobacterium rhizogenes A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. Plant Cell Reports, 24, 25-35.

Giri, A. and Narasu, M.L. (2000). Transgenic hairy roots: Recent trends and application. Advances in Biology, 18, 1-22.

Ionkova, L. (2007). Biotechnological approaches for the production of Lignan. Pharmacognosy Review, 1, 57-68.

Merkli, A., Christer, P. and Kapetanidis, I. (1997). Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. Plant Cell Reports, 16, 632-636.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473- 497.

Niknam, V., Razavi, N., Ebrahimzadeh, H. and Sharifizadeh, B. (2006). Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedling and calli of two *Trigonella* species. Biologia Plantarum, 50 (4), 591-596.

Sadeghzadeh Ahari, D., Kashi, A.K., Hassandokht, M.R., Amri, A. and Alizadeh, K. (2009). Assessment of drought tolerance in Iranian fenugreek landraces. Journal of Food,

Agriculture and Environment, 7, 414-419.

Wu, J.Y., Ng, J., Shi, M. and Wu, S.J. (2007). Enhanced secondary metabolite (tanshinone) production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots in a novel root-bacteria coculture process. Applied Microbiology and Biotechnology, 77,543-550.

Yang, C.H., Chen, M., Zeng, L., Zhang, L., Liu, X., Lan, X., Tang, K. and Liao, Z.H. (2011). Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by over expressing pmt and h6h genes. Plant Omics Journal, 4(1), 29-33.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology
Vol 4, No 1, Spring & Summer 2018

Effect of explant type and strain of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy roots induction in Fenugreek (*Trigonella foenum– graecum* L.)

Neda Tariverdizadeh[1], Mehdi Mohebodini [1*], Esmaeil Chamani[1], Asghar Ebadi[1] and Shahab Shabani[1]

Abstract

Induced hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* are a suitable tissue for the production of secondary metabolites, due to the stability and high production of roots in hormonal-free conditions. *Trigonella foenum – graecum* L. is one of the medical plants in the family Fabaceae. Many useful components in *Trigonella foenum* L. leafs are Calcium, Iron, Phosphorus, Carotene, Ascorbic acid, Protein, Thiamine, Riboflavin. Also, this plant widely used as anti-diabetes, blood glucose, cholesterol- lowering, Anti-cancer, Anti-bacterial, and food stuffing. In this study, hairy roots were induced using *A. rhizogenes* strains A4, ATCC11325 and ATCC15834 by injection method in complete seedling, cotyledon and hypocotyl explants. The effect of strain type and explant type, were investigated on the effectiveness of hairy roots. The explants were cultured in B5 medium with 4 replications. Hairy roots appeared in bacterial inoculation after 2 to 3 weeks. The highest amount of transgenic (93%), hairy roots number (10.43 number) and the maximum root length (6.64 cm) were observed in complete seedling explant of 10 days and A4 strain. In the hypocotyl explants, the hairy roots were not observed.

Keywords: Fenugreek, Hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, Secondary Metabolites

[1] Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili. *Corresponding author, Email: mohebodini@uma.ac.ir