Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 2, Summer 2021 (515-523)
DOI: 10.22059/ijhs.2020.302100.1799

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۲، تابستان ۱۴۰۰ (ص ۵۲۳-۵۱۵)

مقاله پژوهشی:

تولید تریگونلین در کشت سلولی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) تحت تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی

بهجت‌السادات عقیلی[۱]، پریسا عبداللهی[۲*] و منصور امیدی[۳]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۰)

چکیده

تریگونلین از متابولیت‌های ثانویه با ارزش گیاه شنبلیله است. استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی یکی از روش‌های پیشنهادی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای است. به منظور بررسی امکان تولید تریگونلین به کمک کشت سلولی گیاه شنبلیله آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طراحی شد. جهت بررسی قابلیت کالوس‌زایی، ریز نمونه‌های برگ، ساقه و ریشه گیاه شنبلیله در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP کشت شدند. ریزنمونه‌های مختلف شنبلیله القای کالوس انجام شد. بیشترین اندازه طول کالوس در تیمار 2,4-D (2mg/l) با اندازه ۳۱۵ میلی‌متر به‌دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. بیشترین وزن تر و وزن خشک کالوس در ریزنمونه ریشه تحت تأثیر تیمار 2,4-D (2mg/l) با وزن تر ۱/۵ گرم و وزن خشک ۰/۰۸ گرم اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشته و دارای بیشترین مقدار وزن تر و خشک کالوس بود. در تیمار با BAP بیشترین اندازه کالوس در ریزنمونه ساقه تحت تأثیر تیمار BAP (1mg/l) با اندازه ۳۲۰ میلی‌متر به‌دست آمد. بیشترین مقدار وزن تر و خشک کالوس تحت تیمار BAP (1mg/l) به‌ترتیب برابر با ۱/۵ و ۰/۰۷ گرم به‌دست آمد. سه الیسیتور سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و عصاره مخمر با غلظت‌های مختلف جهت تولید تریگونلین در کشت سوسپانسیون شنبلیله استفاده شدند که الیستور سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیشترین مقدار تریگونلین در یک گرم ماده خشک را تولید کرد.

واژه‌های کلیدی: سالیسیلیک اسید، کالوس، متابولیت ثانویه، متیل جاسمونات.

Trigonelline production in cell culture of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) treated by biotic and abiotic elicitors

Behjat alsadat aghili, Parisa Abdollahi[2*] and Mansour Omidi[3]
1, 2. M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran
(Received: May 3, 2020 - Accepted: May 30, 2020)

ABSTRACT

Trigonelline is one of the valuable secondary metabolites of fenugreek plant. Plant cell suspension culture is a recommended method for *in vitro* production of secondary metabolites. To study the possibility of Trigonelline production in fenugreek cell suspension culture, factorial experiment based on CRD was designed. In this research different explants such as leaf, stem and root were used on MS medium including four different concentration of 2,4-D and BAP plant growth regulators to study callus induction ability in fenugreek plant. The results showed that largest size of calluses belonged to the root explant under 2,4-D(2mg/l) with 315 mm and stem explant on MS including 1 mg/l BAP with 320 mm. Also, the highest fresh and dry weight of callus belonged to root explant in MS including 2 mg / l 2,4-D with 1. 5 and 0.08g and stem explant in concentration of 1 mg / l BAP with 1.5 g and 0.07g. The data registered for callus dry weight showed the same results. Three different elicitors methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract were used to increase the *in vitro* production of Trigonelline using cell suspension culture obtained from Fenugreek calluses. The highest amounts of Trigonelline was obtained from 100 µM salicylic acid.

Keywords: Callus, Methyl jasmonate, Salicylic acid, Secondary metabolite.

* Corresponding author E-mail: abdollahi@srbiau.ac.ir

مقدمه

گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) گیاهی علفی و یکساله متعلق به تیره بقولات است. یکی از گیاهان دارویی بوده که در طب سنتی ایران و ملل مختلف سابقه دیرینه داشته و خواص درمانی بسیاری برای آن ذکر شده است . این گیاه در آسیا، اوکراین و همچنین از هندوستان تا چین گسترش دارد. جنس *Trigonella* شامل گیاهان یکساله و چند ساله هستند (Acharya *et al*., 2008). بذور این گیاه منبع تولید تجاری مهمی از متابولیت‌های با ارزشی نظیر تریگونلین (Trigonelline) و دیوسژنین (Diosgenin) است و در بسیاری از لگوم‌ها تریگونلین به‌عنوان متابولیت ثانویه از Necotinamide Adenine Dinucleotide تولید می‌شود (Minorsky, 2002).

فرآورده‌های حاصل از متابولیسم ثانویه گیاهی ترکیبات با ارزشی هستند که در صنایع مختلف ازجمله دارو سازی کاربرد دارند. گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که پراکنش محدودی در سلسله گیاهان دارند و میزان آن‌ها اغلب کم (کمتر از یک درصد وزن خشک) است. این ترکیبات معمولا دارای وزن مولکولی پایینی (کمتر از ۱۵۰ کیلودالتون) هستند و تاکنون بیش از صد هزار متابولیت ثانویه شناسایی شده‌اند (Oksman-Caldentey &Inze, 2004). متابولیت‌های ثانویه منحصر به گونه یا حتی نژاد و اغلب در طی یک دوره رشد و نموی خاص در گیاه تولید می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه دارای عملکردهای اکولوژیکی مهم در گیاهان هستند و همچنین در گیاهان دارویی این متابولیت‌ها بعنوان ترکیبات مفید و جهت مصارف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Wink, 2010). تولید این ترکیبات همواره تحت تأثیر عوامل مختلف چون سطح پایین تولید، غیر یکنواختی کیفیت و تامین مواد اولیه مواجه می‌شود. تولید گیاهان دارای ترکیبات ثانویه به شکل زراعی به دلیل شرایط اقلیمی محدود است و ایجاد صنایع پایدار تر برای تولید این مواد ضروری به نظر می رشد (Omidi & Abdollahi, 2015).

کشت سلول گیاهی یک منبع مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش می‌باشد. یکی از مزیت‌های روش کشت سلول مستقل بودن از تغییرات جغرافیایی و عوامل محیطی و در عین حال با سرعت بالای رشد می‌باشد. (Kartal *et al*., 2006). محققین با استفاده از این روش توانسته اند شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت‌ها و نیز مکانیسم تنظیمی آن بدست آورند و تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در گیاهان را افزایش دهند. راهکارهای مختلفی به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که شامل استفاده از الیسیتورها، افزودن پیش سازها، بهینه سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت می‌باشد (Omidi & Abdollahi, 2015). استفاده از الیسیتورها یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. الیسیتورها مواد شیمیایی یا عوامل زیستی مختلفی هستند که می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوالکسین را القا کنند (Zhao *et al*., 2005). الیسیتور به مولکول‌هایی با منشأ زیستی یا غیرزیستی اطلاق می‌شود که با تحریک سیگنال‌های سلولی، و برهمکنش مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی یا سیتوپلاسمی و الیسیتور موجب شناسایی آن‌ها می‌شوند. در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلول‌های گیاهی بیان ژن‌های مرتبط در مسیر را تحریک می‌کنند و موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یا کشت سلولی آن‌ها می‌شوند (Zhao *et al*., 2003).

این پژوهش به‌منظور شناسایی بهترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جهت القای کالوس و تهیه سوسپانسیون سلولی گیاه شنبلیله و همچنین بررسی اثر الیسیتورهای مختلف بر افزایش تولید تریگونلین در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه شنبلیله ایرانی (شماره ثبتی TF-925) از بانک بذر پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با تهیه شد. به منظور ضد عفونی سطحی بذرها، بذرها با مایع ظرفشویی و آب چند بار شستشو داده شد. به دنبال آن ابتدا با اتانول ۷۰درصد به مدت ۱ دقیقه و سپس با آب مقطر استریل ۴ الی ۵ بار شستشو داده شدند. در مرحله بعد بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در معرض

هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند. نهایتاً بذرها با آب مقطر شستشو داده شده و روی کاغذ صافی استریل شده قرار گرفته و در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) بدون هورمون کشت داده شدند. ۷ روز بعد از کشت نشانه‌های سبز شدن ظاهر شد و دو هفته بعد از رشد، گیاهچه‌ها برای تهیه ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. در این آزمایش از ۳ ریز نمونه شامل برگ، ساقه و ریشه استفاده شد. محیط‌های کشت مربوط کالوس‌زایی شامل محیط کشت MS و تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D در چهار سطح (0,1,2.4 mg/l) و (0, 0.1,0.2,1 mg/l) BAP تهیه شدند. ریزنمونه‌های مختلف در محیط‌های کشت القای کالوس و در شرایط تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. دو واکشت با فاصله چهار هفته انجام شد و صفات اندازه وزن تر و خشک کالوس اندازه‌گیری و یادداشت برداری شد. پس از ثبت وزن کالوس‌های تازه به منظور، کالوس‌های مورد نظر با ورق آلومینیومی طوری که تبادل هوایی وجود داشته باشد بسته‌بندی شده و درون آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ قرار داده شدند.

جهت تهیه محیط کشت سوسپانسیون از محیط کشت MS مایع حاوی مقادیر متفاوت تنظیم‌کنندهای رشد استفاده شد. با توجه به نتایج القای کالوس، محیط کشت‌هایی که بهترین کالوس را از نظر اندازه و وزن کالوس تولید کردند انتخاب شدند و محیط کشت‌های مایع با ترکیبات مشابه و بدون آگار تهیه شدند. پس از تهیه محیط‌های کشت سوسپانسیون در حجم ۲۵ میلی‌لیتر کالوس‌های مورد نظر در شرایط کاملاً استریل زیر هود لامینار با اسکالپل به قطعات ۰/۵ سانتی‌متری برش خورده و سلول ها حتی الامکان از هم جدا شده، به محیط کشت سوسپانسیون منتقل شدند و در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با ۱۱۰ دور در دقیقه قرار شده شدند تا سلول ها به طور کامل از هم جدا شده و رشد کنند. بعد از گذشت ۱۴ روز واکشت سوسپانسیون انجام شد به این ترتیب که کشت سوسپانسیون به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت تازه اضافه شد و به مدت ۱۴ روز دیگر داخل انکوباتور شیکردار و در محیط کاملاً تاریکی قرار گرفت. در پژوهش حاضر از دو الیسیتور غیرزیستی شامل اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات در سه سطح (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰μM) و یک الیسیتور زیستی عصاره مخمر در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۲ mg/l) استفاده شد. در نمونه شاهد به جای الیسیتور آب مقطر استریل اضافه شد. پس از افزودن الیسیتورها، سوسپانسیون سلولی مجددا در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و ۱۱۰ دور در دقیقه در شرایط کاملاً تاریکی قرار گرفتند. سلول ها پس از ۲۴ ساعت جمع‌آوری شدند. در دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان عصاره گیری نگه‌داری شدند. برای تهیه عصاره متانولی به آن‌ها الکل ۸۰ درصد به مقدار ۵ سی‌سی به‌عنوان حلال اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دستگاه التراسونیک قرار گرفتند. سپس مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و عصاره متانولی جدا شده دوباره با کاغذ صافی واتمن ۱ صاف گردید. بدین ترتیب عصاره متانولی از بقایای سلول جدا شد. عصاره‌های متانولی تا زمان آزمایش و تجزیه و آنالیز آن‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد. جهت بررسی اثر الیسیتورهای مختلف بر مقدار متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی شنبلیله از دستگاه HPLC استفاده شد. دستگاه HPLC مدل Unicam-200 ساخت انگلستان دارای ستون C25 و قطر داخلی ۴۵ میلی متر و قطر ذرات ۰/۲ میکرومتر از جنس استات سلولز استفاده شد. دتکتور دستگاه از نوع ماوراء بنفش در طول موج ۲۶۵ نانومتر و فاز متحرک آب با حرارت ۳۴ درجه و با سرعت 1 میلی‌لیتر بر دقیقه بود. برای رسم نمودار کالیبراسیون از سه غلظت متفاوت ماده استاندارد تریگونلین (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ ppm) استفاده شد. در بازه زمانی ۱۰ دقیقه اولین پیک استاندارد رؤیت شد. سپس عصاره‌های استخراجی به ترتیب به‌دستگاه تزریق شد و پیک‌ها با پیک استاندارد مقایسه شد. براساس زمان بازداری و سطح زیر منحنی، مقدار تریگونلین مجهول مشخص شد. هر تیمار الیستور دارای سه تکرار بود که به‌دستگاه HPLC تزریق شد.

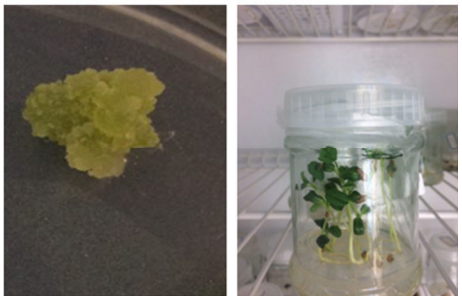
تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SAS (V 9.1) و مقایسه میانگین داده ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نمودارها نیز در محیط Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

اثر تیمارها بر صفات اندازه‌گیری شده

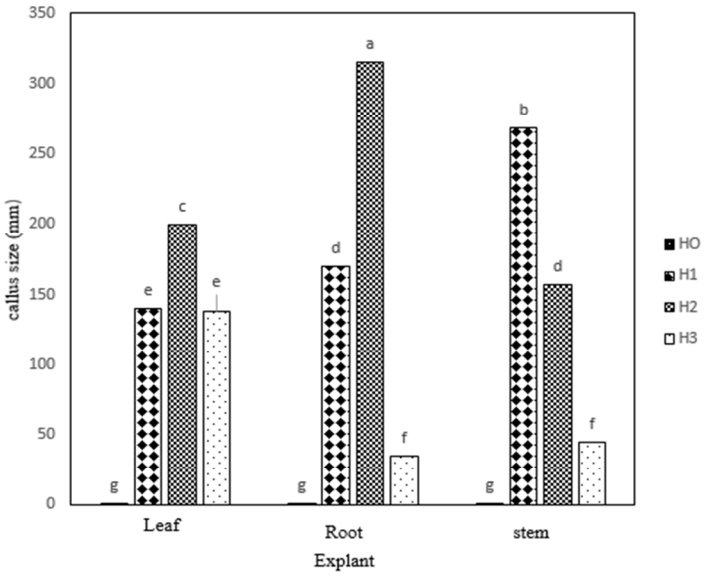
کالوس

شکل ۱ گیاهچه شنبلیله و کالوس القا شده از ریز نمونه ساقه را نشان می دهد. آنالیز تجزیه واریانس برای سه صفت اندازه، وزن تر و وزن خشک کالوس شنبلیله تحت تیمار تنظیم‌کننده رشد 2,4-D نشان داد که اثر اصلی ریزنمونه برای دو صفت اندازه کالوس و وزن خشک در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد. اثر تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D و همچنین اثر متقابل تیمار در ریزنمونه برای هر سه صفت اندازه، وزن تر و وزن خشک کالوس شنبلیله در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شدند. بیشترین اندازه طول کالوس در ریزنمونه ریشه تحت تأثیر تیمار 2,4-D (2mg/l) با اندازه ۳۱۵ میلی‌متر به‌دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشتند (شکل ۲). بیشترین وزن تر و وزن خشک کالوس نیز با نتایج مربوط به اندازه کالوس هماهنگ بوده و ریزنمونه ریشه تحت تأثیر تیمار 2,4-D (2mg/l) با وزن تر ۱/۵ گرم و وزن خشک ۰/۰۸ گرم اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشته و دارای بیشترین مقدار وزن تر و خشک کالوس بود (شکل‌های ۳ و ۴).

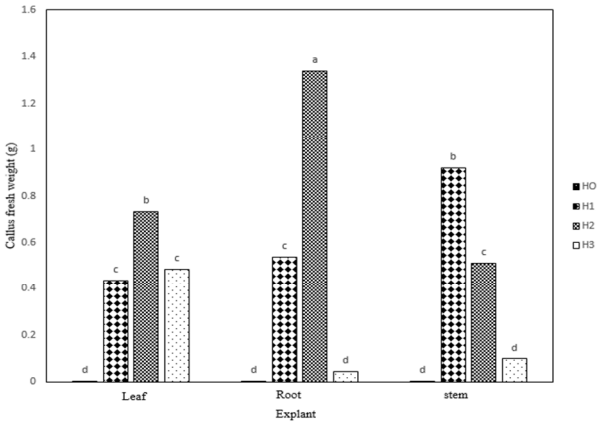


شکل ۱. گیاهچه (راست) و کالوس حاصل از ریز نمونه ریشه تحت تیمار 2,4-D (2mg/l) (چپ) در گیاه شنبلیله.
Figure 1. Plantlet (right) and callus induced by 2,4-D(2mg/l) from root explant (left) of fenugreek.

آنالیز تجزیه واریانس برای سه صفت اندازه، وزن تر و وزن خشک کالوس شنبلیله تحت تیمار تنظیم‌کننده رشد BAP نشان داد که اثر اصلی ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP و همچنین اثر متقابل آنها بر هر سه صفت اندازه، وزن تر و وزن خشک کالوس در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. در تیمار با BAP بیشترین اندازه کالوس در ریزنمونه ساقه تحت تأثیر تیمار BAP (۱mg/l) با اندازه ۳۲۰ میلی‌متر به‌دست آمد (شکل ۵). همچنین بیشترین مقدار وزن تر و خشک کالوس تحت تیمار BAP (۱mg/l) به ترتیب برابر با ۱/۵ و ۰/۰۷ گرم به‌دست آمد (شکل‌های ۶ و ۷).

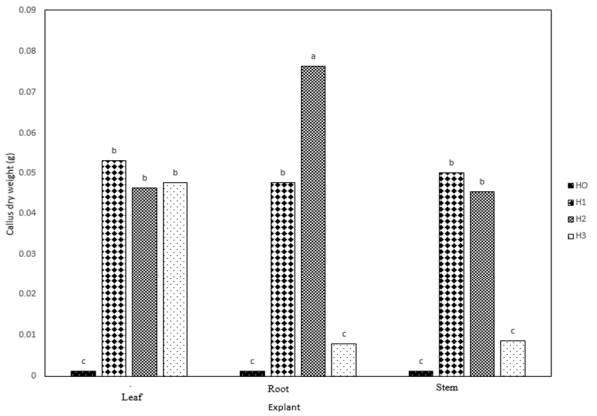


شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D و ریزنمونه برای صفت اندازه کالوس در گیاه شنبلیله، H0 (بدون هورمون)، H1 (1mg/l 2,4-D)، H2 (2mg/l 2,4-D) و H3 (4mg/l 2,4-D)
Figure 2. Mean comparison reciprocal effect of explant and 2,4-D plant growth regulator on callus size in fenugreek, H0 (Control), H1 (1mg/l 2,4-D), H2 (2mg/l 2,4-D), H3 (4m/l 2,4-D).



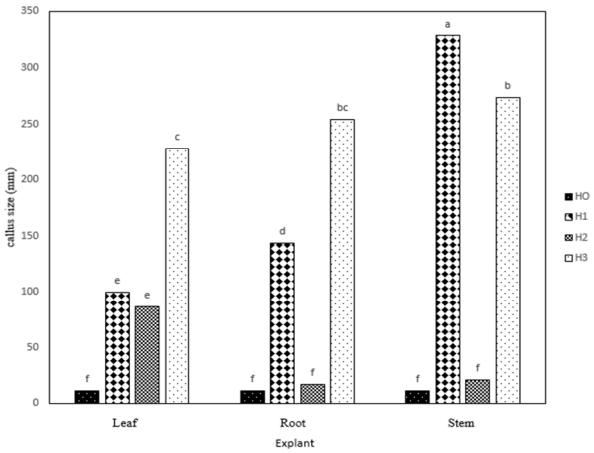
شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D و ریزنمونه برای صفت وزن تر کالوس در گیاه شنبلیله، H0 (بدون هورمون)، H1(1mg/l 2,4-D)، H2(2mg/l 2,4-D) و H3(4mg/l 2,4-D).

Figure 3. Mean comparison reciprocal effect of explant and 2,4-D plant growth regulator on callus fresh weight in fenugreek, H0 (control), H1(1mg/l 2,4-D), H2(2mg/l 2,4-D), H3(4mg/l 2,4-D).



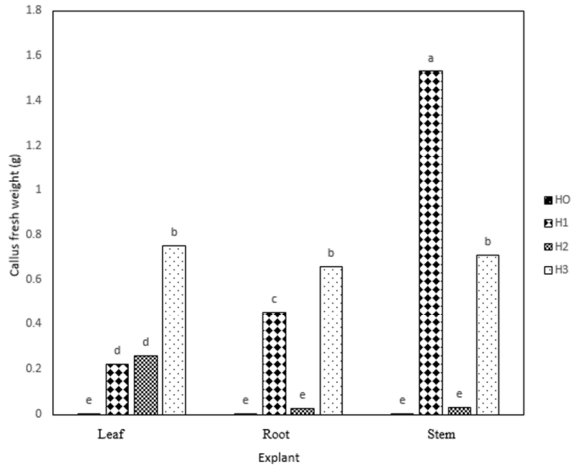
شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D و ریزنمونه برای صفت وزن خشک کالوس در گیاه شنبلیله، H0 (بدون هورمون)، H1 (1mg/l 2,4-D)، H2 (2mg/l 2,4-D) و H3 (4mg/l 2,4-D).

Figure 4. Mean comparison reciprocal effect of explant and 2,4-D plant growth regulator on callus dry weight in fenugreek, H0 (Control), H1 (1mg/l 2,4-D), H2 (2mg/l 2,4-D), H3 (4mg/l 2,4-D).



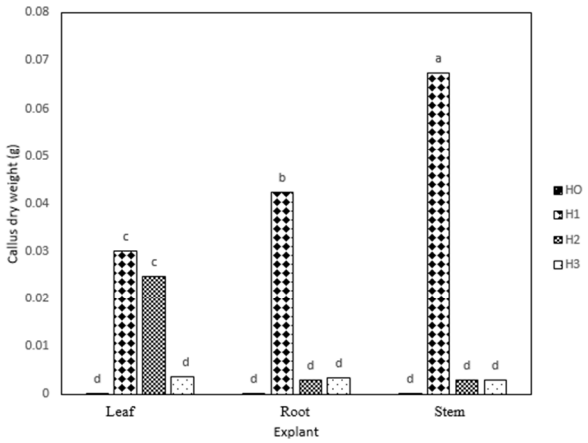
شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف BAP و ریزنمونه برای صفت اندازه کالوس در گیاه شنبلیله، H0 (بدون هورمون)، H1 (1mg/l BAP)، H2 (0.1mg/BAP) و H3 (0.2mg/l BAP).

Figure 5. Mean comparison reciprocal effect of explant and BAP plant growth regulator on callus size in fenugreek, H0 (control), H1 (1mg/l BAP)، H2 (0.1mg/BAP), H3 (0.2mg/l BAP).



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف BAP و ریزنمونه برای صفت وزن تر کالوس در گیاه شنبلیله، H0 (بدون هورمون)، H1 (1mg/l BAP)، H2 (0.1mg/BAP) و H3 (0.2mg/l BAP)

Figure 6. Mean comparison reciprocal effect of explant and BAP plant growth regulator on callus fresh weight in fenugreek, H0 (Control), H1 (1mg/l BAP) ،H2 (0.1mg/BAP) و H3 (0.2mg/l BAP).

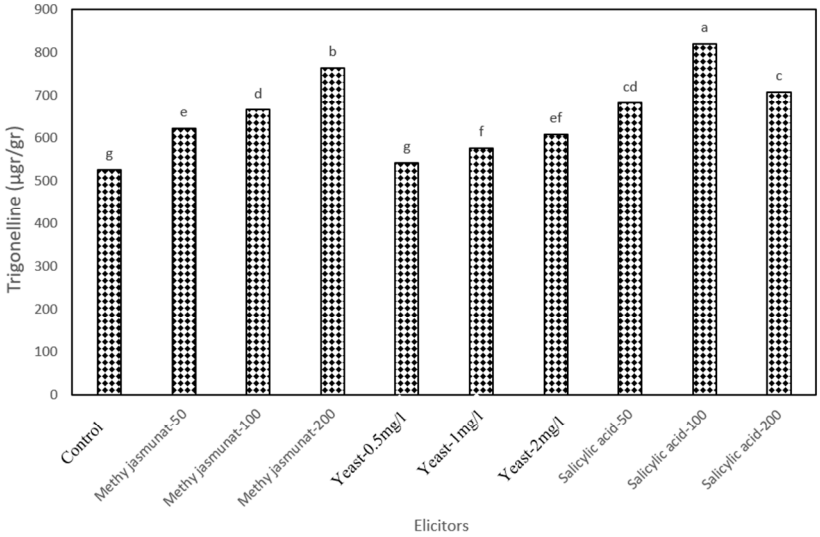


شکل ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف BAP و ریزنمونه برای صفت وزن خشک کالوس در گیاه شنبلیله، H0 (بدون هورمون)، H1(1mg/l BAP)، H2 (0.1mg/BAP) و H3 (0.2mg/l BAP).

Figure 7. Mean comparison reciprocal effect of explant and BAP plant growth regulator on callus dry weight in fenugreek, H0 (control), H1 (1mg/l BAP) ،H2 (0.1mg/BAP) و H3 (0.2mg/l BAP)

اندازه‌گیری ماده مؤثره لیمونن

میزان تریگونلین استخراج‌شده در هر گرم ماده خشک از سلول‌های گیاه شنبلیله در کشت سوسپانسیون تحت تأثیر الیستورهای زیستی و غیر زیستی در شکل۸ ارایه شده است. سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیشترین تأثیر را بر تولید تریگونلین در سوسپانسیون سلولی شنبلیله داشت . متیل جاسمونات با غلظت ۲۰۰ میکرومولار بعد از سالیسیلیک اسید توانست مقدار تریگونلین را نسبت به شاهد افزایش دهد. مقدار تریگونلین تحت تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار به ترتیب ۸۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم در یک گرم ماده خشک به‌دست آمد (شکل ۸). شنبلیله دارای دو ترکیب شیمیایی با خواص دارویی مهم است. دیوسجنین یک ترکیب ساپونین استروئیدی و تریگونلین یک ترکیب آلکالوئیدی است که دارای نقش هورمونی در گیاهان می باشد. این متابولیت از طریق متیلاسیون اسید نیکوتنیک در گیاه ساخته می شود و در بسیاری از گونه های گیاهی از جمله قهوه، شنبلیله، سویا، نخود، یونجه و غیره شناسایی شده است.



شکل ۸. میزان تریگونلین استخراجی از کشت سوسپانسیون گیاه شنبلیله تحت تأثیر تیمارهای مورد آزمایش

Figure 8. Extracted Trigonelline amount from fenugreek suspension culture under different elicitor treatments.

دیوسجنین و تریگونلین در دانه‌ها و برگ‌های شنبلیله یافت شده اند و دارای خواص ضد دیابتی و هایپوگلایسمیک است. تریگونلین یا N- متیل نیکوتینیک اسید، متابولیت ثانویه مشتق شده از نوکلئوتیدهای پیریدین است. تری گونلین ترکیب فعال فیزیولوژیکی در گیاهان است که القا کننده حرکات برگ‌ها می‌باشد و در زمان تنش در گیاه تجمع می‌یابد و به‌عنوان یک محافظ اسمزی عمل می‌کند (Mehrafarin *et al*., 2010). علاوه بر این به‌عنوان یک هورمون در کنترل چرخه سلولی عمل می‌کند. این ترکیب اولین بار از *Trigonella foenum graecum* استخراج شد و بعدها در بسیاری از گیاهان مانند قهوه، سویا، سیب زمینی، نخود فرنگی شناسایی شد (Zheng *et al*., 2004). با توجه به اهمیت دارویی این ترکیب افزایش تولید آن همچون دیگر ترکیبات دارویی با ارزش در شرایط درون‌شیشه‌ای و تأثیر ناپذیر از عوامل محیطی از دغدغه های اخیر پژوهشگران بوده است. سوسپانسیون سلولی راهکاری مناسب برای تولید تجاری متابولیت‌های ثانوی است که تحت تأثیر عوامل محیطی(اقلیم،آفت و بیماری ها) قرار نگرفته و امکان تولید ترکیبات با کیفیت در کشت سلولی در مقایسه با منابع گیاهی به کمک سوسپانسیون‌های سلولی وجود دارد. به‌طور خاص کشت سوسپانسیون سلول‌های گیاهی همزمان با افزایش سرعت رشد آن‌ها سبب افزایش انباشتگی متابولیت‌های مورد نظر در یک دوره زمانی کوتاه می‌گردد (omidi & Abdollahi, 2015).

روش‌های مختلفی به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی پیشنهاد شده اند که افزودن الیستور های با منشا زیستی و غیر زیستی از جمله روش های پر کاربرد است. الیسیتورها مولکول‌های با منبع خارجی در گیاهان هستند که از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی باعث القای تشکیل متابولیت‌های ثانوی می‌شوند. در پژوهش حاضر از سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات به‌عنوان عواملی غیر زیستی جهت تحریک تولید تریگونلین استفاده شد. سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنلی و شبه هورمونی است که در گیاهان در پاسخ به عوامل محیطی به‌عنوان مولکول سیگنال دهنده عمل کرده و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را القا کرده و باعث افزایش تولید آنها می‌شود (Habibi *et al*., 2015). گزارش های متعدی مبنی بر تأثیر مثبت سالیسیلیک اسید بر تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. اسید سالیسیلیک از طریق تأثیر بر بیان ژن‌های *EMOT* (o-متیل ترانسفراز) و *PAL* (فنیل آلانین آمونیالیاز) که کدکننده آنزیم‌های حد واسط در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه هستند در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در خانواده نعناییان مؤثر بوده

است (Joneidi *et al*. 2019; Ali *et al*. 2007). تأثیر این مولکول به‌عنوان الیسیتور بسیار به نحوه ی مصرف آن و غلظت آن بستگی دارد. در پژوهش حاضر غلظت ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک در مقایسه با دو غلظت مورد استفاده دیگر ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار بیشترین تأثیر را بر تولید تریگونلین در کشت سلولی شنبلیله داشت.

بعد از سالیسیلیک اسید متیل جاسمونات با غلظت ۲۰۰ میکرومولار توانست مقدار تریگونلین را نسبت به نمونه شاهد افزایش دهد. غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به صورت ترکیبی با دیگر الیسیتورها یا به تنهایی در گزارش‌های مختلفی به‌عنوان بهترین غلظت جهت افزایش‌ها آلکالوئیدها گزارش شده است (Dastmalchi *et al*, 2019).

شواهدی وجود دارد که جاسمونات‌ها به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی فعالیت می‌کنند و به‌عنوان یک گروه از انتقال دهنده های مهم پیام در دفاع گیاه در برابر زخم، حشره، حمله پاتوژن و غیره نقش دارند .این مولکول‌های سیگنال در برخی از مسیرهای انتقال پیام که القاکننده آنزیم‌های خاص کاتالیزکننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیب‌های دفاعی مانند پلی‌فنول‌ها، آلکالوئیدها یا پروتئین‌های مربوط به پاتوژن هستند، دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند .مشخص شده است که وقتی این مولکول‌های سیگنال به صورت خارجی به کار برده می‌شوند به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان یک سری از ژن‌های دفاعی می‌شوند (Dastmalchi *et al*., 2019). جاسمونات ها به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود معرفی شده اند .یک مسیر بیوسنتزی برای تولید هورمون گیاهی اسید جاسمونیک مسیر اکتادکانوئید (octadecanoid pathway) است که نقش مهمی در القای ژن‌های دخیل در واکنش های دفاعی و تولید پروتئین های دفاعی و متابولیت‌های ثانویه دارد. اسید جاسمونیک از آلفا لینولنیک اسید ساخته می‌شود که به کمک یک آنزیم لیپاز از غشای سلولی آزاد می‌شود. در پاسخ به زخم شدن گیاه فسفولیپاز C لینولنیک اسید برای ساخت اسیدجاسمونیک آزاد می‌کند. اسیدجاسمونیک مولکول سیگنال‌دهنده تنش است. در متابولیسم آلکالوئید، اسید جاسمونیک بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی را به وسیله فاکتور رونویسی ORCA (octadecanoid-responsive Catharanthus AP2-domain proteins) اثر می‌گذارد (Cheong & Choi, 2003).

مواردی از استفاده از عصاره مخمر به‌عنوان الیسیتور در کشت‌های سوسپانسیون گزارش شده است که در غلظت‌های کم باعث افزایش فلاونوئیدها شده اما در غلظت‌های بالاتر میزان متابولیت را کاهش داده است. یکی از اثرات شناخته‌شده این الیسیتور ایجاد استرس در گیاهان و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است (Savitha. *et al*., 2006). در این پژوهش از عصاره مخمر غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. اگر چه این الیسیتور میزان تریگونلین در کشت سلولی شنبلیله را نسبت به شاهد افزایش داد اما این مقدار در مقایسه با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات چشم‌گیر نبود.

در گزارشی میزان تریگونلین ۱۰ گونه مختلف شنبلیله مقایسه شده است که میزان تریگونلین استخراجی از *Trigonella foenum -graecum* برابر با ۰/۰۰۱۳۴ میکروگرم در گرم وزن خشک بذر به‌دست آمد. در پژوهش حاضر به کمک کشت سوسپانسیون و استفاده از الیسیتور سالیسیلیک اسید، ۸۰۰ میکروگرم تریگونلین در هر گرم ماده خشک به‌دست آمد که در مقایسه با گزارش‌های موجود میزان تریگونلین قابل‌توجه است و می‌توان کشت سوسپانسیون و الیستورهای استفاده‌شده را روشی مناسب برای تولید تریگونلین در شرایط درون‌شیشه‌ای دانست.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، بهترین ریزنمونه در پاسخ به تنظیم‌کننده رشد 2,4-D ریزنمونه ریشه گیاه شنبلیله بود که بیشترین اندازه کالوس در تیمار 2,4-D (2mg/l) با اندازه ۳۱۵ میلی‌متر به‌دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. بیشترین وزن تر و وزن خشک کالوس

در ریزنمونه ریشه تحت تأثیر تیمار 2,4-D (2mg/l) با وزن تر نزدیک به ۱/۵ گرم و وزن خشک ۰/۰۸ گرم اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشته و دارای بیشترین مقدار وزن تر و خشک کالوس بود. در تیمار با BAP بیشترین اندازه کالوس در ریزنمونه ساقه تحت تأثیر تیمار BAP (1mg/l) با اندازه ۳۲۰ میلی‌متر به‌دست آمد. بیشترین مقدار وزن تر و خشک کالوس تحت تیمار BAP (1mg/l) به ترتیب برابر با ۱/۵ و ۰/۰۷ گرم به‌دست آمد. ریز نمونه ساقه شنبلیله بهترین پاسخ به تنظیم‌کننده رشد BAP را نشان داد و بزرگترین اندازه کالوس در ریزنمونه ساقه تحت تأثیر تیمار BAP (1mg/l) با اندازه ۳۲۰ میلی‌متر به‌دست آمد. الیستورهای پیشنهادی جهت تولید تریگونلین در کشت سوسپانسیون شنبلیله سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار هستند که به ترتیب ۸۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم تریگونلین در یک گرم ماده خشک تولید کردند.

REFERENCES

1. Acharya, S.N., Thomas, J.E., & Basu, S.K. (2008). Fenugreek an alternative crop for semiarid regions of North America. *Crop Science*, 48, 841-53.
2. Ali, M.B., Hahn, E.J. & Paek, K.Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in Panax ginseng bioreactor root suspension cultures. *Molecules,* 12 (4), 607-621.
3. Cheong, J. & Choi, Y. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*. 19 (7).
4. Dastmalchi, T., Omidi, M., Azizinezhad, R., Rezazadeh, Sh. & Etminan, A. (2019). Effects of methyl jasmonate and phloroglucinol on thebaine and sanguinarine production in cell suspension culture of Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.). *Cellular and Molecular Biology*, 65(3).
5. Habibi, G., Sadeghipour, Z. & Hajiboland, R. (2015). Effect of salicylic acid on tobacco (*Nicotiana rustica*) plant under drought conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 7(25), 17-28. (In Farsi).
6. Joneidi, F. Abdollahi, P. & Omidi, M. (2019). The effect of abiotic Elicitors on expression of *EMOT* gene in Basil plant. *3rd International & 11th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran.* 1-3 Sep. Tehran, Iran.
7. Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G. & Alfermann, A.W. (2004). Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in Linum species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 441-447.
8. Mehrafarin, A., Qaderi, A., Rezazadeh, Sh. & Naghdi Badi, H. (2010). Bioengineering of important secondary metabolites and metabolic pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum -graecum*). *Journal of Medicinal Plants*, 9, 1-18. (In Farsi)
9. Minorsky P.V. (2002). Trigonelline: a diverse regulator in plants. *Plant Physiology*, 128, 7-8.
10. Oksman-Caldentey & KM, Inze D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9), 433-440.
11. Omidi, M. & Abdollahi, P. (2015). Biotechnology for large scale production of plants secondary metabolites. *Modern Genetic Journal*, 9(4), 391-402.
12. Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. & Ravishankar, G. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of Beta vulgaris in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, 41(1), 50-60.
13. Wink, M. (2010). *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. (2nd ed.). Inc. New Delhi, India. 20-30.
14. Zhang, C., Yan, Q., Cheuk, W.K. & Wu, J. (2004). Enhancement of tanshinone production in Salvia miltiorrhiza hairy root culture by Ag+ elicitation and nutrient feeding. *Planta Medica*, 70(2), 147-151.
15. Zhao J, Davis LC& Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.
16. Zhao, J. & Sakai, K. (2003). Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor-induced beta-thujaplicin biosynthesis in Cupressus lusitanica. *Cell Cultures*, 4, 647-656.