

## القای تولید کالوس شنبلیله تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی در شرایط در شیشه ای

صدیقه اسمعیل زاده بهابادی<sup>۱\*</sup>، آیت اله رضایی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران. E-mail: shirin\_eshm@yahoo.com

<sup>۲</sup>دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

### چکیده

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) گیاه دارویی با خواص ضد دیابتی، ضد سرطان و ضد میکروبی می باشد. خواص دارویی شنبلیله به دلیل وجود ترکیبات مختلف از جمله آلکالوئید تری گونلین می باشد. در این تحقیق، القای تولید کالوس شنبلیله در شرایط هورمونی مختلف به نفع سازی شد. به منظور بهینه سازی محیط کشت برای القای کالوس مناسب، از هیپوکوتیل گیاهچه های شنبلیله به عنوان قطعات جدا کشت استفاده گردید. قطعات جدا کشت روی محیط MS جامد حاوی نسبتها و غلظتهای مختلف بنزیل آدنین (BA) (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۱ میلی گرم در لیتر) و نفتالن استیک اسید (NAA) (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۱ میلی گرم در لیتر) کشت گردیدند. بعد از گذشت ۴ هفته کشت ها از نظر میزان کالوس زایی، رشد، رنگ و بافت مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که قطعات جدا کشت در محیط حاوی NAA (۰/۴ میلی گرم در لیتر) و BA (۰/۴ میلی گرم در لیتر) باعث تولید بیشترین درصد کالوس زایی (حدوداً ۸۴٪) شدند و همچنین با داشتن رنگ کرم، دارای رشد مناسب (حدود ۴ گرم در هفته) و بافت تردتر بودند.

کلمات کلیدی: شنبلیله، کالوس، هورمون.

### مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) گیاهی است از تیره بقولات (Fabaceae) که بومی ایران بوده و در بیشتر نواحی ایران از جمله آذربایجان، اصفهان، فارس، خراسان، سمنان و دامغان می روید و به عنوان سبزی خوراکی کاشته شده و مصرف می شود. شنبلیله دارای خواص ضد دیابتی، ضد سرطان، ضد میکروبی و کاهنده قندخون می باشد. خواص دارویی شنبلیله به دلیل وجود ترکیبات استروئیدی، ترکیبات نیتروژن دار، پلی فنول، ترکیبات فرار، آمینو اسید و... موجود در آن می باشد. دانه های شنبلیله دارای ۶۰-۴۵٪ قند، ۳۰-۲۰٪ پروتئین، ۱۰-۵٪ لیپید، آلکالوئید اساسا تری گونلین (۰/۲-۰/۳٪)، آمینو اسیدهای آزاد و روغن های فرار می باشد. یکی از روشهایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگر در زمینه بررسی مواد موثره مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت و سلول گیاهی است. محققین با استفاده از این روش سعی کرده اند تا تولید متابولیت های ثانویه با ارزش در گیاهان را افزایش دهند. در کشت بافت می توان متابولیت هایی مانند آلکالوئید ها را مستقل از فاکتورهای مثل آب و هوا و شرایط جغرافیایی تولید نمود. بطور خاص کشت تعلیقی سلول های گیاهی ضمن افزایش سرعت رشد آنها سبب افزایش انباشتگی متابولیت های مورد نظر در یک دوره زمانی کوتاه می گردد. در کشت کالوس گیاه شنبلیله *Trigonella foenum-graecum* میزان آلکالوئید تری گونلین به میزان ۳-۴ برابر بیشتر از میزان موجود در دانه های این گیاه و همچنین ۱۲ تا ۱۳ برابر بیشتر از میزان تولید شده در ریشه و اندام هوایی آن گزارش شده است. علاوه بر این، میزان بالاتر این آلکالوئید در کشت سلول این گیاه گزارش شده است.

## مواد و روشها

### کشت بذرها

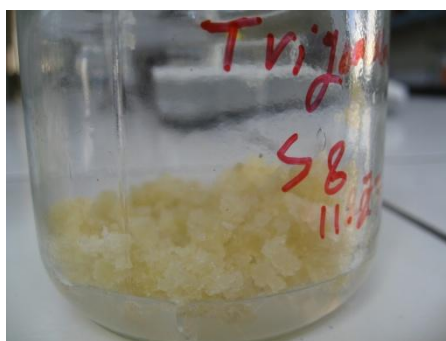
بذرها پس از شستشوی سطحی، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرار گرفتند، سه بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند. سپس ۱۰ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳/۳ درصد قرار داده شدند و مجدداً سه بار با آب سترون شستشو شدند، در مرحله آخر یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند و با آب مقطر سترون آبکشی شدند. بذرها در محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت داده شدند. بذرها به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند و از گیاهچه های حاصل برای ایجاد قطعات جداگشت و کشت بافت استفاده شد.

### القای تولید کالوس

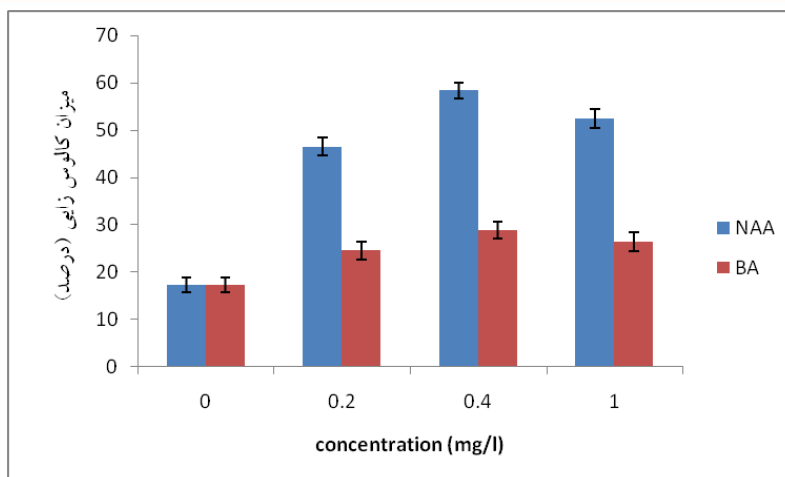
به منظور بهینه سازی محیط کشت برای القای کالوس مناسب، از هیپوکوتیل گیاهچه های شنبلیله به عنوان قطعات جدا کشت استفاده گردید. قطعات جدا کشت روی محیط MS جامد (pH ۵/۸، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر و آگار ۰/۸ درصد) حاوی نسبتها و غلظتهای مختلف بنزیل آدنین (BA) (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۱ میلیگرم در لیتر) و نفتالن استیک اسید (NAA) (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۱ میلیگرم در لیتر) با ۸ تکرار کشت گردیدند. بعد از گذشت ۴ هفته کشت ها از نظر میزان کالوس زایی، رشد، ظاهر، رنگ و بافت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### نتایج و بحث

قطعات جداگشت در محیط حاوی غلظت های مختلف هورمون های NAA و BA باعث القای کالوس شدند (شکل ۱). نتایج نشان داد که قطعات جداگشت در محیط کشت حاوی غلظتهای مختلف NAA در مقایسه با BA باعث کالوس زایی بیشتری شدند (شکل ۲). نسبتهای مختلف دو هورمون نیز باعث القای کالوس شدند به طوریکه قطعات جداگشت در محیط حاوی NAA (۰/۴ میلی گرم در لیتر) و BA (۰/۴ میلی گرم در لیتر) بیشترین درصد کالوس زایی (حدوداً ۸۴٪) را نشان دادند (جدول ۱). همچنین با داشتن رنگ کرم، دارای رشد مناسب (حدود ۴ گرم در هفته) و بافت تردتر بود (شکل ۱). بنابراین بهینه سازی محیط کشت نقش مهمی در القای کالوس دارند. برای القای موثر کالوس در گیاه دارویی شنبلیله لازم است از تیمار همزمان NAA و BA استفاده گردد.



شکل ۱. القای کالوس از قطعات جداگشت هیپوکوتیل شنبلیله در محیط کشت MS



شکل ۲. تاثیر غلظت‌های مختلف NAA و BA بر میزان کالوس زایی

جدول ۱. تاثیر مقادیر و نسبت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) و نفتالن استیک اسید (NAA) بر میزان کالوس زایی (درصد) قطعات جداگشت هیپوکوتیل شنبليله

۱	BA(mg/l)		NAA (mg/l)
	۰/۴	۰/۲	
۳۶/۳۸	۴۴/۵۲	۵۱/۶۶	۰/۲
۴۳/۷۲	۸۴/۳۶	۷۵/۴۶	۰/۴
۷۳/۲۲	۶۴/۶۸	۵۸/۶۲	۱

## References

1. **Fazli, F and Hardman R., 1968.**The spice, fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): It commercial varieties of seed as a source of diosgenin. Tropical Sciences. 10: 66-78.
2. **Hardman, R., 1969.** Pharmaceutical products from plant steroids. Tropical Sciences.11: 196 – 222.
3. **Mehrafarin, A, Qaderi, A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi, H., and Zand, E., 2010.** Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecu* L.). Journal of Medicinal plants. 9: 1 – 18.
4. **Mehrafarin, A., Rezazadeh, Sh., Naghdi Badi, H., Zand, E., 2011.** A Review on Biology, Cultivation and Biotechnology of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a Valuable Medicinal Plant and Multipurpose. Journal of Medicinal plants. 10: 1-19.
5. **Petropoulos, G., 2002.** Fenugreek. The genus *Trigonella*. Taylor and Francis, London and New York, p.255.

## Callus induction of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) by plant growth regulators in *in vitro* condition

Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi<sup>\*1</sup>, Ayatollah Rezaei<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

<sup>2</sup>Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

### Abstract

Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), is a medicinal plant with anti-diabetic, anti-cancer, anti-microbial effects. Medicinal properties of fenugreek is due to various compounds including alkaloids, trigonellin. In this study callus induction of *Trigonella foenum-graecum* in different hormone conditions was optimized. Hypocotyle of seedlings were used as explant. Callus induction was established in MS medium with different concentrations of, BA (0, 0.2, 0.4 and 1 mg/l), NAA(0, 0.2, 0.4 and 1 mg/l). Cultures were evaluated in terms of callus growth, color and texture after 4 weeks. The results showed that explants in medium containing NAA (0.4 mg/l) and BA (0.4 mg/l) induced the highest percentage of callus (approximately 84%) and also with a cream color had appropriate growth (approximately 4 g per week) and tissues were more crispy.

**Key words:** Fenugreek, callus, hormone.