تغییرات بیوسنتز تریگونلین تحت تأثیر ترکیبات نیتروژنه در کشت ریشه‌های مویین شنبلیله ایرانی (*Trigonella foenum-graecum* L.)

زهرا اکبری[۱]، اردشیر قادری[۲]، سپیده کلاته جاری[۳]، علی مهرآفرین[٤]، حسنعلی نقدی‌بادی[٥]*

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی علوم و تحقیقات، تهران
۲- عضو هیأت علمی گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
۳- استادیار، گروه باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران
٤- عضو هیأت علمی گروه پژوهشی کشت و توسعه گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
٥- دانشیار، گروه پژوهشی کشت و توسعه گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
*آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق‌پستی: ۳٦۹ – ۳۱۳۷٥
تلفن: ۳٤۷٦٤۰۱۰ (۰۲٦)، نمابر: ۳٤۷٦٤۰۲۱ (۰۲٦)
پست الکترونیک: Naghdibadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/٦/٥ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۱۲/۲۳

چکیده

مقدمه: تریگونلین متابولیت ارزشمندی از دسته آلکالوئیدها با اثرات درمانی موثر به ویژه در دیابت است.

هدف: در این تحقیق اثر سه سطح مختلف ترکیبات نیتروژنِ محیط کشت پایه موراشیک- اسکوگ شامل KNO_3 و NH_4NO_3 بر میزان تولید تریگونلین در کشت سوسپانسیون ریشه‌های نرمالَ و ریشه‌های مویین مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: به منظور القای ریشه‌های مویین از دو سویه ***ATCC15834*** و ***K599*** باکتری ***Agrobacterium rhizogenes*** به روش غوطه‌ورسازی و تزریق استفاده شد. به منظور تأیید درج قطعه **T-DNA** در ژنوم گیاه و عدم حضور اگروباکتریوم با استفاده از پرایمر ژن‌های ***rolB*** و ***virD*** در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آنالیز مولکولی انجام گرفت. ریزنمونه‌های ریشه مویین و طبیعی در محیط‌های کشت سوسپانسیون موراشیگ - اسکوگ در سه سطح مختلف ترکیبات نیتروژن، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار کشت شده و ریشه‌ها بعد از گذشت ۲۸ روز برداشت شدند. پس از انجام عصاره‌گیری، میزان آلکالوئید تریگونلین توسط دستگاه **HPLC** مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: هر دو سویه باکتری ***K599*** و ***ATCC15834*** به ترتیب بعد از دو و سه هفته، باعث القای ریشه‌های مویین در قسمت‌های طوقه، ساقه و برگ گیاهچه‌ها شدند. بیشترین مقدار تریگونلین (۱۳/۹۸ میلی‌مول بر گرم ماده خشک) مربوط به تیمار ریشه‌های مویین با دو برابر ترکیبات نیتروژنه و کمترین مقدار (۸/۷٤ میلی‌مول بر گرم ماده خشک) مربوط به ریشه‌های نرمال با نصف ترکیبات نیتروژن بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج نشان داد که ترکیبات نیتروژنه به ویژه یون آمونیوم نقش تعیین‌کننده‌ای در تولید تریگونلین و رشد ریشه‌های مویین دارند.

گل واژگان: متابولیت ثانویه، تریگونلین، ریشه مویین، اگروباکتریوم ریزوژنز

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.12.0]

مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) گیاهی یک‌ساله و دولپه متعلق به زیر خانواده پروانه آساها از خانواده لگوم‌ها می‌باشد [۱]. از دیرباز برگ‌ها و بذرهای این گیاه به طور گسترده‌ای در سراسر جهان با اهداف متفاوتی مانند ضددیابت، پایین‌آورنده قند و کلسترول خون، ضدسرطان، ضدباکتریال، چاشنی غذایی و غیره مورد استفاده قرار گرفته است [۲]. بذر این گیاه منبع تولید تجاری مهمی از متابولیت‌های با ارزشی نظیر تریگونلین (Trigonelline) و دیوسژنین (Diosgenin) می‌باشد و در بسیاری از لگوم‌ها تریگونلین به عنوان متابولیت ثانویه از Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) تولید می‌شود [۳]. محققان برای این متابولیت ثانویه نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در گیاه از قبیل، فاکتور فعال در حرکت برگ‌ها [٤]، ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی [٥] و عامل حفظ فشار تورژسانس [٦] گزارش کرده‌اند. همچنین تریگونلین دارای نقشی هورمونی در تنظیم سیکل سلولی در مرحله G_2 (توقف تقسیم سلولی بعد از دوبل شدن مواد ژنتیکی) می‌باشد [۷]. همچنین تریگونلین استخراج شده از شنبلیله اثرات ضددیابتی مؤثری در درمان بیماران دیابتی از خود نشان داده است [۸].

بذرهای نارس و خشک شنبلیله حاوی ۰/۱۵ درصد تریگونلین و عملاً فاقد نیکوتینیک اسید (Nicotinic acid) می‌باشد. البته چنانچه بذرهای گیاه به اندازه کافی حرارت داده شوند حدود ٦۷ درصد تریگونلین به نیکوتینیک اسید تبدیل خواهد شد [۹]. در سایر منابع مقادیر بالاتری نظیر ۰/۳۸ درصد تریگونلین و ۰/۰۰۳ درصد نیکوتینیک اسید در بذر این گیاه نیز گزارش شده است [۱۰]. به طورکلی تریگونلین از مسیر بیوسنتز NAD و مسیر بیوسنتز *De novo* نوکلئوتیدهای پیریدینی در گیاهان ساخته می‌شود [۱۱]. تاکنون مطالعات معدودی به منظور تولید تریگونلین و دیوسژنین از طریق کشت درون شیشه شنبلیله صورت گرفته است [۱۲،۱۳،۱٤،۱۵]. طی سال‌های اخیر کشت ریشه‌های مویین به منظور تولید متابولیت‌های با ارزش در تعدادی از گونه‌های گیاهان دارویی در مقیاس تجاری صورت گرفته است [١٦]. ریشه‌های مویین از طریق تراریخت نمودن سلول‌های گیاهی توسط باکتری *Agrobacterium Rhizogenes* تشکیل می‌شوند و همانند سلول‌های معمولی دارای پایداری ژنتیکی در طول دوره کشت می‌باشند [۱۷].

به هر حال، امروزه تولید متابولیت‌های ارزشمند گیاهی از طریق کاربرد روش‌های نوین از جمله کشت ریشه‌های مویین مورد توجه بسیاری از محققین در دنیا قرار گرفته است. بر این اساس تولید آلکالوئید تریگونلین به عنوان یک متابولیت دارویی ارزشمند در درمان بیماری دیابت بیشتر مورد توجه می‌باشد. بنابراین در این تحقیق که بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با عنوان بررسی اثر القاءکننده‌ها بر میزان تولید آلکالوئید تریگونلین در کشت ریشه‌های مویین گیاه شنبلیله است، اثر ترکیبات نیتروژنه محیط کشت و ریشه‌های مویین در راستای افزایش میزان تولید تریگونلین مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای شنبلیله ایرانی با شماره ثبتی TF-925 از بانک بذر پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تهیه شد. به منظور استریل نمودن بذرها به ترتیب زیر اقدام شد:

۱- شستشو با آب جاری و توین ۲۰ به مدت ۲۰دقیقه
۲- ۳۰ ثانیه شستشو با اتانول ۷۰ درصد
۳- شستشو با آب مقطر استریل
٤- ۱۵ دقیقه شستشو با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد و
۵- شستشو با آب مقطر استریل شده.

در پایان بذرها به منظور جوانه‌زنی در محیط کشت پایه MS [۱۸] فاقد تنظیم‌کننده‌های رشدی حاوی ۲/۵ گرم ذغال فعال در لیترکشت و در ژرمیناتور با شرایط تاریک و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.12.0]

القای ریشه‌های مویین

به منظور القای ریشه‌های مویین در شنبلیله از دو سویه *ATCC15834* و *K599* باکتری اگروباکتریوم ریزوژنز استفاده شد. سویه‌های باکتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و محیط کشت LB مایع و در OD600= 0.4 به منظور تلقیح گیاهچه‌ها آماده شدند. گیاهچه‌های دوبرگی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول‌های سوسپانسیون باکتری (سویه *ATCC15834* + آب مقطر، سویه *ATCC15834* + ساکارز ۵ درصد، سویه *K599* + آب مقطر و سویه *K599* + ساکارز ۵ درصد) به دو حالت (الف). ایجاد خراش و تزریق در سطح طوقه، ساقه و برگ‌ها و (ب). قطع طوقه و غوطه‌ورسازی در محیط تلقیح آلوده شدند. در مرحله بعد ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت MS پایه منتقل شدند و بعد از گذشت سه روز ریزنمونه‌ها به منظور حذف باکتری به محیط کشت MS پایه حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxime) منتقل شدند. بعد از ظهور ریشه‌های مویین، از محل رویش قطع و به محیط MS پایه بدون آگار انتقال و در شیکر – انکوباتور تحت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ دور در دقیقه در تاریکی نگهداری شد تا بعد از طی دوره کمون شروع به رشد نمایند.

آنالیز مولکولی ریشه‌ها از طریق واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR)

استخراج DNA ژنومی ریشه‌ها به روش CTAB [۱۹] صورت گرفت. به منظور آنالیز مولکولی تایید حضور قطعه T-DNA پلاسمید Ti در ریشه‌ها از پرایمرهای ژن *rolB*، با توالی‌های '5-GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT-3' و '5-GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC-3' و به منظور اطمینان از عدم وجود *A. rhizogenes* در ریشه‌ها از پرایمرهای *virD*، با توالی‌های 5′-GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT-3′ و 5′-GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC-3′ استفاده شد. شرایط دمایی PCR برای تکثیر ژن *rolB* و *virD* شامل، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۱/۱ سانتی‌گراد برای ژن *rolB* و ۴۶/۴ درجه سانتی‌گراد برای ژن *virD* به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه) در دستگاه ترماسایکلر Eppendorf مدل Mastercycler gradient تکثیر و تولیدات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی (اتیدیوم برماید) و توسط دستگاه ژل داک عکسبرداری شدند.

بررسی میزان متابولیت تریگونلین در ریشه‌های مویین

به منظور بررسی اثر مقادیر مختلف ترکیبات نیتروژنه محیط کشت بر محتوای تریگونلین، سه میزان مختلف از ترکیبات نیتروژنه محیط کشت MS، به ترتیب با نصف مقدار ترکیبات نیتروژنه (KNO3=950 mg/L, NH4NO3=825 mg/L)، ترکیبات نیتروژنه محیط پایه (KNO3 = 1900 mg/L, NH4NO3= 1650 mg/L) و دو برابر مقدار ترکیبات نیتروژنه (KNO3=3800 mg/L, NH4NO3=3300) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار بر روی ریشه‌های نرمال و مویین مورد بررسی قرار گرفت. برای آنالیزهای آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین از نرم‌افزار SPSS استفاده شد [۱۷]. در ادامه از ریشه‌های مویین و ریشه‌های معمولی قطعات ۱ سانتی‌متری تهیه و به تعداد ۱۰ قطعه در هر ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت قرار داده شد. ارلن‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شرایط تاریکی و ۱۲۰ دور در دقیقه شیکر نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۸ روز [۲۰] ریشه‌ها برداشت و به منظور اندازه‌گیری محتوای تریگونلین، نمونه‌ها در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد تا وزن آنها ثابت شود. برای تهیه محلول‌های سنجش تریگونلین، سه گرم از نمونه خشک شده با آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت ریفلاکس شده سپس عصاره صاف شده و با آب مقطر به حجم۲۵۰ میلی‌لیتر رسید. محلول حاصل به صورت ۱:۵ حجمی/حجمی رقیق شده و ۳ میلی‌لیتر از آن پس از عبور از صافی با قطر ۰/۴۵ میکرومتر به دستگاه HPLC با ستون C18 تزریق شد. قابل ذکر است که فاز متحرک شامل اسید کلریدریک ۲ میلی‌مول بر لیتر آب (pH=3) و سرعت جریان

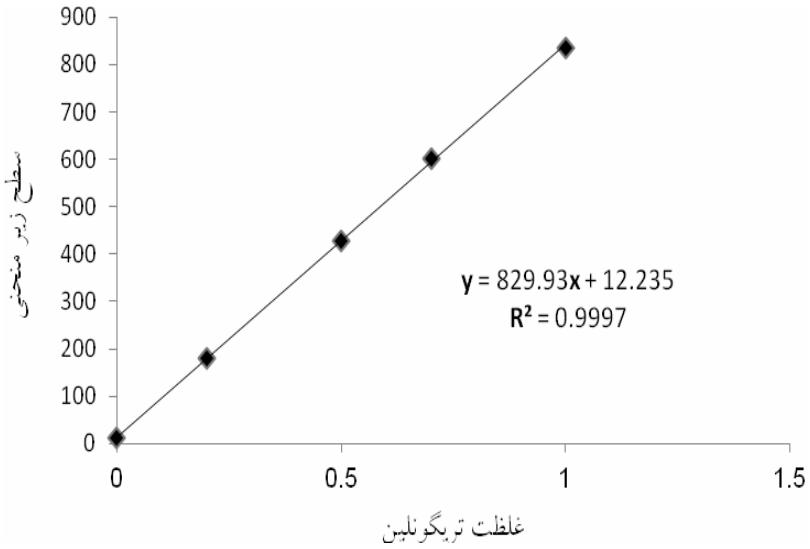
[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.12.0]

۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود [۲۲، ۲۱]. برای تهیه استاندارد، پس از توزین دقیق جهت تهیهٔ غلظت‌های مناسب (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در ۵ بالن ژوژه جداگانه ریخته و با آب به حجم رسانده شد. در ادامه به کمک دستگاه اولتراسونیک انحلال کاملاً صورت گرفت و پس از فیلتراسیون با فیلتر میکرونی مخصوص از هرکدام از محلول‌های به دست آمده ٤ نمونه داخل دستگاه خودکار تزریق منتقل شد. از روی سطح زیر منحنی به دست آمده بر حسب غلظت، منحنی کالیبراسیون برای نمونه‌های استاندارد تریگونلین به طور مجزا رسم شد (شکل شماره ۱). سپس با استفاده از رابطه رگرسیون (y=829.93x+12.235) مقادیر مجهول در نمونه‌ها محاسبه شد [۲۲].

نتایج

هر دو سویه باکتری *K599* و *ATCC15834* مورد استفاده در این تحقیق توانایی ایجاد ریشه‌های مویین را در نواحی مختلف از قبیل برگ، ساقه و طوقه گیاهچه‌ها تلقیح شده را داشتند. به طوری که در گیاهچه‌های تلقیح شده با سویه K599 بعد از ۲ هفته و سویه *ATCC15834* بعد از ۳ هفته ریشه‌های مویین ظاهر شدند (شکل شماره ۲). نتایج حاصل از PCR نشان از بیان ژن *rolB*، عدم بیان ژن *virD* به منظور عدم حضور باکتری *A. rhizogenes* در ریشه‌های مویین می‌باشد (شکل شماره ۳). نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی از وجود تفاوت بسیار معنی‌دار میان تیمارهای اعمال شده است (جدول شماره ۱). از سوی دیگر آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار محافظت شده در سطح احتمال α=۵ درصد، میانگین‌ها را در ٤ دسته طبقه‌بندی نمود. بر طبق این نتایج میانگین تولید متابولیت تریگونلین برای تیمارهای HR3، HR2، HR1، NR3، NR2 و NR1 به ترتیب شامل ۱۳/۹۸، ۱۲/۳۹، ۱۱/۰٤، ۱۲/۲۱، ۱۰/٤۸ و ۸/۷٤ میلی‌مول بر گرم ماده خشک بود (شکل شماره ٤).

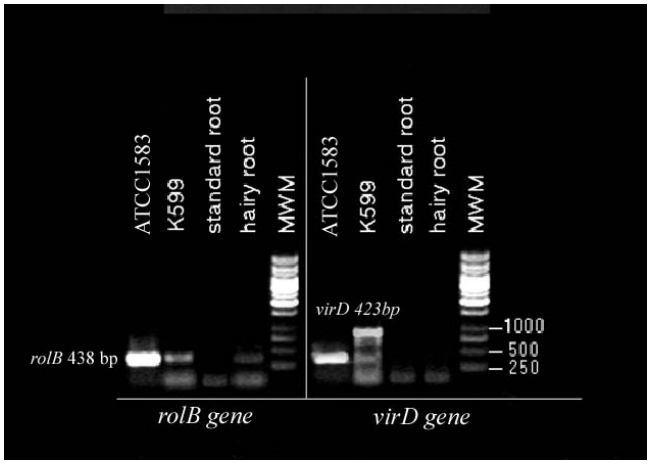


شکل شماره ۱ – منحنی استاندارد تریگونلین

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.12.0]



شکل شماره ۲ – ریشه مویین القا شده روی ساقه (۱)، ریشه مویین القا شده روی برگ (۲)، ریشه‌های مویین ایجاد شده روی طوقه



شکل شماره ۳ – حضور باند مربوط به ژن *rolB* (438bp) در ریشه‌های مویین و عدم حضور آن در ریشه‌های نرمال. عدم حضور باند مربوط به ژن *virD* (423bp) در ریشه‌های مویین و نرمال

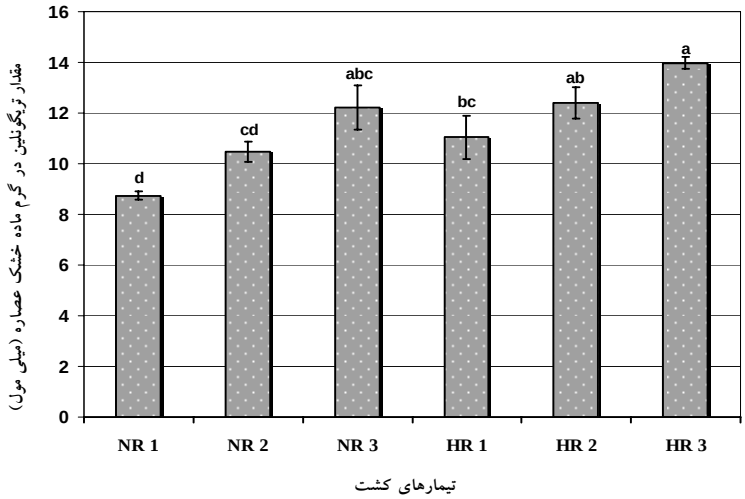
جدول شماره ۱- تجزیه واریانس (ANOVA) میانگین مربعات تریگونلین شنبلیله تحت تأثیر تیمارهای مختلف ریشه و محیط‌های کشت

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (D.F)	تریگونلین
تیمار (T)	۵	۹/۷۹۲**
تکرار (R)	۲	۱/٦٤۳
خطا (Error)	۱۰	۰/۹۳۱
ضریب تغییرات (CV%)	–	٪۸/٤۱

** تیمارهای اعمال شده در سطح آماری یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.12.0]



شکل شماره ٤- تغییرات مقدار تریگونلین براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار محافظت‌شده (LSD) در سطح آماری ٥ درصد برای تیمارهای مختلف ریشه و محیط‌های کشت. علایم اختصاری NR1، NR2 و NR3 برای تیمارهای مختلف ریشه معمولی و HR1، HR2 و HR3 برای تیمارهای مختلف ریشه مویین هر کدام به ترتیب در محیط‌های کشت MS با نصف مقدار ترکیبات نیتراته (KNO_3 = 950 mg/L, NH_4NO_3= 825 mg/L)، ترکیبات نیتراته پایه محیط (KNO_3 = 1900 mg/L, NH_4NO_3= 1650 mg/L) و دو برابر مقدار ترکیبات نیتراته (MS_{2xN}(KNO_3 = 3800 mg/L, NH_4NO_3= 3300 mg/L) می‌باشد، وزن مولکولی تریگونلین برابر با ۱۳۷/۱۵ گرم بر مول است.

بحث

تحقیقات گذشته حاکی از تأثیر بسیار مهم نسبت کربن به نیتروژن (C/N) در گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه به ویژه آلکالوئیدها است [۲۳]، به طوری‌که Hirasuna و همکاران [۲٤] اعلام نمودند که نوع قند موجود در محیط کشت و نسبت آن در مقایسه با ترکیبات نیتروژنه، اثر تعیین کننده‌ای بر میزان تولید آلکالوئیدها به ویژه تاکسوئید در کشت سلولی سرخدار دارد. همچنین نقش مؤثر نسبت کربن به نیتروژن در تولید دیوسژنین در گیاه *Dioscorea deltoidea* به اثبات رسیده است [۲۵]. به طور کلی نقش تعیین‌کننده ترکیبات نیتروژنه در افزایش آلکالوئیدها، ناشی از این موضوع است که نیتروژن مولکول اصلی در ترکیب اسیدهای آمینه و متابولیت‌های حاصل از آنها (آلکالوئیدها) می‌باشد [۲٦]. تحقیق حاضر نیز وجود ارتباط مستقیم میان مقدار تریگونلین و میزان ترکیبات نیتروژنه محیط کشت را نشان داده است، این امر را می‌توان ناشی از افزایش یون آمونیم (NH_4^+) دانست، که به نوبه خود با ترکیب با آلفا – کتوگلوتارات، آسپارتات و گلوتامات را تولید می‌کند. کوریزمیک اسید (Chorismic acid) با گرفتن یون آمونیم به آنتی‌هارانیلیک اسید (Antyharanilic acid) ← تریپتوفان (Tryptophan) تبدیل می‌شود [۲۷]. در مرحله بعد تریپتوفان از طریق مسیر بیوسنتزی کینورنین (Kynurenine pathway)، نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD) را تولید کرده [۲۸] و در نهایت این ترکیب از طریق مسیر بیوسنتزی سالویج (Salvage pathway) به تریگونلین تبدیل می‌شود [۲۹]. از سوی دیگر نتایج حاکی از توانایی بیشتر ریشه‌های مویین در استفاده از مقادیر بیشتر نیتروژن و تولید تریگونلین در مقایسه با ریشه‌های معمولی می‌باشد. در واقع ریشه‌های مویین به دلیل درج شدن قطعه T-DNA از پلاسمید Ri قابلیت تقسیم و رشد سریع را بدون حضور تنظیم کننده‌های رشد کسب نموده‌اند و توانایی رشد نامحدود خود را در کشت‌های متوالی حفظ می‌کنند [۳۰،۳۱]. در این تحقیق افزایش تولید زیست توده (Biomass) توسط ریشه‌های مویین نسبت به ریشه‌های طبیعی یکی از عوامل افزایش عملکرد تریگونلین بوده است. در تحقیقات آتی پیشنهاد می‌شود که اثر فاکتورهای مختلفی از جمله نوع ترکیبات نیتروژنه، سویه باکتری و محرک‌های زیستی (Elicitor) در کشت

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.12.0]

ریشه‌های مویین شنبلیله جهت دستیابی به روشی مؤثر در تولید تجاری متابولیت تریگونلین مورد بررسی قرارگیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و گروه پژوهشی کشت و توسعه در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی انجام شده است.

منابع

1. Acharya SN, Thomas JE, and Basu SK. Fenugreek, an alternative crop for semiarid regions of North America. *Crop Sci*. 2008; 48: 841 - 53.

2. Sadeghzadeh-Ahari D, Kashi AK, Hassandokht MR, Amri A and Alizadeh Kh. Assessment of drought tolerance in Iranian fenugreek landraces. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 2009; 7 (3 & 4): 414 - 9.

3. Minorsky PV. Trigonelline: a diverse regulator in plants. *Plant Physiol*. 2002; 128: 7 - 8.

4. Auerbach C. Chemicals and their effects. Proc. *Symp. On Mutation and Plant Breeding, Cornell*, Nov.–Dec. 1961; 25: 585 - 621.

5. Rosser A. The day of the yam. *Nurs. Times*. 1985; 81: 47 - 8.

6. Shimizu MM and Mazzafera P. A role for trigonelline during imbibition and germination of coffee seeds. *Plant Biol*. 2000; 2: 605 - 11.

7. Green JM, Sharma D, Reddy LJ, Saxena KB, Gupta SC, Jain KC, Reddy BVS, and Rao MR. Methodology and progress in the I.C.R.I.S.A.T. Pigeonpea Breeding Program. Proc. Intern. Workshop on Pigeonpeas, Patancheru Dec. 1981; pp: 437- 449.

8. Moorthy R, Prabhu KM, and Murthy PS. Anti-hyperglycemic compound (GII) from Fenugreek seeds, its purification and effect in diabetes mellitus. *Indian J. Exp. Bot*. 2010; 48: 1111 - 8.

9. Covello M. Trigonellin and nicotinic acid in *Trigonella foenum-graecum* and their relation to antipellagra activity. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper*. 1943; 18: 159 - 61.

10. Kühn A. and Gerhard H. The trigonellin and nicotinic acid contents of semen foenugraeci. *Arch. Pharm*. 1943; 281: 378 - 9.

11. Qian ZX, Matsui A, and Ashihara H. Biosynthesis of trigonelline from nicotinate mononucleotide in mungbean seedlings. *Phtochem.* 2007; 69: 390 - 5.

12. Brain KR and Lockwood GB, Hormonal control of steroid levels in tissue cultures from *trigonella. Phytochem.* 1976; 15: 1651 - 4.

13. Radwan SS and Kokate CK. Production of higher levels of trigonelline by cell cultures of *Trigonella foenum - graecum* than by the differentiated plant. *Planta* 1980; 147: 340 - 4.

14. Oncina R, Boto AJA, Del RJA, Ortun AA. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chem.* 2000; 70: 489 - 92.

15. Merkli A, Christen P, and Kapetanidis I. Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum.graecum* L. *Plant Cell Rep*. 1997; 16: 632 - 6.

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

17. Charlwood BV and Charlwood KA. Terpenoid production in plant cell culture In: Harborne JB, Tomas-Barberan FA. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. *Clarendon Press. Oxford.* 1991; 95 - 132.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.12.0]

18. Murashige T and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 1962; 15: 473 - 97.

19. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1990; 12: 13 - 5.

20. Akbarian R, Hasanloo, Khosroshahli M. Evaluation of trigonelline production in *Trigonella foenum- graecum* hairy root cultures of two Iranian masses. *Plant Omics J*. 2011; 4 (7): 408 - 12.

21. Campa C, Ballester JF, Doulbeau S, Dussert S, Hamon S, and Noirot M. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chem.* 2004; 88: 39 – 43.

22. Oraei H. Comparison and validate of investigation of Trigonelline amount of fenugreek seed by HPLC and spectrophotometer (UV) methods. Pharmacy thesis. Medicinal Science University of Tehran. 2009, 354 pp.

23. Wink M. Biochemistry of Plant Secondary Product Metabolism. CRC Press, USA. 1999, pp: 1 - 16.

24. Hirasuna TJ, Pestchanker LJ, Srinivasan V, Shuler ML. Taxol production in suspension cultures of Taxus baccata. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 1996; 44: 95 - 102.

25. Tal B, Rokem JS, Goldberg I. Factors affecting growth and product formation in plant cells grown in continuous culture. *Plant Cell Rep*. 1983; 2: 219 - 22.

26. Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001; 52: 29 - 66.

27. Khanam, S. General study of formation of secondary metabolites. Dept. of Pharmacognosy Al-Ameen College of Pharmacy Hosur Road, Opp. Lalbagh main gate. Bangalore. 2007, 24 pp.

28. Heyes MP, Chen CY, Major EO, Saito K. Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell type. *Biochem. J.* 1997; 326: 351 - 6.

29. Zheng XQ, Ashihara H. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Sci.* 2004; 166: 807 - 13.

30. Sharp JM, Doran PM, Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol. Prog.* 2001; 17 (6): 979 - 92.

31. Petersen SG, Stummann BM, Olesen P, Henningsen KW. Structure and function of root-inducing (Ri) plasmids and their relation to tumor-inducing (Ti) plasmids. *Physiol. Plant* 1989; 77: 427 - 35.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.12.0]