اثر پرتودهی گاما بر رشد و میزان تریگونلین ریشه‌های مویین شنبلیله ایرانی (*Trigonella foenum-graecum* L.)

رضا اشرفی پارچین[1]، علی‌اصغر نصراله‌نژادقمی[2]*، حسنعلی نقدی‌بادی[3]، علی اسکندری[4]، سعید نواب‌پور[5]، علی مهرآفرین[3]

۱- دانشجوی دکترا، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۴- پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران
۵- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
*آدرس مکاتبه کننده: گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (پردیس ۲)، دانشکده تولید گیاهی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، کد پستی: ۱۵۷۳۹ – ۴۹۱۳۸
تلفن و نمابر: ۳۲۴۳۷۶۱۸ (۰۱۷)
پست الکترونیک: nasrollahnejad@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۲۶ **تاریخ تصویب:** ۹۷/۱۰/۲۹ doi: 10.29252/jmp.4.72.160

چکیده

مقدمه: شنبلیله گیاه دارویی ارزشمندی است و بررسی اثرجهش‌های القایی در راستای افزایش ماده مؤثره آن ضروری می‌باشد.

هدف: در این تحقیق، تغییرات فیتوشیمیایی و رشدی ریشه‌های مویین و نرمال گیاه شنلیله در پاسخ به پرتودهی گاما مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی: در این تحقیق پرتوتابی گاما بر روی بذور شنبلیله ایرانی در پنج دز (شامل ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری) اعمال شد و سپس اثرات پرتودهی بذور در شرایط کشت ریشه مویین در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور القای ریشه‌های مویین در شنبلیله از سویه **ATCC15834** باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که دزهای مختلف پرتوتابی برهمه صفات مورد بررسی در ریشه‌های نرمال و مویین تأثیر معنی‌داری داشتند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در همه صفات مورد مطالعه، بیشترین مقادیر صفات مربوط به دز ۱۰۰ گری و کمترین مقادیر صفات مربوط به پرتوتابی بذور با دز ۴۰۰ گری است. محتوای تریگونلین در ریشه‌های مویین در مقایسه با ریشه‌های نرمال به طور قابل توجهی بیشتر بود به طوری که میزان تریگونلین در ریشه‌های مویین تیمارهای مختلف شامل (۰)، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری به ترتیب به میزان ۲/۴۶، ۲/۶۷، ۲/۶۶، ۲/۴۴ و ۲/۶۴ برابر بیشتر از ریشه‌های نرمال بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق بیانگر افزایش تکثیر سلولی، رشد و مقدار متابولیت‌های ثانویه تریگونلین به دلیل اثر تحریک‌کنندگی دزهای پایین پرتوهای گاما است.

گل‌واژگان: شنبلیله ایرانی، پرتو گاما، تریگونلین، جهش، ریشه مویین

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]

مقدمه

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L. گیاهی است که از لحاظ غذایی، علوفه‌ای، فیبری، دارویی و آرایشی اهمیت زیادی دارد. ارزش غذایی بالای آن، به دلیل محتوای درشت و ریزمغزی‌ها و فیبرهای غذایی – رژیمی برگ‌ها و دانه‌های آن است [۱]. تا به حال مطالعات زیادی در مورد اثرات درمانی شنبلیله انجام شده است که از آن جمله می‌توان به اثرات درمانی آن برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها، مانند دیابت، کم خونی، ضدبارداری، سرطان، کمبود ایمنی، سوءهاضمه و مسمومیت، التهاب و غیره اشاره کرد [۶-۲]. شنبلیله غنی از متابولیت‌های ثانویه با ارزش از قبیل کولین‌ها، ساپونین‌های آلکالوئیدی، تریگونلین، تریگوکومارین، تری متیل کومارین و ساپوژنین‌های استروئیدی است. از این رو بهبود ژنتیکی آن بایستی با درک تغییر تولید متابولیتی و مسیر دارویی که هر یک از متابولیت‌ها عمل می‌کنند، باشد [۸، ۷]. کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه است زیرا پتانسیل تولید این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد. تکنیک‌های مورد استفاده در این زمینه عمدتاً عبارتند از: کشت سلول، کشت اندام و کشت ریشه‌های مویین [۹، ۸].

تراریخت کردن ژنتیکی اهمیت زیادی برای مطالعه عملکرد ژن و کشاورزی مولکولی دارد. ریشه‌های مویین تراریخته، در افزایش گیاهان تراریخته و کشاورزی مولکولی مهم هستند [۱۰]. ریشه‌های مویین از آلودگی گیاه با باکتری *Rhizobium rhizogenes* (که یک باکتری گرم منفی و خاکزی است) در ناحیه آلوده تولید می‌گردند و منجر به تشکیل ریشه‌های زیادی می‌شوند. باکتری آگروباکتریوم T-DNA خود را از Ri پلاسمید وارد ژنوم هسته‌ای گیاهان میزبان می‌کند [۱۱]. ریشه‌های مویین همانند سلول‌های معمولی دارای پایداری ژنتیکی در طول دوره کشت می‌باشند و در شرایط درون شیشه‌ای در غیاب تنظیم کننده‌های رشد خارجی، رشد می‌کنند [۱۳، ۱۲]. بزرگترین مزیت ریشه‌های مویین، توان بالای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با گیاهان مادری است [۱۴]. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با ارزش در شرایط طبیعی در ریشه‌ها سنتز می‌شوند و اغلب در ارتباط با تمایز ریشه‌ها هستند. کشت ریشه‌های مویین نشان داده است که حتی در مواردی که متابولیت‌های ثانویه فقط در قسمت‌های هوایی گیاه تجمع پیدا کنند، قادر به سنتز و تجمع آن متابولیت هستند [۱۵]. ریشه‌های مویین علاوه بر ثبات ژنتیکی و رشد سریع، نگهداری آن ها آسان و قابلیت رشد در محیط کشت فاقد هورمون و به عنوان منبع دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه را دارند و به دلیل پایداری، به عنوان یک سیستم عالی برای مطالعه فیزیولوژی و متابولیسم گیاهی محسوب می‌شوند [۱۷، ۱۶].

با استفاده از تکنیک‌های به‌نژادی مثل جهش‌های القایی، امکان اصلاح گیاهان دارویی با عملکرد و ماده مؤثره بالا میسر شده است. در این راستا القای جهش در شرایط کشت بافت، راهبردی کوتاه مدت برای تولید تنوع ژنتیکی است که می‌تواند در برنامه های اصلاحی گیاهان مورد استفاده قرار گیرد [۱۹، ۱۸]. از جهش زاهای فیزیکی می‌توان به پرتو ایکس، پرتو گاما، نوترون‌های سریع، نوترون‌های گرمایی، تشعشعات بتا و فرابنفش [۲۰] و از جهش‌زاهای شیمیایی نیز می‌توان به اتیل متان‌سولفانات (EMS)، اتیلن ایمین (EI)، اتیدیوم بروماید، متیل نیروزو اوره (MNU)، ان-نیتروزو-ان-متیل اوره (NMU) و سدیم آزید (NaN3) اشاره کرد [۲۱]. در بسیاری از موارد، هنگام کار با مواد جهش‌زای شیمیایی، عمل سمیت آنها برای سلول‌ها نمایان می‌شود و درصد بالای مرگ و میر سلول‌ها را به همراه خواهد داشت (اصولاً بایستی دزهای پایینی از آنها استفاده شود). در صورتی که پرتوهای یونیزه کننده مانند ایکس و گاما اثرات سمیت کمتری دارند و دزهای بالای آن‌ها فقط قابلیت تولید مجدد و بازیابی سلول‌ها را سرکوب می‌نماید ولی فعالیت‌های متابولیکی آنها حفظ می‌شود و از این جهت جهش‌زاهای فیزیکی برتری نسبی در مقایسه با جهش‌زاهای شیمیایی دارند [۲۲].

نرخ جهش در شرایط درون شیشه‌ای در مقایسه با میزان آن در شرایط طبیعی بالاتر است. یکی از دلایل احتمالی آن، قرار گرفتن ریزنمونه در معرض انواع مواد شیمیایی محیط کشت است. حتی اگر نرخ جهش‌زایی در کشت بافت و سلول به اندازه شرایط مزرعه‌ای باشد، تعداد جهش (10^6 بعد از ۲۰ تقسیم سلولی) در یک جمعیت سلولی باعث افزایش تعداد

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]

جهش‌یافته می‌شود [۲۳]. جهش‌های القا شده در شرایط درون شیشه‌ای، به دلیل افزایش سرعت تقسیم سلولی و مدت زمان کوتاه و اشغال فضای کوچک به راحتی می‌توانند به جمعیت بزرگی از نمونه‌های گیاهی تبدیل شوند [۲۴].

توپوز و ازدمیر (۲۰۰۴) اثر دزهای مختلف گاما (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ کیلوگری) را روی اجزای کپساسیونوئید (Capsaicinoids) در فلفل قرمز مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که تمام اجزای کپساسیونوئید به طور معنی‌داری افزایش یافتند، به طوری که در دز تیماری ۱۰ کیلوگری افزایش ۱۰ درصدی مشاهده شد [۲۶]. کیم و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که پرتودهی گاما افزایش معنی‌داری در سطوح رونویسی ژن‌های *PgSS* و *PgSE* در کشت ریشه مویین جنسینگ ایجاد می‌کند. در واقع پرتو گاما تولید جینوسایدها (Ginsenosides) را با افزایش بیان آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آنها افزایش می‌دهد [۲۷]. محتوای ساپوژنین‌های استروئیدی شنبلیله تحت تأثیر تیمار جهش‌زاهای فیزیکی و شیمیایی برانگیخته می‌شوند. اثر دزهای مختلف انواع جهش‌زاهای شمیایی (EMS، MMS و NaN_3) روی دو گونه شنبلیله *T. corniculata* و *T. foenum-graecum* در کشت کالوس مطالعه شد و نتایج نشان داد که محتوای ساپوژنین‌های استروئیدی (دیوسژنین و تیگوژنین) در همه جهش‌ها در دزهای پایین بیشترین افزایش را داشته است. همچنین دز ۰/۱ مولار EMS بیشترین مقدار محتوای ساپوژنین‌های استروئیدی را داشت [۲۵، ۱۹].

با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی بر روی اثر جهش‌زاها بر روی شنبلیله ایرانی در شرایط کشت ریشه مویین صورت نگرفته است، این تحقیق جهت مطالعه پاسخ‌های فیتوشیمیایی گیاه نسبت به القای پرتوهای گاما مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذور شنبلیله توده ایرانی با شماره ثبتی 281 TF*MPISB از محل بانک بذر پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد. جهت پرتودهی گاما از یک گاماسل با منبع کبالت ۶۰ (^{60}Cobalt) در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران استفاده شد. بذور تحت سطوح مختلف پرتو گاما شامل ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری قرار گرفتند. رطوبت بذر در زمان اعمال تیمار ۱۰ درصد بود.

تهیه محیط کشت جامد و سوسپانسیون باکتری

جهت تهیه محیط کشت، ابتدا پودر محیط LB (Lysogeny broth) به حجم موردنظر رسانده شد و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. پس از خنک شدن ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین (Rifampicin) در متانول حل شده و به محیط کشت اضافه شد. تک کلون باکتری را از محیط کشت جامد برداشته و در محیط کشت LB مایع همراه با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شیکر با ۱۵۰ تا ۱۸۰ دور در دقیقه کشت شدند. بعد از ۱۶ ساعت، در سانتریفیوژ با ۴۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس محلول بالایی را حذف کرده و رسوب بجا مانده را به محیط کشت MS تغییر یافته (شامل ۶۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون (Acetosyringone)) انتقال دادیم.

القای ریشه‌های مویین

به منظور القای ریشه‌های مویین در شنبلیله از سویه ATCC15834 باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شد. سویه باکتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و محیط کشت LB مایع و در OD600= 0.4 به منظور تلقیح گیاهچه‌ها آماده شد. گیاهچه‌های دوبرگی پس از حذف ریشه‌ها از ناحیه طوقه و زخمی شدن برگ‌ها، در سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها روی کاغذ صافی به منظور حذف باقیمانده باکتری منتقل شدند. در مرحله بعد ریزنمونه های تلقیح شده به محیط کشت MS به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی منتقل شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت ریزنمونه‌ها به منظور حذف باکتری به محیط کشت MS پایه حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxime) منتقل شدند. نمونه‌های گیاهی به طور متناوب (روزانه) جهت مشاهده ریشه‌های مویین مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از آنکه

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]

رشد ریشه‌های مویین به حدود دو سانتی‌متر رسید به محیط کشت MS مایع حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند و روی شیکر با ۱۳۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی قرار گرفتند تا بعد از طی دوره کمون شروع به رشد نمایند.

بررسی وجود ژن *rolB* موجود در T-DNA در ریشه‌های مویین

به منظور آنالیز مولکولی ابتدا استخراج DNA ژنومی ریشه‌ها به روش CTAB (دویل و دویل، ۱۹۹۰) صورت گرفت [۲۸]. برای تأیید حضور قطعه T-DNA پلاسمید Ti در ریشه‌ها از آغازگرهای ژن *rolB* با توالی های ´5-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-´3 و ´5-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-´3 و به منظور اطمینان از عدم وجود *A. rhizogenes* در ریشه‌ها از آغازگرهای *virD*، با توالی‌های ´5-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-´3 و ´5-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-´3 استفاده شد. تکثیر ژن *virD* و *rolB* با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf مدل Mastercycler gradient انجام شد.

اندازه‌گیری محتوای تریگونلین

اندازه‌گیری محتوای تریگونلین و اسید نیکوتنیک از دانه های شنبلیله با استفاده از روش استرت و مایر (۱۹۹۴) انجام شد [۲۹]. ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم پودر دانه شنبلیله با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم اکسید منیزیم مخلوط شد. مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری گرم با دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت و محلول رویی صاف شد. نمونه‌ها با استفاده از یک سرنگ فیلتردار فیلتر شدند و برای تعیین محتوای تریگونلین به دستگاه HPLC تزریق شد. از دستگاه HPLC (Unicam-200) ساخت انگلستان و کروماتوگرافی مایع مجهز به ستون نوکلئوزیل C25 (قطر داخلی ۴۵ میلی‌متر، قطر ذرات ۰/۲ میکرومتر که از جنس استات سلولز می‌باشد) استفاده شد. فاز متحرک دارای آب با دمای ۳۴ درجه سلسیوس و با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود. شناسایی با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون به دست آمده از محلول استاندارد تریگونلین در طول موج ۲۶۸ نانومتر و با استفاده از آشکارساز UV انجام شد. زمان بازداری تریگونلین ۱۲/۲ دقیقه بود. قبل از انجام تجزیه و تحلیل HPLC، منحنی کالیبراسیون با استفاده از غلظت‌های مختلف تریگونلین در فازهای متحرک (۱۴/۰۹، ۱۸/۷۵، ۲۰/۳۰ و ۲۴/۴۰ میلی‌گرم/ گرم) ایجاد شد. بر اساس زمان بازداری و سطح زیر منحنی مقدار تریگونلین مجهول مشخص با استفاده از نرم‌افزار اکسل مشخص شد.

نتایج

نتایج آزمایش نشان داد که باکتری مورد استفاده موجب تولید ریشه‌های مویین در نمونه‌های تلقیح شده شد. در نمونه‌های تلقیح شده بعد از گذشت ۱۶ روز ریشه‌های مویین ظاهر شدند. نتایج حاصل از آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن های *rolB* (423 bp) و *virD* (438 bp) حضور قطعه T-DNA پلاسمید Ti در ژنوم ریشه‌های مویین را تأیید کرد که نشان‌دهنده تلقیح موفق ریشه‌های مویین بوسیله باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز بود (شکل شماره ۱).

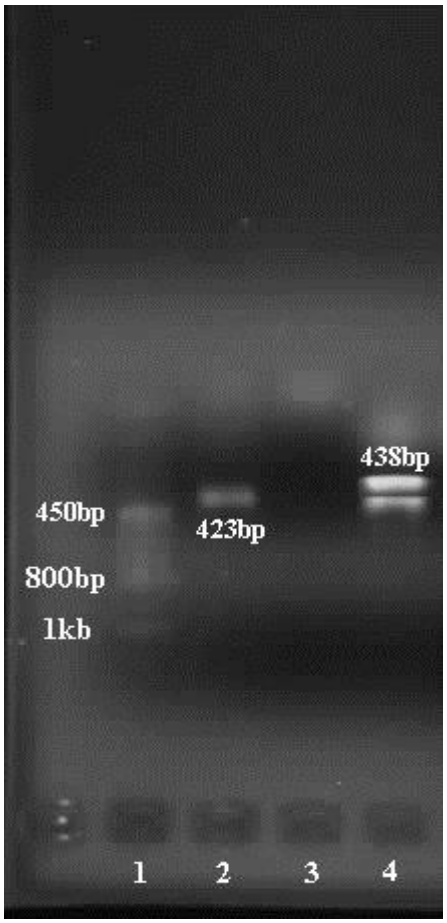
اثر دزهای مختلف پرتودهی گاما در شرایط کشت ریشه مویین

دزهای مختلف پرتوتابی بر همه صفات مورد بررسی به طور معنی‌داری تأثیر داشتند (جدول شماره ۱) که به شرح ذیل آمده است:

درصد القای ریشه مویین

مقایسه میانگین اثر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر درصد القای ریشه مویین مشخص کرد که اثر همه تیمارها به طور معنی‌داری متفاوت است. بیشترین درصد القای ریشه مویین مربوط به اثر دز ۱۰۰ گری و کمترین مقدار مربوط به اثر پرتوتابی بذور با دز ۴۰۰ گری بود.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]



شکل شماره ۱- نتایج حاصل از آزمون PCR جهت تایید حضور T-DNA پلاسمیدهای باکتریایی در ژنوم ریشه‌های مویین. (۱). نشانگر مولکولی DNA 100 bp (۲). ریشه مویین و تکثیر قطعه ژن *rolB* (۳). ریشه‌های معمولی و عدم تکثیر قطعات ژن‌های *rolB* و *virD* (۴). باکتری اگرباکتریوم سویه ACC15834 و تکثیر همزمان قطعات ژن‌های *rolB* و *virD*

جدول شماره ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده ریشه‌های نرمال و مویین شنبلیله ایرانی تحت تأثیر دزهای مختلف پرتودهی گاما

منابع تغیرات	درجه آزادی	درصد القای ریشه مویین	وزن خشک ریشه نرمال	وزن خشک ریشه مویین	محتوای تریگونلین ریشه نرمال	محتوای تریگونلین ریشه مویین
تیمار گاما	۴	۱۳۴**	۰/۰۰۶۷**	۰/۰۱۰۵**	۰/۰۴۶۴**	۰/۳۶**
اشتباه آزمایشی	۱۰	۱/۹۳	۰/۰۰۰۳۶	۰/۰۰۰۳۹	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۳۴
ضریب تغییرات (درصد)	-	۵/۰۲	۱۰/۲۶	۷/۴۲	۳/۸۵	۲/۹۴

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

وزن خشک ریشه نرمال

مقایسه میانگین‌های اثر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر وزن خشک ریشه نرمال مشخص کرد که بیشترین مقدار وزن خشک ریشه نرمال مربوط به تیمار دز ۱۰۰ گری و کمترین مقدار مربوط به پرتوتابی بذور با دز ۴۰۰ گری بود. نتایج آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار نشان داد که وزن خشک ریشه نرمال در تیمار دز ۱۰۰ گری با همه تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ولی وزن خشک ریشه نرمال در تیمار ۳۰۰ گری با ۲۰۰ گری و شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]

وزن خشک ریشه مویین

مقایسه میانگین‌های اثر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر وزن خشک ریشه مویین مشخص کرد که بیشترین مقدار وزن خشک ریشه مویین مربوط به تیمار دز ۱۰۰ گری و کمترین مقدار مربوط به پرتوتابی بذور با دز ۴۰۰ گری بود. نتایج آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار نشان داد که وزن خشک ریشه مویین در تیمار دز ۱۰۰ گری با همه تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ولی وزن خشک ریشه‌های مویین در تیمار ۳۰۰ گری با شاهد و ۴۰۰ گری با ۳۰۰ گری اختلاف معنی‌داری نداشت.

محتوای تریگونلین ریشه نرمال

مقایسه میانگین‌های اثر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر محتوای تریگونلین ریشه مویین مشخص کرد که بیشترین مقدار تریگونلین مربوط به تیمار دز ۱۰۰ گری و کمترین مقدار مربوط به پرتوتابی بذور با دز ۴۰۰ گری بود. بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار، همه تیمارها با هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند.

محتوای تریگونلین ریشه مویین

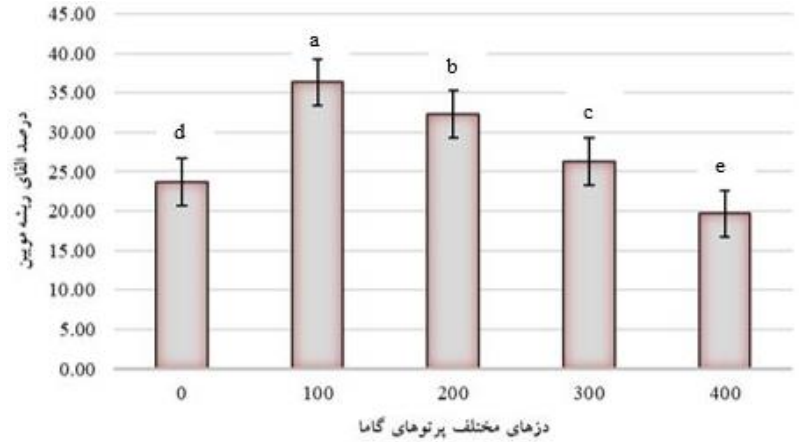
مقایسه میانگین‌های اثر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر محتوای تریگونلین ریشه مویین مشخص کرد که بیشترین مقدار تریگونلین مربوط به تیمار دز ۱۰۰ گری و کمترین مقدار مربوط به پرتوتابی بذور با دز ۴۰۰ گری بود. بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار، همه تیمارها با هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند.

بحث

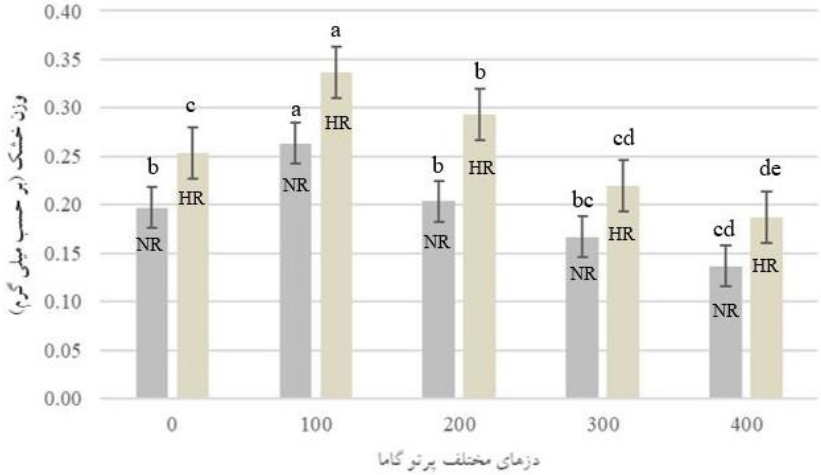
دزهای مختلف پرتو گاما با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و مولکولی، باعث القای درصد متفاوتی از ریشه‌های مویین در شنبلیله می‌شوند [۳۱، ۳۰]. با توجه به نتایج، دز پایین پرتودهی بیشتر اثر تحریک‌کنندگی داشته‌اند و باعث افزایش تکثیر سلولی، رشد و تولید متابولیت‌های دارویی شده‌اند (شکل شماره ۲). همچنین افزایش دز پرتودهی، اثر بازدارنگی داشته و باعث کاهش مقادیر این صفات شده است. با توجه به نتایج حاصل از مقایسه وزن خشک ریشه نرمال و مویین (شکل شماره ۳) می‌توان گفت مقدار وزن خشک ریشه نرمال و مویین تحت اثر دزهای پایین پرتوهای گاما (در شرایط نرمال و ریشه مویین) افزایش پیدا کرده است ولی دزهای بالا اثر بازدارندگی داشته است. این نتایج، با مطالعات دیگران (چارباجی و نابورسی، ۱۹۹۹؛ چونگ و همکاران، ۲۰۰۶؛ فولزل و همکاران، ۲۰۱۵) که اثر تحریک‌کنندگی دزهای پایین را گزارش کردند، مطابقت دارد. همچنین ریشه‌های نرمال در مقایسه با ریشه‌های مویین عملکرد کمتری داشتند. در واقع ریشه‌های مویین به دلیل درج شدن قطعه T-DNA از پلاسمید Ri قابلیت تقسیم و رشد سریع را بدون حضور تنظیم‌کننده‌های رشد کسب نموده‌اند و توانایی رشد نامحدود خود را در کشت های متوالی حفظ می‌کنند [۳۵]. این خود باعث افزایش بیوماس ریشه مویین به نسبت ریشه نرمال شده‌است. جان و همکاران (۲۰۱۲) نیز در گیاه دارویی بابچی (*Psoralea corylifolia*) نشان دادند که استفاده از دزهای پایین پرتو گاما باعث بهبود صفات رویشی (بیوماس) می‌شود. همچنین بیان کردند که پرتوهای گاما باعث ایجاد تغییرات در ژنوم گیاهان در درازمدت خواهند شد [۳۶].

طی سال‌های اخیرکشت ریشه‌های مویین به منظور تولید متابولیت‌های با ارزش در تعدادی از گونه‌های گیاهان دارویی درمقیاس تجاری صورت گرفته است [۱۳]. با مقایسه‌ی نتایج حاصل از محتوای تریگونلین ریشه نرمال و مویین (شکل شماره ۴) مشخص می‌شود. میزان هر دو مقدار محتوای تریگونلین ریشه (در شرایط نرمال و ریشه مویین) در دزهای پایین پرتوهای گاما افزایش پیدا کرده است ولی دزهای بالا اثر بازدارندگی داشته است. که این یافته‌ها موید نتایج احمد و همکاران (۲۰۰۰) و ال-بلتاقی و همکاران (۲۰۱۱) است [۳۸، ۳۷].

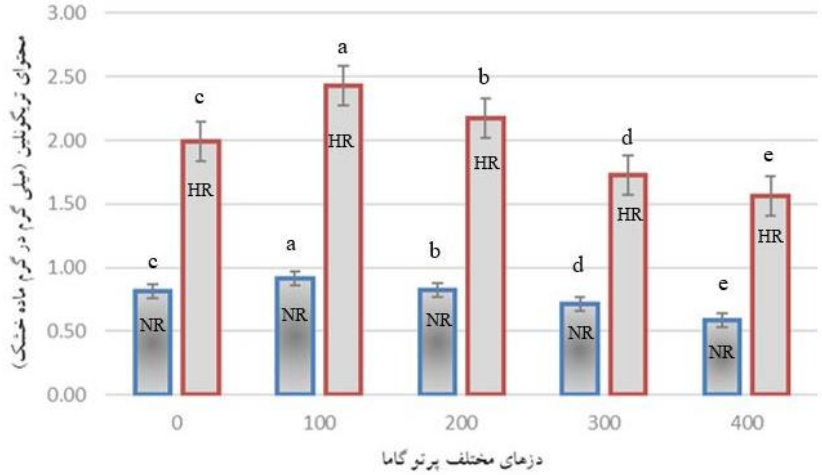
[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]



شکل شماره ۲- مقایسه میانگین اثر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر درصد القای ریشه مویین بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح آماری ۵ درصد



شکل شماره ۳- مقایسه میانگین اثر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر مقدار ماده خشک ریشه‌های معمولی و نرمال بر حسب میلی‌گرم بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح آماری ۵ درصد. علائم اختصاری NR برای ریشه‌های معمولی و HR برای ریشه‌های مویین می‌باشد.



شکل شماره ۴- مقایسه میانگین اثر دزهای مختلف پرتوهای گاما بر محتوای تریگونلین در ریشه‌های معمولی و نرمال بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح آماری ۵ درصد. علائم اختصاری NR برای ریشه‌های معمولی و HR برای ریشه‌های مویین

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]

همچنین در مقایسه محتوای تریگونلین ریشه نرمال و مویین می‌توان اشاره کرد این که ریشه‌های مویین عملکرد چند برابری در مقایسه با ریشه‌های نرمال داشتند و مقدار تریگونلین در دزهای پرتودهی (۰)، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری به ترتیب میزان تریگونلین ۲/۴۶، ۲/۶۷، ۲/۶۶، ۲/۴۴ و ۲/۶۴ برابر افزایش یافته‌است. نتایج نشان داد محتوای تریگونلین در پرتودهی دز ۱۰۰ گری در شرایط ریشه مویین نسبت به تیمار شاهد در شرایط ریشه نرمال سه برابر افزایش یافته است که قابل توجه می‌باشد. این نتایج با با یافته‌های ژانگ و همکاران (۲۰۱۱) و کیم و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی اثر پرتوهای گاما در کشت ریشه مویین گیاه جنسینگ مطابقت دارد [۳۹، ۲۷].

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج نشان داد که بیشترین مقادیر صفات مورد مطالعه مربوط به دز ۱۰۰ گری و کمترین مقادیر مربوط به پرتوتابی بذور با دز ۴۰۰ گری بود که علت می‌تواند به خاطر اثر تحریک‌کنندگی دزهای پایین پرتودهی مانند افزایش تکثیر سلولی، رشد و فعالیت آنزیمی و همچنین اثر بازدارنگی دزهای بالاتر به دلیل تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از پرتو گاما جهت القای جهش در برنامه‌های اصلاحی گیاه شنبلیله، می‌تواند نقش مؤثری در افزایش عملکرد دانه و متابولیت‌های ثانویه داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی انجام شده است.

منابع

1. Thomas JE, Bandara M, Lee EL, Driedger D and Acharya S. Biochemical monitoring in fenugreek to develop functional food and medicinal plant variants. *New Biotechnol*. 2011; 28: 110 - 7.

2. Raju J, Patlolla JM, Swamy MV and Rao CV. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2004; 8: 1392 - 8.

3. Aswar U, Bodhankar SL, Mohan V and Thakurdesai PA. Effect of furostanol glycosides from *Trigonella foenum-graecum* on the reproductive system of male albino rats. *Phytother. Res*. 2010; 24: 1482 - 8.

4. Mahmoud NY, Salem RH and Mater AA. Nutritional and biological assessment of wheat biscuits supplemented by fenugreek plant to improve diet of anemic rats. *J. Acad. Nutr. Diet*. 2012; 1: 1 - 9.

5. Piao CH, Bui TT, Song CH, Shin HS, Shon DH and Chai OH. *Trigonella foenum-graecum* alleviates airway inflammation of allergic asthma in ovalbumin-induced mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2017; 482: 1284 - 8.

6. Jiang W, Gao L, Li P, Kan H, Qu J, Men L, Liu Z and Liu Z. Metabonomics study of the therapeutic mechanism of fenugreekgalactomannan on diabetic hyperglycemia in rats, byultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupoletime-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2017; 1044 - 5: 8 - 16.

7. Al-Habori M and Raman A. Pharmacological properties. In: Petropoulos G (ed) Fenugreek-the genus Trigonella. Taylor & Francis, London. 2002, pp: 162-82.

8. Aasim M, Khawar KM, Yalcin G and Bakhsh A. Current trends ın fenugreek bıotechnology and approaches towards its improvement. *AJSIH*. 2014; 4: 127-36.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]

9. Shahabzadeh Z, Bahram H and Faramarzi Hafez R. Induction of Transgenic Hairy Roots in *Trigonella foenumgraceum* Co-cultivated with Agrobacterium rhizogenes harboring a GFP Gene. *J. Crop Sci. Biotechnol*. 2013; 16 (4): 263 - 8.

10. Cao D, Hou W, Song S, Sun H, Cao Y and Han T. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2009; 96: 45 - 52.

11. Giri A, Ravindra ST, Dhingra V and Narasu L. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Sci*. 2001; 81: 378 -82.

12. Veena V and Taylor GG. Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 2007; 433: 384 - 403.

13. 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.

14. Vrishali VK, Snehal SD and Neha A. Gurave Hairy Root Culture: A Promising Approach in Biotransformation. *Asian J. Plant Sci. Res.* 2016; 6 (4): 6 - 11.

15. Eapen S and Mitra R. Plant Hairy Root Cultures: Prospects and Limitations. *Indian Natl. Sci. Acad*. 2001; 3 (4): 107-20.

16. Lee HB, Kim Y, Jin HZ, Lee JJ, Kim CJ, Park JY and Jung HS. A new Hypocrea strain producing harzianum A cytotoxic to tumour cell lines. *Lett. Appl. Microbiol*. 2005; 40: 497-503.

17. Hu ZhD and Du M. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *J. Integr. Plant Biol.* 2006; 48 (2): 121−7.

18. Datta P, Dasgupta A, Kumar Singh A, Mukherjee P, Kundu M and Basu J. Interaction between FtsW and penicillin-binding protein 3 (PBP3) directs PBP3 to mid-cell, controls cell septation and mediates the formation of a trimeric complex involving FtsZ, FtsW and PBP3 in mycobacteria. Mol. *Microbiol.* 2006; 62 (6), 1655-73.

19. Agrawal RS, Shirale DO, Syed HM and Syed AAR. Physico-chemical properties of fenugreek (*Trigonella foenum - graceum* L.) seeds. *IJLTEMAS*. 2015; 1 - 3.

20. Yaqoob M and Rashid A. Induced mutation studies in some mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek cultivars. *J. Biol. Sci*. 2001; 1: 805 - 8.

21. Sharma RP and Chopra VL. Plant Breeding-Theory and Practice. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi. 2000, pp: 321-42.

22. Ghasemi Bezdi K and Ahmadi A. Cell and tissue culture biotechnology (in micropropagation and plant breeding. Makhtomgoli Faraghi. 2010; pp: 254.

23. Bayro MJ, Debelouchina GT, Eddy MT, Birkett NR, MacPhee CE, Rosay M, Maas WE, Dobson CM and Griffin RG. Intermolecular structure determination of amyloid fibrils with magic-angle spinning and dynamic nuclear polarization NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133 (35): 13967 – 74.

24. Jain SM. Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Rom. Biotechnol. Lett*. 2010; 15 (2): 88-106.

25. Jain SC and Agrawal M. Effect of mutagens on steroidal sapogenin in *Trigonella foenumgraecum* tissue cultures. *Fitoterapia* 1994; 65 (4): 367 - 75.

26. Topuz A and Ozdemir F. Influences of gamma irradiation and storage on the capsaicinoids of sun-dried and dehydrated paprika. *Food Chem.* 2004; 86: 509 – 15.

27. Kim DS, Song M, Kim SH, Jang DS, Kim JB, Ha BK, Kim SH, Lee KJ, Kang SY, Jeong IY. The improvement of ginsenoside accumulation on *Panax ginseng* as a result of g-irradiation. *J. Ginseng Res.* 2013; 37 (3): 332 - 40.

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

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]

29. Stennert A and Gerhard Maier H. Trigonelline in coffee. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1994; 199: 198-200.

30. Khater MA, El-Awadi ME, Elashtokhy MMA, Abdel-Baky YR and Shalaby MAF. Physiological and molecular changes in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a response to gamma rays. *Int. J. Pharmtech Res*. 2016; 9 (12): 306 - 16.

31. Hanafy RS and Akladious SA. Physiological and molecular studies on the effect of gamma radiation in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) plants. *J. Genet. Biotechnol*. 2018; 1-10.

32. Charbaji T and Nabulsi I. Effect of Low Doses of Gamma Irradiation on in Vitro Growth of Grapevine. *PCTOC*. 1999; 57: 129 - 32.

33. Chung HJ, Kim MJ, Lim JY, Park SM, Cha BJ, Kim YH, Yang MS and Kim DH. A gene encoding phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from Cryphonectria parasitica modulates the lac1 expression. *Fungal Genet. Biol.* 2006; 43 (5): 326 - 36.

34. Fulzele DP, Satdive RK, Kamble S, Singh S and Singh S. Improvement of anticancer drug camptothecin production by gamma irradiation on callus Cultures of Nothapodytes foetida. *IJPRAS*. 2015; 4 (1): 19 - 27.

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

36. Jan S, Parween T, Siddiqi TO and Mahmooduzzafar. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environ. Rev.* 2012; 20: 17 - 39.

37. Ahmed FA, Ghanem SA, Reda AA and Solaiman M. Effect of some growth regulators and subcultures on callus proliferation and trigonelline content of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *Bulletin of the National Research Centre*. 2000; 25: 35 - 46.

38. El-Beltagi HS, Ahmed OK and El-Desouky W. Effect of low doses g-irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiat. Phys. Chem.* 2011; 80 (9): 968 - 76.

39. Zhang JY, Bae TW, Boo KH, Sun HJ, Song IJ, Pham CH, Ganesan M, Yang DH, Kang HK, Riu KZ, Lim PO and Lee HY. Ginsenoside production and morphological characterization of wild ginseng (Panax ginseng Meyer) mutant lines induced by g-irradiation (60 co) of adventitious roots. *J. Ginseng Res*. 2011; 35 (3): 283 - 93.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]

[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]

Effect of Gamma Irradiation on Growth and Trigonelline Content in Hairy Root of Iranian Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

Ashrafi Parchin R (Ph.D. Student)[1], Nasrollah Nezhad Ghomi AA (Ph.D.)[1], Naghdi Badi H (Ph.D.)[2], Eskandari A (Ph.D.)[3], Navabpour S (Ph.D.)[1], Mehrafarin A (Ph.D.)[2]

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Medicinal Plants Research Centre, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
3- Nuclear Agriculture Research School- Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj. Iran
*Corresponding author: Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
Tel & Fax: +98-17-32437618
Email: nasrollahnejad@gau.ac.ir

Abstract

Background: Fenugreek is a valuable medicinal plant and it is essential to investigate induction of mutations in order to increase its active ingredient.

Objectives: In this study, the phytochemical and growth traits in hairy and normal roots of Fenugreek in response to gamma irradiation were evaluated.

Method: In this study, gamma irradiation was applied to Iranian Fenugreek seeds in five doses (0, 100, 200, 300 and 400 Gy), and then the irradiation effects in root hair culture conditions in a completely randomized design (CRD) with three replications were evaluated. In order to induce hairy roots in fenugreek, ATCC15834 strain of Agrobacterium rhizogenesis was used.

Results: The results showed that the different irradiation doses had a significant effect on all traits in normal and hairy roots. The comparison of mean of data showed that the highest values of traits were related to 100 Gy and the lowest values of traits related to irradiation of seeds with 400 Gy doses. The trigonelline content was significantly higher in hairy roots than normal roots, so that the amount of trigonelline of hairy roots at different treatments including 0, 100, 200, 300 and 400 Gy were 2.46, 2.67, 2.66, 2.44 and 2.64 times more than normal roots, respectively.

Conclusion: The results indicated that the cell proliferation, growth and amount of trigonelline were increased due to the stimulating effect of low doses of gamma irradiations.

Keywords: *Trigonella foenum-graecum* L, Hairy root, Gamma irradiation, Mutation, Trigonelline content

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2019.18.72.38.5]
[DOI: 10.29252/jmp.4.72.160]