

افزایش تولید تری گونلین تحت تاثیر سالیسیلیک اسید در کشت سلولی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*)صدیقه اسمعیل زاده بهابادی Ph.D.^۱، آیت اله رضایی نودهی Ph.D.^۲

۱- دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، زابل، ایران

۲- دانشگاه شاهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: shirin_esm@yahoo.com و esmaeilzadeh@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۶

چکیده

هدف: دست‌ورزی محیط‌های کشت سلولی با الیسیتورها یکی از راه کارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانوی و تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌باشد. سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک الیسیتور غیر زیستی در افزایش تولید متابولیت‌های دارویی موثر است. هدف این مطالعه بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر رشد، برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک و تولید تری گونلین در کشت سلولی شنبلیله است.

مواد و روش‌ها: کشت سلولی از قطعات جداکشت هیپوکوتیل شنبلیله روی محیط کشت جامد MS دارای نفتالن استیک اسید (۰/۴ میلی گرم در لیتر) و بنزیل آدنین (۰/۴ میلی گرم در لیتر) به‌دست آمد. سالیسیلیک اسید با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. سپس واکنش سلول‌ها در ارتباط با تولید تری گونلین و دیگر شاخص‌های فیزیولوژیک پس از گذشت یک هفته از اعمال تیمار بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که رشد سلولی و زنده مانی سلول‌ها تحت اثر تیمارها نسبت به شاهد کاهش یافته است. مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلول‌ها نسبت به شاهد تحت اثر تیمارها افزایش یافت. کلیه تیمارها باعث افزایش تولید تری گونلین و فنل کل شدند. تیمار سلول‌ها با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان تری گونلین به‌میزان دو برابر شاهد شد.

نتیجه گیری: سالیسیلیک اسید می‌تواند به‌عنوان محرک در کشت سلولی شنبلیله به‌کار رود و باعث القای تولید بیشتر تری گونلین شود.

واژگان کلیدی: تری گونلین، سالیسیلیک اسید، شنبلیله

مقدمه

شنبليله (*Trigonella foenum-graecum*) گیاهی از تیره بقولات (Fabaceae) است که بومی ایران بوده، در بیشتر نواحی ایران از جمله آذربایجان، اصفهان، فارس، خراسان، سمنان و دامغان می‌روید و به‌عنوان سبزی خوراکی کشت و مصرف می‌شود. شنبليله دارای خواص ضد دیابتی، ضد سرطان، ضد میکروبی و کاهنده قندخون می‌باشد (۱). خواص دارویی شنبليله به دلیل وجود ترکیبات استروئیدی، ترکیبات نیتروژن دار، پلی فنل، ترکیبات فرار، آمینو اسید و... موجود در آن می‌باشد (۲). دانه‌های شنبليله دارای ۴۵ تا ۶۰ درصد قند، ۲۰ تا ۳۰ پروتئین، ۵ تا ۱۰ درصد لیپید، آلکالوئید تری گونلین (۰/۲ تا ۰/۳ درصد)، آمینو اسیدهای آزاد و روغن‌های فرار می‌باشد (۳ و ۴). به‌طور کلی، شنبليله دارای دو ترکیب شیمیایی مهم با خواص دارویی است: (۱) دیوسجنین، یک ترکیب ساپونین استروئیدی و (۲) تری گونلین، یک ترکیب آلکالوئیدی. دیوسجنین و تری گونلین در دانه‌ها و برگ‌های شنبليله دارای خواص ضد دیابتی و هایپوگلیسمیک است. تری گونلین یا N-متیل نیکوتینیک اسید، متابولیت ثانوی 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 (۴). علاوه بر این به‌عنوان یک هورمون در کنترل چرخه سلولی عمل می‌کند. این ترکیب اولین بار از *Trigonella foenum-graecum* استخراج شد (۵) و بعدها در بسیاری از گیاهان مانند قهوه، سویا، سیب زمینی، نخود فرنگی شناسایی شد (۶). با توجه به اهمیت دارویی این ترکیب و افزایش تقاضا، تولید بیشتر آن حائز اهمیت می‌باشد. یکی از روش‌هایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگر در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت و سلول گیاهی است (۱). پژوهش‌گران با استفاده از این روش سعی کرده‌اند تا تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش در گیاهان را افزایش دهند. در کشت بافت می‌توان متابولیت‌هایی مانند آلکالوئیدها را مستقل از عواملی مثل آب و هوا و شرایط جغرافیایی تولید نمود. به‌طور خاص کشت تعلیقی سلول‌های گیاهی هم‌گام با افزایش سرعت رشد آن‌ها سبب افزایش انباشتگی متابولیت‌های مورد نظر در یک دوره زمانی کوتاه می‌گردد (۷). در کشت کالوس گیاه شنبليله *Trigonella foenum-graecum* میزان آلکالوئید تری گونلین به‌میزان ۳ تا ۴ برابر بیشتر از میزان موجود در

دانه‌های این گیاه و همچنین ۱۲ تا ۱۳ برابر بیشتر از میزان تولید شده در ریشه و اندام هوایی آن گزارش شده است (۸). علاوه بر این، میزان بالاتر این آلکالوئید در کشت سلول این گیاه گزارش شده است (۸). روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت سلول استفاده می‌شود (۹). یکی از روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی در کشت درشیشه (*in vitro*) استفاده از ایستتورها می‌باشد. ایستتورها ترکیباتی با منشا زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند (۱۰). ایستتورهای غیر زیستی مانند اشعه ماوراءبنفش، نمک فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی مانند جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید نیز به‌منظور افزایش تولید این ترکیبات در کشت بافت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. ترکیباتی مانند سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید از مولکول‌های تاثیرگذار در مسیر علامت‌رسانی تنش‌ها می‌باشند و به‌طور گسترده‌ای در این زمینه روی آن‌ها مطالعه شده است (۱۱). نقش سالیسیلیک اسید بر بردباری گیاه نسبت به بیماری‌زها و سایر عوامل تنش‌زا به‌خوبی شناخته شده است. به تازگی نقش آن به‌عنوان یک ترکیب پیام‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاهان پررنگ‌تر شده است (۱۱). به‌علت نقشی که سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک محرک دارد و باعث افزایش بیان ژن‌های مسیره‌های بیوسنتزی متابولیت‌های ثانوی می‌شود، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (۱۲). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سالیسیلیک اسید در تحریک تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانوی همچون ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها موثر می‌باشد (۱۳). جستجو در منابع نشان می‌دهد که تاکنون مطالعاتی درباره اثر سالیسیلیک اسید بر میزان متابولیت‌های ثانوی در کشت سلولی *Trigonella foenum-graecum* صورت نگرفته است. در این پژوهش اثر سالیسیلیک اسید بر رشد سلول و میزان تری گونلین و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در کشت سلولی شنبليله بررسی شد. میزان ترکیبات فنلی دارای مسیر بیوسنتزی مشترک با تری گونلین که نقش دفاعی نیز دارند، مورد بررسی قرار گرفت تا ارتباط مسیرهای متابولیسمی گیاه مشخص شود.

مواد و روش‌ها

القای تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی: برای

القای کالوس مناسب، از هیپوکوتیل گیاهچه‌های شنبليله

مشاهده گردید. سلول‌هایی که کاملاً به رنگ آبی در آمده بودند و سلول‌هایی که فقط دیواره آن‌ها رنگ آبی به خود گرفته بود به ترتیب سلول‌های مرده و زنده در نظر گرفته شد. با شمارش سلول‌های زنده و مرده و محاسبه کل آن‌ها درصد توان زیستی سلول‌ها تعیین گردید.

تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها: مقدار مالون دی آلدیید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به روش De Vos و همکاران (۱۵) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۲۰۰ میلی گرم از سلول‌های منجمد با سه میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۱۰ درصد سائیده شد. پس از همگن سازی نمونه‌ها، سانتریفوژ (۱۲۰۰۰rpm)، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به یک میلی لیتر از نمونه‌های صاف شده، یک میلی لیتر تیو باربیتوریک اسید ۰/۲۵ درصد اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از قرار دادن نمونه‌ها در حمام یخ، در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر جذب آن‌ها اندازه‌گیری گردید. مقدار MDA به کمک ضریب خاموشی 155 mM/cm محاسبه گردید.

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس روش (۱۶) سنجیده شد. بدین منظور ۲۰۰ میلی گرم توده سلولی منجمد با ۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید سائیده شد. نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (۱۲۰۰۰rpm)، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به ۰/۵ میلی لیتر از روشن‌آور، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰ میلی مولار، $\text{pH} = 7$) و یک میلی لیتر یدید پتاسیم (KI) اضافه شد و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر یادداشت شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان فنل کل: میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتیو (۱۷) و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۰۵ گرم از سلول‌های منجمد در ۳ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد همگن گردید و به مدت ۳ ساعت در بن ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و عصاره متانولی از رسوب جدا شد. به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۵۰ میکرولیتر محلول فولین-سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل پس از ۵ دقیقه

به عنوان قطعات جدا کشت استفاده گردید. قطعات جدا کشت به محیط کشت MS پایه، حاوی NAA (۰/۴ میلی گرم در لیتر) و BA (۰/۴ میلی گرم در لیتر) منتقل شدند. پس از گذشت ۲ هفته القای کالوس شروع شد. برای تهیه کشت تعلیقی ۲ گرم کالوس نرم، سفید و هم سن، به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی یاد شده بدون آگار اضافه شد و روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد و هر دو هفته یکبار واگشت گردید.

تیمار سلول‌ها با سالیسیلیک اسید: برای انجام این مرحله از تحقیق، ابتدا به منظور ایجاد یک کشت همگن و یکنواخت، کشت سلولی تهیه شده در مرحله قبل، چندین بار واگشت شد. در هر مرحله سلول‌ها با استفاده از قیف بوختر و در شرایط مکش جمع آوری شدند و به محیط تازه منتقل گردیدند. قبل از اعمال تیمار، دوره رشد برای سلول‌ها تعیین گردید. بدین منظور پس از انتقال یاخته‌ها به محیط جدید از روز اول تا ۲۳ روز پس از انتقال، به فاصله زمانی دو روز، نمونه برداری انجام و بر اساس وزن تر سلول‌ها، منحنی رشد تعیین گردید. با توجه به منحنی رشد به دست آمده، در روز چهاردهم سلول‌ها به طور جداگانه با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید تیمار شدند. واکنش سلول‌ها در ارتباط با تولید تری گونلین، ترکیبات فنلی، مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی پس از گذشت یک هفته از اعمال تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که سلول‌ها پس از برداشت توسط ازت مایع منجمد شده، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیک نگهداری شدند.

اندازه‌گیری رشد سلولی و تعیین توان زیستی سلول‌ها:

رشد سلولی با اندازه‌گیری افزایش وزن خشک آن‌ها تعیین شد. بدین منظور سلول‌ها از محیط کشت جدا شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توزین گردیدند. برای تعیین توان زیستی، از اوانس بلو (Evans blue) استفاده شد (۱۴). بدین صورت که در زمان برداشت سلول‌ها، یک قطره از کشت تعلیقی حاوی سلول بر روی لام قرار داده شد، سپس یک قطره از محلول آبی اوانس بلو (۰/۱ درصد) به آن اضافه شد و پس از گذشت سه الی چهار دقیقه با آب مقطر شسته شد و در زیر میکروسکوپ نوری

۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۷ درصد اضافه و جذب پس از ۱۰ دقیقه در طول موج ۲۶۵ نانومتر خوانده شد.

استخراج و اندازه گیری تری گونلین: کالوس‌های برداشت شده پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه برای سنجش میزان ماده موثره تری گونلین استفاده شدند. ۰/۲ گرم از سلول‌های خشک، پودر شده و با ۱۰ میلی لیتر متانول توسط حمام اولتراسونیک به مدت نیم ساعت سونیکت شدند. سپس مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت جدا و تبخیر گردید و ماده خشک باقیمانده در ۲ میلی لیتر متانول حل شد و در یخچال در دمای حدوداً ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تعیین مقدار تری گونلین از روش Rongjie و همکاران (۱۸) به کمک دستگاه HPLC (Knauer, Germany) با دکتور UV استفاده شد. ستون مورد استفاده (C18, 25 Cm) (x 4.6 mm I.D., 5 μm)، فاز متحرک استونیتریل: آب (۱۰:۹۰) با شارش ۱ میلی لیتر در دقیقه و طول موج مورد استفاده ۲۶۳ نانومتر بود. شناسایی و اندازه گیری تری گونلین به کمک مقایسه زمان بازداری نمونه‌ها با ماده استاندارد (سیگما) صورت گرفت.

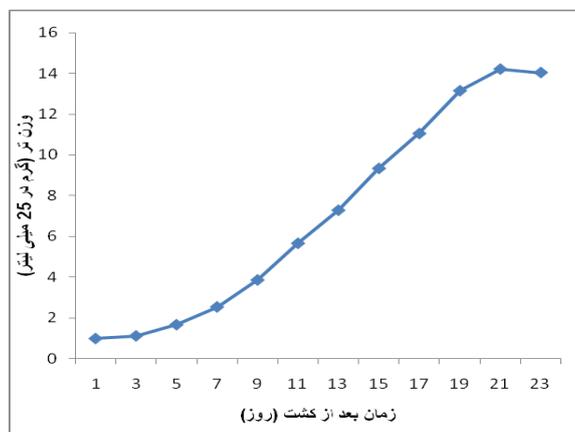
تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها با ۳ تکرار از حداقل ۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون دانکن برای تعیین معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

تعیین منحنی رشد سلول

پیش از اعمال تیمار مورد نظر، میزان رشد سلول‌ها در مدت ۲۳ روز در کشت تعلیقی بررسی شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که پس از کشت، میزان سلول‌ها افزایش یافته، که این روند تا روز نهم ادامه دارد. پس از این زمان وزن کاهش می یابد. شیب رشد یاخته ای در روز چهاردهم افزایشی بود که در این زمان سلول‌ها در اواسط دوره نمایی رشد بوده، به شدت در حال تقسیم هستند. در این زمان حجم توده سلولی به میزان مناسبی رسیده، بنابراین روز چهاردهم به عنوان زمان افزودن تیمار انتخاب گردید.

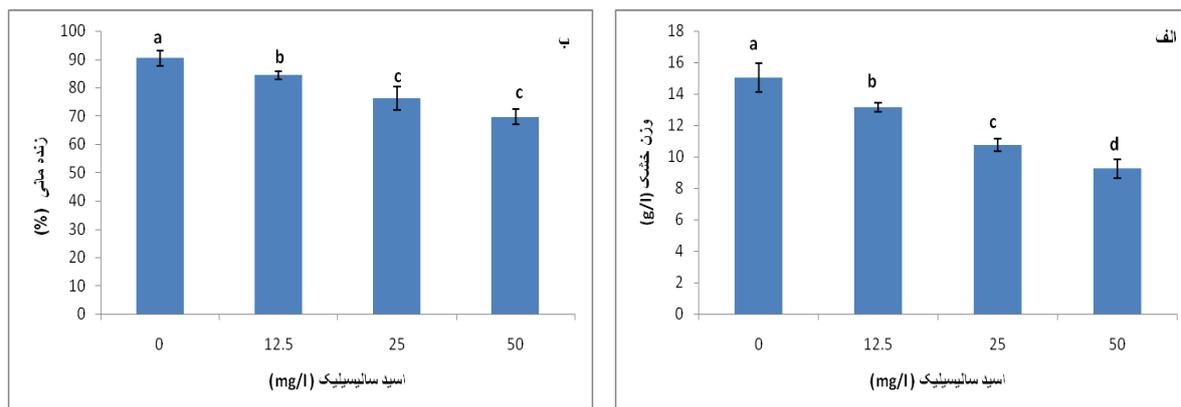


شکل ۱: منحنی رشد سلولی در کشت سلولی شنبلیله در محیط کشت MS.

به طوری که غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر میزان رشد را به میزان ۴۰ درصد کاهش داد. زنده مانی سلول‌ها در تمامی غلظت‌ها به طور معنی داری کمتر از نمونه‌های شاهد بود. تفاوت معنی داری بین غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده نشد. بیشترین میزان کاهش زنده مانی سلول‌ها در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر به میزان ۲۲ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد مشاهده شد.

اثر سالیسیلیک اسید بر رشد و توان زیستی سلول‌ها

اثر سالیسیلیک اسید روی رشد و زنده مانی سلول‌های شنبلیله در شکل‌های ۲، الف و ۲، ب نشان داده شده است. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید به طور معنی داری (در سطح $p \leq 0.05$) رشد سلولی را کاهش داد. با افزایش غلظت، رشد کاهش بیشتری نشان داد.

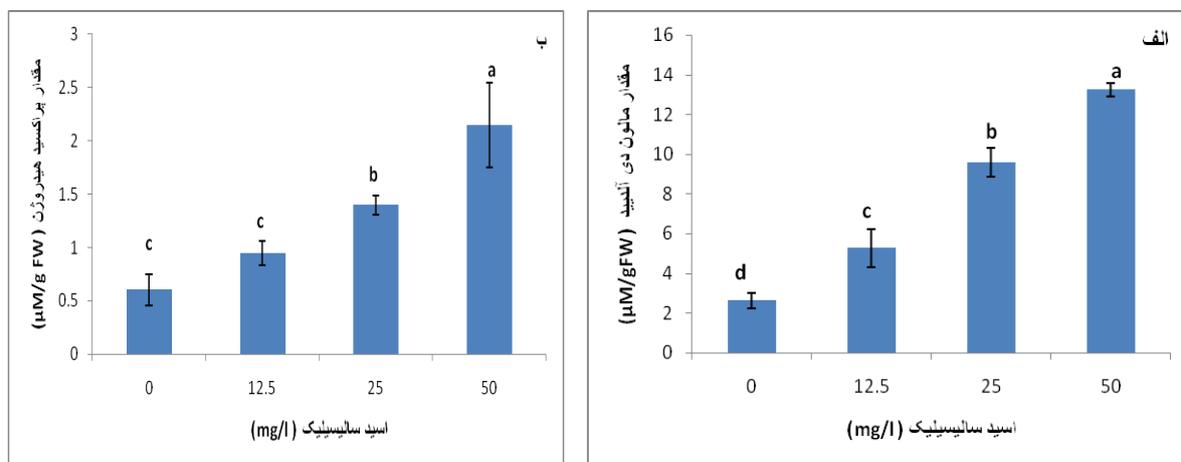


شکل ۲: اثر سالیسیلیک اسید روی الف) وزن خشک و ب) زنده مانی در کشت سلولی شنبليله. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و $\pm SE$ (انحراف معیار) می باشد. میانگین های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

همانطوری که شکل ۳، ب نشان می دهد غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر باعث افزایش معنی دار (در سطح $p \leq 0.05$) مقدار پراکسید هیدروژن سلول های شنبليله در مقایسه با شاهد گردیده است. تفاوت معنی داری در نمونه های شاهد و غلظت ۱۲/۵ میلی گرم مشاهده نشد.

اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها

مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی که به عنوان شاخصی از تنش می باشد، نیز تحت تاثیر کلیه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان داد (شکل ۳، الف). بیشترین مقدار این پارامتر در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد.



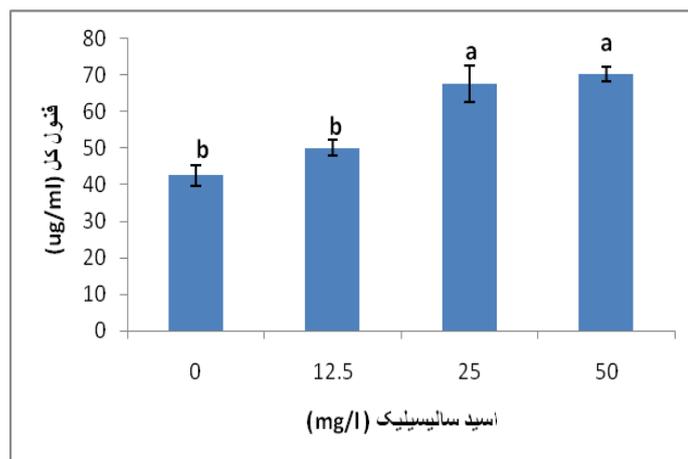
شکل ۳: اثر سالیسیلیک اسید روی الف) مقدار مالون دی آلدیید، ب) مقدار پراکسید هیدروژن در کشت سلولی شنبليله. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و $\pm SE$ (انحراف معیار) می باشد. میانگین های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان تری گونلین

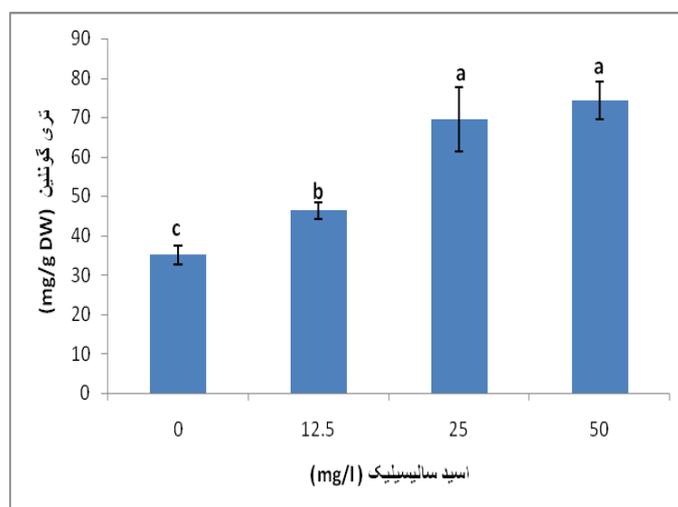
نتایج بررسی تری گونلین نشان داد که غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید میزان تری گونلین را به طور معنی داری به میزان ۲ برابر، نمونه های شاهد افزایش داد. میزان تری گونلین در غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر لیتر نیز به طور معنی داری افزایش یافت که البته قابل توجه نبود (شکل ۵).

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فنل کل

میزان فنل کل در تیمارها به استثنای غلظت ۱۲/۵ میلی گرم به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت. تفاوت معنی داری در میزان فنل کل در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده نشد (شکل ۴).



شکل ۴: اثر سالیسیلیک اسید روی میزان فنل کل. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و $\pm SE$ (انحراف معیار) می باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.



شکل ۵: اثر سالیسیلیک اسید بر میزان تری گونلین. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و $\pm SE$ (انحراف معیار) می باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

بحث

رشد و کاهش زنده مانی، در نتیجه زوال تمامیت سلولی و تخریب غشاهای سلولی است که توسط سالیسیلیک اسید القا می شود. در پژوهش حاضر، رشد و زنده مانی سلول‌ها تحت تاثیر غلظت‌های مورد استفاده در این پژوهش به طور معنی داری کاهش یافت. با توجه به رابطه معکوس بین رشد یا تولید زیستوده و تجمع متابولیت‌های ثانوی، مهار رشد سلولی توسط سالیسیلیک اسید ممکن است که سنتر متابولیت‌های ثانوی را القا نماید. با توجه به نتایج به دست آمده، مهار رشد سلول‌ها توسط سالیسیلیک اسید، منجر به تولید بیشتر تری گونلین گردید (شکل ۵)، که به نظر می رسد به دلیل کاهش متابولیسم اولیه و آغاز متابولیسم ثانوی باشد. با توجه به این که پیش

مطالعات متعددی نشان داده اند که سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان برخی از متابولیت‌های ثانوی به ویژه آنهایی که در ساز و کارهای دفاعی گیاه نقش دارند، می شود (۱۹). در پژوهش حاضر، اثر سالیسیلیک اسید بر رشد سلول و میزان تری گونلین و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک بررسی شد. تاثیر سالیسیلیک اسید به عواملی نظیر گونه، مرحله نموی گیاه، نحوه اعمال تیمار و غلظت آن وابسته می باشد. اسید سالیسیلیک در غلظت‌های بالاتر وضعیت اکسایشی گیاه را بیش از حد توان گیاه تحت تاثیر قرار می دهد و در نهایت منجر به مرگ گیاه می شود (۲۰). مهار

نتیجه گیری

در این پژوهش نشان داده شد که سالیسیلیک اسید می تواند به عنوان محرک در کشت سلولی شنبلیله عمل نموده و باعث القای تولید بیشتر تری گونلین شود. بنابراین به نظر می رسد تجمع تری گونلین در سلول های شنبلیله پاسخی زیستی به این محرک باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل که هزینه این طرح پژوهشی را فراهم نموده اند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

- Mehrafarin A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi H, Noormohammadi Gh, et al. A Review on Biology, Cultivation and Biotechnology of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a Valuable Medicinal Plant and Multipurpose. J Medicinal plants. 2011; 10(37): 1-19.
- Fazli F, Hardman R. The spice, fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): It commercial varieties of seed as a source of diosgenin. Tropical Sciences. 1968; 10: 66-78.
- Hardman R. Pharmaceutical products from plant steroids. Tropical Sciences. 1969; 11: 196 – 222.
- Mehrafarin A, Qaderi A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi H, et al. Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). J Medicinal plants. 2010; 9: 1 – 18.
- Johns E. Ueber die alkaloides des bockshornsamens. Ber Deut Chem Ges. 1885; 18: 2518 - 23.
- Zheng XQ, Nagai C, Ashihara H. Pyridine nucleotide cycle and trigonelline (N-methylnicotinic acid) synthesis in developing leaves and fruits of *Coffea arabica*. Physiol Plant. 2004; 122: 401 - 11.
- Petropoulos, G. Fenugreek. The genus *Trigonella*. London and New York: Taylor and Francis; 2002.
- Radwan SS, 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.
- Verpoorte R, Alfermann A. Metabolic Engineering of Plant Secondary metabolism. Plant Cell Tiss Org. 2002; 68: 211–212.

ماده های بیوسنتز متابولیت های ثانوی از متابولیسم اولیه منشأ می گیرند، لذا تحت شرایط تنش شدید، متابولیسم اولیه به سمت متابولیسم ثانوی تغییر می یابد و منابع ضروری از رشد به سمت دفاع تغییر مسیر می دهند (۲۱). گونه های فعال اکسیژن یا ROS (Reactive Oxygen Species) از جمله پراکسید هیدروژن از عوامل مهم در تنش اکسایشی بوده، که به طور قابل توجهی رشد سلول و متابولیسم ثانوی را تحت تاثیر قرار می دهد. گزارش شده است که سالیسیلیک اسید باعث تولید پراکسید هیدروژن می شود (۲۲). مطالعات نشان داده است که بین ROS به ویژه پراکسید هیدروژن و مرگ سلولی در گیاهان ارتباط نزدیکی وجود دارد و علاوه بر این ROS از اکسیدکننده های قوی بوده که می توانند اثرات مخربی روی ماکرومولکول های زیستی نظیر DNA و پروتئین ها داشته باشند (۲۳). با توجه به اینکه کلیه تیمارها باعث القای تولید پراکسید هیدروژن گردیدند، تصور می شود که از این طریق زنده ماننی و رشد را کاهش داده اند (شکل های ۱، الف و ۱، ب). یوسف زادی و همکاران (۲۴) مشاهده کردند که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید در کشت سلول کتان سفید (*Linum album*) مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی افزایش یافت. روند مشاهده شده در تولید MDA تحت اثر تیمارها با روند تغییرات رشد و زنده ماننی (شکل های ۱، الف و ۱، ب) مشابه هم است و تصور می شود که ارتباط نزدیکی بین افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش رشد و زنده ماننی وجود دارد. گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به یک سری از ترکیبات پیام رسان آزاد می سازند، که نقش دفاعی مهمی دارند (۲۵). در انگور، غلظت ۱۵۰ میکرومول سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی بعد از هشت ساعت شده است و بعد از ۲۴ ساعت به اوج میزان خود می رسد و در نهایت بعد از ۴۸ ساعت کاهش می یابد (۲۶). در پژوهش حاضر میزان فنل کل نیز همچون تری گونلین تحت تاثیر سالیسیلیک اسید افزایش یافت. گزارش شده است که الیستورهای مانندی سالیسیلیک اسید و جاسمونات از موثرترین محرک های شیمیایی برای تحریک تولید متابولیت های ثانوی در گیاهان مختلف بوده است که از طریق فعال کردن بیان ژن های مسیر بیوسنتزی متابولیت های ثانوی باعث افزایش تولید آن ها می شوند (۱۰). تاثیر گذاری و القای بیوسنتز متابولیت های ثانوی توسط سالیسیلیک اسید خارجی ممکن است با نقش آن به عنوان یک علامت رسان مرتبط باشد.

10. Zhao J, Davis L, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Advance*. 2005; 23(4): 283–333.
11. Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad Q. Effect of exogenous salicylic acid underchanging environment: A review. *Environ Exp Bot*. 2009; 68: 14-25.
12. Pu GB, Dong-Ming M, Chen JL, Ma LQ, et al. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Rept*. 2009; 28:1127–1135.
13. Kang S, Jung H, Bahk J, Yang J. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of *PMT* and *H6H* in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*. 2004; 166: 745-751.
14. Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, et al. Cadmium-Induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiol*. 2001; 127: 887-898.
15. De Vos CH, Schat H. Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol Plantarum*. 1991; 82: 523–528.
16. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated beech plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*. 2000; 151: 59–66.
17. Singleton VL, Rossi JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Viticult*. 1965; 16: 144-58.
18. Rongjie Z, Li W, Longxing W. Determination of trigonelline in *Trigonella foenum-graecum* L. by hydrophilic interaction chromatography. *chin j chromatogr*. 2010; 4: 379-382.
19. Kang SM, Jung HY, KangYM, Yun DJ, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of *PMT* and *H6H* in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*. 2004; 166: 745-751.
20. Kovacik J, Backor M, Strnad M, Repcak M. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Rep*. 2009; 28:135–143.
21. Iriti M, Faoro F. Chemical diversity and defence metabolism: How Plants Cope with pathogens and ozone pollution. *Int Mol Sci*. 2009; 10: 3371-3399.
22. Antoine L, Harfouche E, Rugini E, Mencarelli F, et al. Salicylic acid induces H₂O₂ production and endochitinase gene expression but not ethylene biosynthesis in *Castanea sativa in vitro* model system. *J Plant Physiol*. 2008; 165: 734651 .
23. Gao CJ, Xing D, Li LL, Zhang LR. Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. *Planta*. 2008; 227: 755–767.
24. Yousefzadi M, Sharifi M, Behmanesh M, Moyano E, et al. Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. *Biotechnol Lett*. 2010; 32(11): 1739–1743.
25. Bais HP, Park SW, Weir TL, Callaway RM, et al. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*. 2004; 9: 26–32.
26. Chen JY, Wen PF, Kong W, Pan QH, et al. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biol Tec*. 2006; 40: 64–72.

Increased Trigonelline Production by Salicylic Acid in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) Cell Culture

Esmailzadeh Bahabadi S. Ph.D.*¹, Rezaei A. Ph.D.²

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

2. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: shirin_esm@yahoo.com & esmaeilzadeh@uoz.ac.ir

Received: 13 Aug. 2013

Accepted: 8 Oct. 2013

Abstract

Aim: Manipulation of cell culture media by elicitors is one of the important strategies for inducing secondary metabolism production as valuable metabolites. Salicylic acid (SA) as a biotic elicitor is effective for increasing medicinal metabolites. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of salicylic acid on the growth, some of physiological parameters and trigonelline production in fenugreek cell culture.

Material and Methods: The cell was obtained from hypocotyl explants of fenugreek on MS solid medium supplemented with naphthaleneacetic acid (0.4 mg/L) and benzyladenine (0.4 mg/L). Salicylic acid with concentrations of 12.5 and 25 and 50 mg/L were used. After one week, some of physiological parameters and trigonelline production in fenugreek cell culture were investigated.

Results: Following treatments with salicylic acid, the results showed that the cell growth and viability of cells were decreased as compared to control. The treatments increased hydrogen peroxide content and lipid peroxidation rate in cells compared to control. In addition trigonelline and total phenol production were improved by all the treatments. Treatment of cells with 50 mg/L salicylic acid increased trigonellin 2- fold higher than control.

Conclusion: Salicylic acid can be used as an elicitor in fenugreek cell culture and induce more trigonelline production.

Keywords: Trigonelline, Salicylic acid, Fenugreek