Archive of SID

Crop Biotech.
Winter (2019) 9(2): 11-19. DOI: 10.30473/cb.2020.49916.1793

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال نهم، شماره دوم، پیاپی بیست و هشتم، زمستان 1398 (19-11)

بررسی اثر سالیسیلیک‌اسید بر افزایش میزان متابولیت ثانویه تریگونلین در کشت درون شیشه‌ای *Trigonella foenum-graecum*

مهناز عربی‌باف[1]، نادعلی بابایان جلودار[2*]، نادعلی باقری[3]

1. کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
2. استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
3. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

(تاریخ دریافت: 1398/8/1 – تاریخ پذیرش: 1398/12/25)

Evaluation of the effect of salicylic acid on the increase of secondary metabolite of Trigonellin in *in vitro* culture of *Trigonella foenum-graecum*

Mahnaz Arabibaf[1, *], Nadali Babaeian[2], Nadali Bagheri[3]

1. M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3. Assistant Professor of Plant Breeding and Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

(Received: Nov. 23, 2019 - Accepted: Mar. 15, 2020)

Abstract

Trigonella foenum-graecum is annual plant and dicotyldones of the fabaceae family. Root, leaf and seed have important medicinal compounds. Manipulation of cell culture media with elicitors is one of the important strategies for induction of secondary metabolism and production of valuable metabolites. Salicylic acid as a non-biological elicitor is effective in increasing the production of pharmaceutical metabolites. The aim of this study was to investigate the effect of salicylic acid on growth, some physiological and trigonelline production in in vitro culture of fenugreek. Fenugreek cell culture was obtained using cuticle extract of TN-47-155 fenugreek genotype in MS medium containing 0.35 mg / l TDZ and 0.05 mg / l IBA. Salicylic acid at concentrations of 12.5, 25, 50 mg / L were used. The cells were then treated with triglyceride and other physiological parameters after one week of treatment. The results of HPLC showed that cell growth and viability of the cells decreased as compared to the control. The amount of hydrogen peroxide and membrane lipid peroxidation in the cells increased compared to the control (without hormone) treatment. All treatments increased the production of TG and total phenol. Treatment of cells with 50 mg / l (75%) salicylic acid increased triglyceride levels twice as much as control (35%). Salicylic acid can be used as a stimulant in fenugreek cell culture and induces higher triglyceride production.

Keywords: Secondary metabolite, Biological Elicitor, *Trigonella foenum-graecum*, Cell culture, HPLC.

چکیده

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum– graecum* گیاهی یکساله و دو لپه‌ای از تیره بقولات است. ریشه، برگ و بذر آن دارای ترکیبات دارویی مهمی می‌باشد. دستورزی محیط‌های کشت سلولی با الیسیتورها یکی از راهکارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانویه و تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌باشد. سالیسیلیک اسید به عنوان یک الیسیتور غیرزیستی در افزایش تولید متابولیت‌های دارویی مؤثر است. هدف از این پژوهش بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر رشد، برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک و تولید تریگونلین در کشت درون شیشه ای شنبلیله است. کشت سلولی شنبلیله با استفاده از کوتیلدون ژنوتیپ TN-47-155 شنبلیله در محیط جامد MS حاوی 0/35 میلی‌گرم در لیتر TDZ و 0/05 میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. واکنش سلول‌ها در ارتباط با تولید تریگونلین و دیگر شاخص‌های فیزیولوژیک پس از گذشت یک هفته با اعمال سالیسیلیک‌اسید با غلظت‌های 12/5، 25، 50 میلی‌گرم بر لیتر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از HPLC نشان داد که رشد سلولی و زنده‌مانی 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 تریگونلین و فنل کل شدند. تیمار سلول‌ها با غلظت 50 میلی‌گرم بر لیتر (75 درصد) سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان تریگونلین به میزان دو برابر شاهد (35 درصد) شد. سالیسیلیک اسید می‌تواند به عنوان محرک در کشت سلولی شنبلیله به کار رود و باعث القای تولید بیشتر تریگونلین شود.

واژه‌های کلیدی: متابولیت ثانویه، الیسیتور زیستی، *Trigonella foenum-graecum*، کشت بافت، HPLC.

* نویسنده مسئول: نادعلی بابایان جلودار
E-mail: n.babaeian@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) گیاهی یکساله، دولپه‌ای، علفی و از تیره بقولات می‌باشد که به عنوان یک گیاه دارویی، زراعی، مرتعی، آرایشی و بهداشتی حائز اهمیت است (Aasim *et al.*, 2010). مواد با اهمیت در برگ شنبلیله عبارت اند از: کلسیم، آهن، کاروتن، اسیداسکوربیک، پروتئین، مواد معدنی و ویتامین A و C است (Chhibba *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2005). حدود 40 تا 65 درصد بذر را مواد قندی که عمدتا مربوط به موسیلاژ روی بذور است، تشکیل می‌دهد. بذور این گیاه حاوی پلی‌ساکارید گالاکتومنال و ساپونین‌هایی از قبیل دیوسژین، یاموژنین، گیتوژنین و نئوتیگوژنس و فلاوونوئیدهایی از جمله: ویتمکسین و همچنین مقداری آلکالوئید که شامل: تریگونلین، ژنیتانین و کاراپائین می‌باشد (Aasim *et al.*, 2010; Folwarczna *et al.*, 2014).

از دیر باز برگ‌ها و بذر گیاه دارویی شنبلیله به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان با اهداف متفاوتی مانند: ضد دیابت، پایین آورنده قند خون و کلسترل خون، ضد سرطان، ضد باکتریال و چاشنی غذایی و غیره مورد استفاده قرار گرفته است (Tripathi & Tripath, 2003). تریگونلین یا همان N– متیل نیکوتینیک اسید، متابولیت ثانوی مشتق‌شده از نوکلئوتیدهای پیریمیدین است. تریگونلین ترکیب فعال فیزیولوژیکی در گیاهان است که القا کننده حرکات برگ‌ها می‌باشد و در زمان تنش در گیاه تجمع می‌یابد و به عنوان یک محافظ اسمزی عمل می‌کند (Mehrafarin *et al.*, 2010).

پژوهشگران با استفاده از این روش سعی کردند این متابولیت‌های ثانویه با ارزش در گیاهان را افزایش دهند. در کشت بافت می‌توان متابولیت‌های مانند آلکالوییدها 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 انباشتگی متابولیت‌های موردنظر دریک دوره زمانی کوتاه می‌شود (Kaling *et al.*, 2014).

در کشت کالوس گیاه شنبلیله میزان آلکالوئید تریگونلین 3 تا 4 برابر بیشتر از میزان دانه‌های این گیاه است (Radwan & Kokate, 1980). یکی از روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه استفاده از الیسیتورها می‌باشد. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao *et al.*, 2005).

الیسیتورهای غیر زیستی مانند اشعه ماوراء بنفش، نمک فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی مانند جاسمونیک‌اسید و سالیسیلیک‌اسید نیز به منظور افزایش تولید این ترکیبات درکشت بافت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. ترکیباتی مانند سالیسیلیک‌اسید و جاسمونیک اسید از مولکول‌های تأثیرگذار در مسیر علامت‌رسانی تنش‌ها می‌باشند و به‌طور گسترده‌ای در این زمینه روی آن‌ها مطالعه شده است. نقش سالیسیلک‌اسید بر تحمل گیاه نسبت به بیماری‌زاها و سایر عوامل تنش‌زا به‌خوبی شناخته شده است. به تازگی نقش آن به‌عنوان یک ترکیب پیام رسان در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاهان پررنگ‌تر شده است (Kenny *et al.*, 2013).

به‌علت نقشی که سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان یک محرک دارد و باعث افزایش بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانوی می‌شود، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (Pu *et al.*, 2009). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سالیسیلیک‌اسید در تحریک تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانوی همچون ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها مؤثر می‌باشد (Brain & Lockwood, 1976).

www.SID.ir

Archive of SID

به‌طورکلی تریگونلین از مسیر بیوسنتز NAD و مسیر بیوسنتز novo De نوکلئوتیـدهای پیریدینی در گیاهان ساخته می‌شود (Hayat *et al.*, 2009). تاکنون مطالعات معدودی به منظور تولید تریگونلین و دیوسژنین از طریق کشت درون‌شیشه شنبلیله صورت گرفته است (Radwan & Kokate, 1980; Oncina *et al.*, 2000; Merkli *et al.*, 1997).

در این مطالعه اثر سالیسیلیک اسید بر رشد سلول و میزان تریگونلین و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در کشت سلولی شنبلیله مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان ترکیبات فنلی دارای مسیر بیوسنتزی مشترک با تریگونلین که نقش دفاعی نیز دارند، بررسی شد تا ارتباط مسیرهای متابولیسمی گیاه مشخص شود.

مواد و روش‌ها

القای تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی

برای القای کالوس از ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ TN-47-155 شنبلیله که از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج تهیه و پس از حذف جنین در محیط جامد MS حاوی 0/35 میلی‌گرم در لیتر TDZ و 0/05 میلی‌گرم در لیتر IBA کشت شد. پس از گذشته 9 روز القای کالوس شروع شد. برای تهیه کشت تعلیقی 2 گرم کالوس، سفید و هم سن، به 50 میلی‌لیتر محیط کشت جامد MS با ترکیبات یاد شده اضافه شد و روی شیکر با سرعت 220دور در دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد و هر دو هفته یک‌بار واکشت شد.

تیمار سلول با سالیسیلیک‌اسید

برای انجام این مرحله از مطالعه، ابتدا به منظور ایجاد یک کشت همگن و یکنواخت، کشت سلولی تهیه شده در مرحله قبل، چندین بار واکشت شد. در هر مرحله سلول‌ها با استفاده از قیف بوخنر و در شرایط مکش جمع‌آوری شدند و به محیط تازه منتقل گردیدند. قبل از اعمال تیمار، دوره رشد برای سلول‌ها تعیین گردید. به این منظور پس از انتقال یاخته‌ها به محیط جدید از روز اول تا 30 روز پس از انتقال، به فاصله زمانی دو روز، نمونه برداری انجام و براساس وزن تر سلول‌ها، منحنی رشد تعیین گردید. با توجه به منحنی رشد به‌دست‌آمده از وزن تر سلول‌ها در روز پانزدهم سلول‌ها به‌طور جداگانه در غلظت‌های 12/5، 25، 50 میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک‌اسید تیمار شدند. واکنش سلول‌ها در ارتباط با تولید تریگونلین، ترکیبات فنلی و 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 شد، در دمای 80- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری‌های شاخص‌های فیزیولوژیک نگهداری شد.

اندازه‌گیری رشد سلولی و توان زیستی سلول‌ها

رشد سلولی با اندازه‌گیری افزایش وزن خشک آنها تعیین شد، به این منظور سلول‌ها از محیط کشت جداشده و به‌مدت 48 ساعت در دمای 95 درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توزین شدند. برای تعیین توان زیستی از اوانس بلو (Evans blue) استفاده شد (Schützendübel *et al.*, 2001).

تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها

مقدار 0/5 گرم از نمونه تازه با نیتروژن مایع برای مدت یک دقیقه در هاون خرد نموده شد. پودر برگ خرد شده را درون لوله آزمایش ریخته، سپس 5 میلی‌لیتر بافر پتاسیم‌فسفات 50 میلی‌مولار (pH=7) که در درون ظرف یخ قرار دارد به آن اضافه گردید. نمونه حاصله در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 30 دقیقه با دور 14000 rpm سانتریفوژ شد. به 10 میلی‌لیتر از محلول بالایی پس از سانتریفوژ 1 میلی‌لیتر محلول (0/5 w/v٪) اسید تیوباربیتوریک (thiobarbituric

www.SID.ir

Archive of SID

acid) که حاوی اسید تری‌کلرواستیک (20٪ w/v) است، اضافه شد. مخلوط در حمام آب داغ به دمای 95 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 30 دقیقه حرارت داده شد. به‌منظور توقف واکنش، ظرف محتوی مخلوط حرارت داده شده به سرعت درون حمام یخ قرار داده و اجازه داده شد به‌مدت 30 دقیقه در حمام یخ بماند. باید توجه داشت که زمان حرارت دادن بسیار مهم است و به هیچ عنوان نباید از 30 دقیقه بیشتر یا کمتر شود. مخلوط سرد شده با دور 10000rpm به‌مدت ده دقیقه سانتریفوژ شد. میزان جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS در دو طول موج 532nm و 600 nm اندازه‌گیری شد (Davey *et al.*, 2005).

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن

یک گرم از نمونه را خرد کرده به آن 5 میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرواستیک (1٪ w/v) اضافه گردید. نمونه هموژنیزه شده در 12000گرم به‌مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد. 0/5 میلی‌لیتر از محلول رویی سانتریفوژشده به 0/5 میلی‌لیتر محلول بافر فسفات پتاسیم 10 میلی‌مولار (pH=7) و یک میلی‌لیتر محلول یک مولار از KI اضافه گردید. میزان جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS در طول موج 390 نانومتر اندازه‌گیری شد (Hung et al., 2005).

اندازه‌گیری میزان فنل کل

میزان ترکیبات فنلی کل براساس روش ریگ‌سنجی فولین- سیوکالتیو برحسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج 765 نانومتر اندازه‌گیری شد (Singleton & Rossi, 1965).

استخراج و اندازه‌گیری تریگونلین

به این منظور 2/5 میلی‌لیتر متانول خالص به نیم گرم از پودر ساییده‌شده بذر شنبلیله اضافه و به‌مدت 20 دقیقه ورتکس و بعد به‌مدت 22 ساعت با دور 160rpm در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در شیکر قرار گرفت. سپس مخلوط حاصل به‌مدت 10 دقیقه با دور 3000rpm در دمای 27 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا و در یخچال نگهداری و مراحل بالا برای رسوب باقی‌مانده به منظور استخراج کامل تریگونلین دوباره تکرار و محلول رویی حاصل از مرحله دوم به محلول اول اضافه شد. محلول حاصل تا زمان تغلیظ کامل در کانسنتریتور (Rotary Concentrator, plus Germany) قرار داده شد. در زمان اندازه‌گیری تریگونلین، 1 میلی‌لیتر متانول خالص به نمونه اضافه و پس از ورتکس و حل شدن کامل نمونه در متانول، محلول حاصل از فیلتر سر سرنگی (13میلی‌متر) عبور و به‌صورت دستی به‌دستگاه HPLC تزریق شد محلول به‌دست‌آمده توسط دستگاه HPLC (knauer, Germany) با استفاده از ستون C18 و دتکتور UV/Vis و حلال متانول 95 درصد در شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه تجزیه و غلظت تریگونلین با استفاده از غلظت‌های مختلف استاندارد این ماده تعیین شد. طول موج و زمان بازداری به‌ترتیب 267 نانومتر و 20 دقیقه بود (Rongjie *et al.*, 2010).

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و آزمون دانکن برای تعیین معنی‌داربودن تفاوت‌ها در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

نتایج و بحث

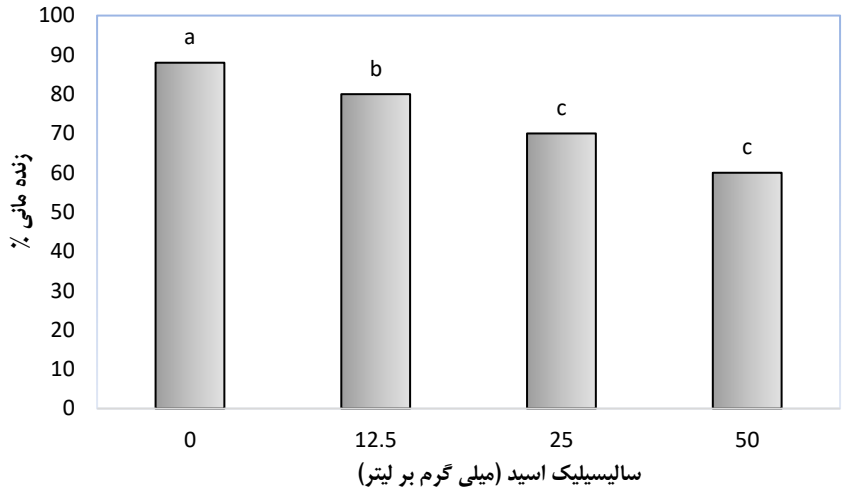
اثر سالیسیلیک‌اسید بر رشد و توان زیستی سلول‌ها

نتایج نشان داد، با افزایش غلظت‌های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری (در سطح $p\leq0/05$) رشد سلولی کاهش یافته است. به‌طوری که در غلظت 50 میلی‌گرم بر لیتر (60 درصد) میزان رشد را به میزان 40 درصد کاهش داد. زنده‌مانی سلول‌ها در تمامی غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های شاهد بود. تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های 25 (70 درصد) و 50 (60 درصد) میلی‌گرم بر لیتر مشاهده نشد. بیشترین میزان کاهش زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت 50 میلی‌گرم بر لیتر به میزان 22 درصد نسبت به نمونه‌های شاهد مشاهده شد (شکل 1).



شکل 1. اثر سالیسیلیک‌اسید بر زنده‌مانی در کشت سلولی شنبلیله. میانگین 3 تکرار می باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک ازنظر آماری در سطح 5 درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

اثر سالیسیلیک‌اسید بر مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها

مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی که به عنوان شاخص از تنش می‌باشد، نیز تحت تأثیر کلیه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. بیشترین مقدار این پارامتر در غلظت50 میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. غلظت های 25 و 50 میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش معنی‌داری (در سطح 5 درصد) مقدار پر اکسید هیدروژن سلول‌های شنبلیله در مقایسه با شاهد گردیده است. تفاوت معنی‌داری در نمونه‌های شاهد و غلظت 12/5 میلی‌گرم برلیتر مشاهده نشد (شکل 2).

اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فنل کل

میزان فنل کل در تیمارها به استثنای غلظت 12/5 میلی‌گرم بر لیتر (50 درصد) به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. تفاوت معنی‌داری در میزان فنل کل در غلظت‌های 25 (60 درصد) و 50 (65 درصد) میلی‌گرم بر لیتر مشاهده نشد (شکل 3).

اثر سالیسیلیک‌اسید بر میزان تریگونلین

نتایج بررسی تریگونلین نشان داد که غلظت‌های 25 و 50 میلی‌گرم بر لیتر (75٪) سالیسیلیک اسید میزان تریگویلین را به‌طور معنی‌داری به میزان دو برابر، نمونه‌های شاهد (35٪) افزایش داد. میزان تریگویلین در غلظت 12/5 میلی‌گرم بر لیتر نیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که البته قابل توجه نبود (شکل 4).

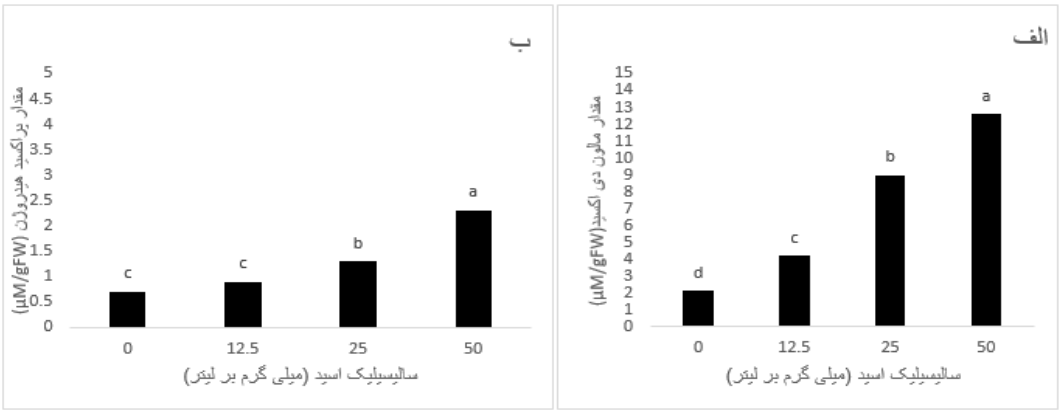
کروماتوگرام دانه شنبلیله در طول موج 280 نانومتر

سالیسیلیک‌اسید یک تنظیم‌کننده رشد درونی است

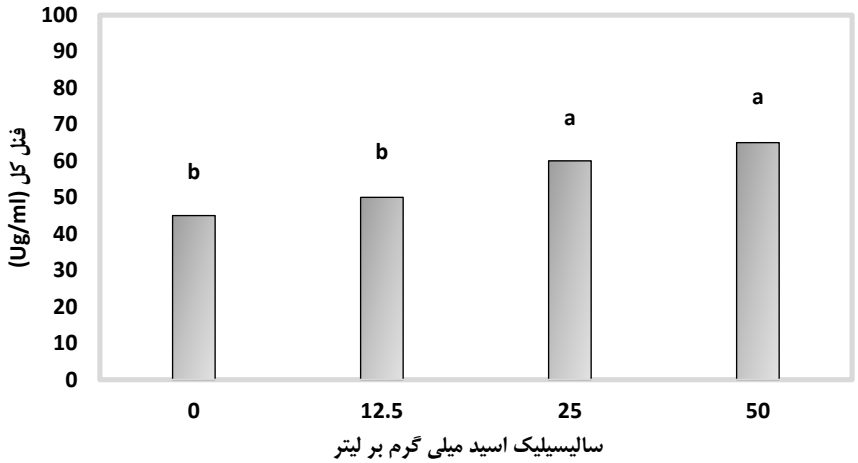
www.SID.ir

Archive of SID

که در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک در گیاهان نظیر رشد، فتوسنتز، متابولیسم نیترات و نیـز ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نقش دارد (Kovacik et al., 2009). در مطالعه حاضر تأثیر سالیسیلیک‌اسید بر رشد سلول و میزان تریگونلین و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک بررسی شد. تأثیر سالیسیلیک‌اسید به عواملی نظیر گونه، مراحل نمویی گیاه، نحوه اعمال تیمار و غلظت آن وابسته است. اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های بالاتر وضعیت اکسایشی گیاه را بیش از حد توان گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهد و در نهایت منجر به مرگ گیاه می‌شود (Iriti & Faoro, 2009).



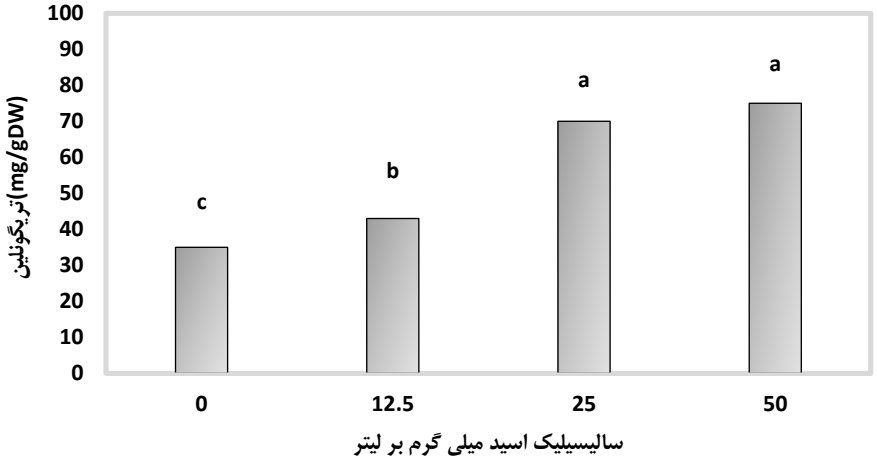
شکل 2. اثر سالیسیلیک‌اسید بر الف) مقدار مالون‌دی‌اکسید، ب) مقدار پراکسید هیدروژن درکشت سلولی شنبلیله. میانگین سه تکرار است. (میانگین‌های دارای حرف مشترک ازنظر آماری در سطح 5 درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.)



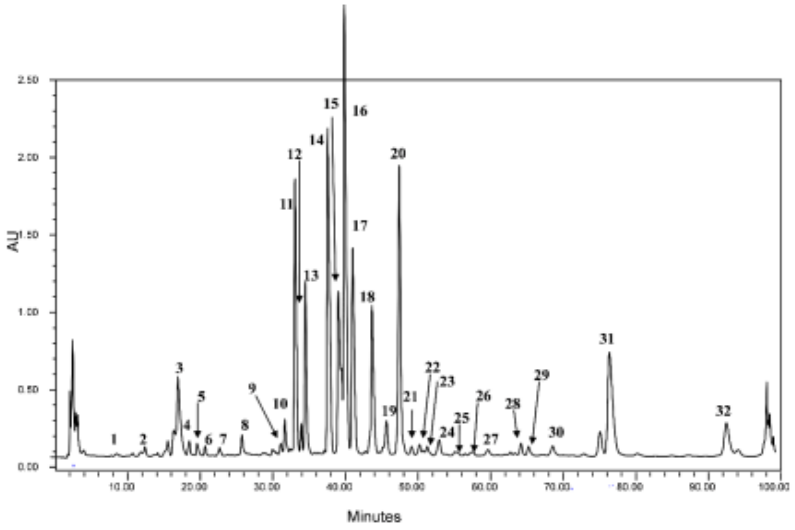
شکل 3. اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فنل کل. مقادیر نشان داده شده میانگین سه تکرار است. (میانگین‌های دارای حرف مشترک ازنظر آماری در سطح 5 درصد تفاوت معنی‌داری ندارند).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 4. اثر سالیسیلیک‌اسید بر میزان تریگونلین. مقادیر نشان داده‌شده میانگین سه تکرار می‌باشد. (میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح 5 درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.)



شکل 5. کروماتوگرام دانه شنبلیله در طول موج 280 نانومتر

طیف‌های قابل‌مشاهده (UV-visible) در شکل 5 ترکیبات فنولی شامل فلاون و فلاونول بودند. گلیکوزیدها علاوه بر اسید فنولیک حداکثر با دو باند در 232-270 و 316-346 نانومتر که مشخصه فلاونوئیدها است، بیشتر ترکیبات شناسایی‌شده در جذب UV را نشان دادند. بعضی از قله‌ها با نوار جذب اشعه ماورای بنفش برای اسیدهای هیدروکسی سمی تشخیص داده شدند.

رشد و کاهش زنده‌مانی، در نتیجه زوال تمامیت سلولی و تخریب غشاهای سلولی است که توسط سالیسیلیک‌اسید القا می‌شود. که در این مطالعه رشد و زنده‌مانی سلول تحت تأثیر غلظت‌های مورد استفاده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. با توجه به رابطه معکوس بین رشد یا تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه، مهار رشد سلولی توسط سالیسیلیک‌اسید ممکن است که سنتز متابولیت‌های ثانویه را القا نماید. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مهار رشد سلول‌ها توسط سالیسیلیک‌اسید منجر به تولید بیشتر تریگونلین می‌شود (شکل4)، که به‌نظر می‌رسد به‌دلیل کاهش متابولیسم اولیه و آغاز متابولیسم

www.SID.ir

Archive of SID

ثانویه باشد. با توجه به این‌که پیش ماده‌های بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از متابولیسم اولیه منشأ می‌گیرند، لذا تحت شرایط تنش شدید، متابولیسم اولیه به سمت متابولیسم ثانویه تغییر می‌یابد و منابع رشد به سمت دفاع تغییر مسیر می‌دهند (Iriti & Faoro, 2009).

مطالعات نشان داده است که بین ROS به‌ویژه پراکسید هیدروژن و مرگ سلولی در گیاهان ارتباط نزدیکی وجود دارد و علاوه بر این ROS از اکسید کننده‌های قوی بوده که می‌تواند اثرات مخربی روی ماکرومولکول‌ها زیستی نظیر DNA و پروتئین‌ها داشته باشند (Gao *et al.*, 2008). با توجه به این‌که کلیه تیمارها باعث القای تولید پراکسید هیدروژن شد، تصور می‌شود که از این طریق زنده‌مانی و رشد را کاهش داده‌اند (شکل‌های 2- الف و 2- ب). روند مشاهده‌شده در تولید MDA تحت اثر تیمارها با روند تغییرات رشد و زنده‌مانی در (شکل‌های 2، الف و 2- ب) مشابه هم است و تصور می‌شود که ارتباط نزدیکی بین افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش زنده‌مانی وجود دارد (Antoine *et al.*, 2008).

با بررسی نمودارهای به‌دست‌آمده ارتباط نزدیکی بین افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش رشد و زنده‌مانی وجود دارد. گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به یکسری ترکیبات پیام‌رسان آزاد می‌کنند که نقش دفاعی مهمی دارند (Gao *et al.*, 2008). در این مطالعه میزان فنل کل نیز همچون تریگونلین تحت تأثیر سالیسیلیک‌اسید افزایش یافت. گزارش شده است الیسیتورهایی مانند سالیسیک اسید و جاسمونیک اسید از مؤثر ترین محرک‌های شیمیایی برای تحریک تولید متابولیک‌های ثانویه هستند (Zhao *et al.*, 2005). تأثیر گذاری و القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه توسط سالیسیلیک‌اسید خارجی ممکن است با نقش آن به عنوان یک علامت‌رسان مرتبط باشد.

در این مطالعه نشان داده شد که سالیسیلیک‌اسید می‌تواند مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلول‌ها را افزایش دهد. کلیه تیمارها باعث افزایش تولید تریگویلین و فنل کل شدند. تیمار سلول‌ها با غلظت 50 میلی‌گرم بر لیتر (75 درصد) سالیسیلیک‌اسید باعث افزایش میزان تریگویلین به میزان دو برابر شاهد (35 درصد) شد. سالیسیلیک‌اسید می‌تواند به‌عنوان محرک در کشت سلولی شنبلیله به‌کار رود و باعث القای تولید بیشتر تریگویلین شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جهت حمایت از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Aasim M, Hussain N, Umer EM, Zubair M, Hussain SB, Saeed SH, Rafique TS, SancakC (2010) *In vitro* shoot regeneration of fenugreek (*Trigonellafoenum-graecum* L.) using different cytokinins. African Journal of Biotechnology. 42: 7174-7179.

Antoine L, Harfouche E, Rugini E, Mencarelli F (2008) Salicylic acid induces H2O2 production and endochitinase gene expression but not ethylene biosynthesis in *Castanea sativa* in vitro model system. Journal Plant Physiol. 165: 73465l.

Brain KR, Lockwood GB (1976) Hormonal control of steroid levels in tissue cultures from trigonella. Phytochem. 15: 1651 - 4.

Chhibba IM, Nayyar VK, Kanwar JS (2007) Influence of mode and source of applied iron on fenugreek (*Trigonellacorniculata* L.) in a typicustochrept in Punjab. India. African Journal of Biotechnology. 9: 254-256.

Davey MW, Stals E, Panis B, Keulemans J, Swennen RL (2005) High throughput of malondialdehyde in plant tissues. Analytical Biochemistry. 347: 201-207.

Folwarczna J, Zych M, Nowińska B, Pytlik M (2014) Effects of fenugreek (*Trigonella*

www.SID.ir

Archive of SID

foenum-graecum L.) seed on bone mechanical properties in rats. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 18: 1937-1947.

Gao CJ, Xing D, Li LL, Zhang LR (2008) Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure.

Planta. 227: 755-767.

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad Q (2009) Effect of exogenous salicylic acid underchanging environment: A review. Environ Exp Bot. 68: 14-25.

Hung SH, Yu CW, Lin CH (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. Botanical studies Bull. Academic journal. 46: 1-10.

Iriti M, Faoro F (2009) Chemical diversity and defence metabolism: How Plants Cope with pathogens and ozone pollution. Int Mol Sci. 10: 3371-3399.

Kenny O, Smyth TJ, Hewage CM, Brunton NP (2013) Antioxidant properties and quantitative UPLC–MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. Food Chem Journal. 141, 4295-4302.

Khan MB, Khan MA, Sheikh M (2005) Effect of phosphorus levels on growth and yield of fenugreek, African Journal of Biotechnology. 7: 504-507.

Kaling M, Kanawati B, Ghirado A, Albert A, Winkler JB, Heller W (2014) UV-B mediated metabolic rearrangements in poplar by non-targeted metabolomics. Plant Cell Environ Journal. 38: 1-13.

Kovacik J, Backor M, Strnad M, Repcak M (2009) Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Rep Journal. 28:135-143.

Mehrafarin A, Qaderi A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi H (2010) Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenumgraecu* L.). Journal of Medicinal Plants. 9: 1-18.

Merkli A, Christen P, Kapetanidis I (1997) Production of diosgenin by hairy root cultures of Trigonella foenum.graecum L. Plant Cell Rep. 16: 632-636.

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

Pu GB, Dong-Ming M, Chen JL, Ma LQ (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Rept. 28: 1127-1135.

Rongjie Z, Li W, Longxing W (2010) Determination of trigonelline in *Trigonella foenum-graecum* L. by hydrophilic interaction chromatography. Chin Journal Chromatogr. 4: 379-382.

Radwan SS, Kokate CK (1980) Production of higher levels of trigonelline by cell cultures of Trigonella foenum-graecum than by the differentiated plant. Planta. 147: 340-4.

Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K (2001) Cadmium-Induced changes in xidative systems, hydrogen peroxide content, antioand differentiation in scots pine roots. Plant Physiol. 127: 887-898.

Singleton VL, Rossi JR (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungestic acid reagent. Am Journal Enol Viticult. 16: 144-58.

Tripathi L, Tripath JN (2003) Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2: 243-253.

Zhao J, Davis L, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Advance. 23: 283-333.

www.SID.ir