بررسی ساپونینهای استخراجی از گیاهچه های چهار رقم یونجه (*Medicago sativa L.*) و تأثیر تغذیه شته خالدار یونجه (*Therioaphis maculata* Buckten) بر روی این ارقام

حجت ا... مظاهری لقب[۱] و علیرضا باقری[۲]

[۱] دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[۲] گروه زراعت، دانشگاه آ زاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

چکیده

گیاه علوفه ای یونجه مملو از ساپونینهای تری‌ترپنوئیدی شامل متابولیتهای ثانویه ای است که باعث تلخی گیاه و پائین آمدن خوش خوراکی و مقاوم شدن گیاه نسبت به حمله آفات و بسیاری از بیماریها در این گیاه می شوند. با این وجود، آفات و پاتوژن های اختصاصی یونجه نیز یافت شده اند که قادرند اثر این ترکیبات را خنثی و در حمله به گیاه یونجه فائق آیند. لذا تنوع ساپونین ها در ارقام و نتایج حاصل از تغذیه شته خالدار یونجه بر روی ارقام داخلی گوران طالقان، خورونده، و اهر و یک رقم خارجی بنام اور (Euver) بعنوان شاهد مورد بررسی قرار گرفت. ارقام در گلخانه و در گلدانهای پلاستیکی کشت شدند تا در مرحله گیاهچه ای مورد مطالعه قرار گیرند. تعداد شته های زنده در روی ارقام، تعداد پوره های تولیدی و اندازه جثه حشرات ارزیابی شد. ساپونینهای برگی در متانول ۸۰ درصد و متعاقبا با بوتانل استخراج و خالص سازی شد. برای آنالیز ساپونینها TLC بکاررفت. در الگوهای نواری روی TLC تفاوت وجود داشت. تجزیه آماری نشان داد که تعداد شته های زنده و پوره های تولیدی در مرحله گیاهچه ای تفاوت معنی داری ندارند. نتیجه این که ساپونینها در ایجاد مقاومت این ارقام نسبت به شته خالدار یونجه نمی توانند نقشی داشته باشند.

واژه های کلیدی: گیاهچه های ارقام یونجه، شته خالدار یونجه، ساپونینها، اثرات تغذیه

مقدمه

شناخت و استفاده از توانایی دفاعی گیاهان در مقابل تنشهای زیستی از اهمیت خاصی برخوردار است. وجود پروتئین ، مواد معدنی، حداقل ۱۰ نوع ویتامین، بخصوص ویتامین A و ویتامین C، کلسیم ، درصد خیلی کم سلولز، و دارا بودن سایر مواد متابولیکی در یونجه، برتری خاصی را به آن بخشیده و وجود این ترکیبات عاملی برای حفاظت آن در مقابل بعضی حشرات و میکروبها محسوب می شود (٦).

آفت سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica Gyll.*)، نماتد ها، قارچها، و بعضی باکتریها از جمله موارد محدود کننده در تولید یونجه محسوب می شوند (٤). با کنترل عوامل محدود کننده رشد، می توان تا حد زیادی میزان خسارت آفات را کاهش داد (۵). بنا به دلائلی از جمله مضرات استفاده از سموم شیمیائی، استفاده از روشهای کنترل بیولوژیکی و ایجاد ارقام مقاوم جهت مبارزه با آفات ضرورت دارد (۹). ارقام متحمل بعنوان ابزار مفیدی در امر مدیریت و کنترل آفات و حتی بیماریها قلمداد می شوند . بعضی از ارقام مقاومت خود را با داشتن متابولیتهای ثانویه مثل ساپونینها آشکار می کنند . Gatehouseو همکارانش (۱۹۹۰) بیان کردند که ترکیباتی مانند الکالوئیدها، ساپونینها، اسیدهای آمینه غیر پروتئینی، پلی ساکاریدها و پروتئینهایی مثل لکتین و ممانعت کننده های آنزیمی وظیفه

Archive of SID
www.SID.ir

حفاظت گیاه را عهده دار هستند (۱۳). ساپونینها ترکیباتی طبیعی هستند که در گیاهان مخصوصاً لگومها و مقدار کمی در حیوانات آبزی مثل ستاره دریایی و خیار دریایی یافت می شوند. مقدار آنها در یک گونه نیز متفاوت است (۱۱،۱۲).

گیاه یونجه نیز با داشتن ترکیباتی مثل ساپونینها، اسیدهای آمینه سمی، و فنلها گیاه نسبتاً مقاومی در برابر حمله آفات و بیماریها می باشد(۱۵). از میان ترکیبات فوق، ساپونین ها، گلیکوسایدهای تری ترپنوئیدی متشکل از یک آگلی کن ۳۰ کربنه با یک یا چند شاخه قندی می باشند(۱۸،۲۳). در یونجه بیش از ۳۳ نوع آن با اثرات بیولوژیکی متفاوت شناخته شده است (۱٤،۱٦،۲٤،۲٦). رابطه بین محتویات ساپونینی در بذرها لگوم و مقاومت نسبت به لارو سوسک چهار نقطه ای حبوبات *(Callosobruchus maculatus)* در سال ۱۹٦۹ توسط Applebaum گزارش گردید (۱۰). با این وجود، به این علت که ساپونینهای آن ممکن است توسط بعضی از عوامل تنشزا مثل قارچها و حشرات مورد عمل تجزیه قرار گیرند، گیاه در معرض حمله چنین آفات و بیماریهایی قرار می گیرد (۱۷).

شته خالدار یونجه (*Therioaphis maculata* Buckten) علاوه بر یونجه، از شبدر، پیاز و گیاهان دیگر نیز تغذیه می کند. انتشار آن در کرج، همدان، تبریز، اهواز و مشهد گزارش شده است. بدلیل قدرت زیاد تکثیر این حشره می توان از آن شته های استاندارد با سنین یکسان تولید و تأثیر تغذیه از ارقام یونجه را روی رفتار آنها را بررسی کرد.

هدف آزمایش بررسی وضعیت تنوع ساپونینها در ارقام مختلف یونجه و اثرات تغذیه ای از این گیاهان بر حشره بود.

مواد و روشها

ارقام گیاهی وحشره مورد بررسی: بذرهای سه رقم یونجه ،رقم ۱۰۰ (گوران طالقان)، ۹۳ (خورونده همدان)، ٤۲ (اهر) ،که قبلا وضعیت کمی و کیفی و همچنین نقش ساپونینهای آن‌ها در مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه تعیین شده بود تهیه ، قوه نامیه آنها اندازه گیری و بذرها در گلخانه کشت شدند . علاوه بر این ارقام، رقم اور (Euver) نیز که قبلاً ساپونینهای آن در رابطه با ایجاد مقاومت نسبت به شته سیب زمینی *(Aulachorsum solani)* آزمایش شده بود (۲۱) بعنوان رقم شاهد مثبت در نظر گرفته شد.

بمنظور تهیه بافتهای گیاهی مورد نظر، بطریهای پلاستیکی نوشابه از پایین، به ارتفاع ۱۰ سانتیمتر قطع، و با ماسه بادی دریا پر شد. بذرهای ارقام یونجه کشت با لایه ای از ماسه پوشیده شدند. با مراقبتهای لازم، قسمتهای هوایی گیاهچه ها از بعضی گلدانها برداشت، در داخل ازت مایع منجمد، و در فریزر نگه داری ومابقی گلدانها جهت بررسی اثرات تغذیه ای نگه داری شدند.

جهت تکثیر شته خالدار یونجه، از بوته گیاه یونجه زراعتی تحت کشت مزارع در مناطق روستایی استفاده گردید. این حشره بخوبی روی بوته یونجه مستقر و از طریق بکر زایی تکثیر شد. از پوره ها برای بررسی صفات مورد نظر استفاده شد .

زیست سنجی حشره ای: تعداد ۵ پوره با سن حداکثر یک روز با برس نرم ابریشمی از برگ یونجه زراعتی بهبرگ گیاهچه های ارقام مختلف مورد آزمایش انتقال یافتند. هر گلدان حاوی گیاهچه یک رقم بعنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. روی هر گلدان با قسمت بالایی قطع شده ظروف پلاستیکی نوشابه، پوشانده شد. برای انجام تهویه قسمتهای بالای گلدان ها مجهز به تور های سیمی بسیار مرغوب بودند. برای هر رقم از گیاهچه های یونجه، تعداد ٤ گلدان به منزله ٤ تکرار آزمایش بکار گرفت.

عصاره گیری ساپونین: یک گرم از بافت قسمتهای هوایی جدا شده با استفاده از ازت مایع در هاون چینی پودر و ساپونینهای آن با الکل ۸۰ درصد داخل ارلن مایر

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج شد و سپس محلول حاصل با یک فیلتر شیشه ای در خلاء صاف گردید. الکل موجود بوسیله دستگاه تبخیر کننده چرخشی در خلاء و دمای ٤٥ درجه سانتی گراد تبخیر گردید. مواد جامد باقی مانده ته فلاسک روتاری در آب مقطر شسته شد و حل گردید. محلول غلیظ حاصل به لوله اپندروف منتقل و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (۲۳،۲۱،۲۰).

خالص سازی ساپونینها: خالص سازی ساپونینها با بهینه سازی روش Massiot و همکاران (۱۹۹۲) صورت گرفت (۱۹). بدین منظور عصاره خام ساپونین در خلاء تبخیر و سپس در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل و به قیف جدا کننده منتقل گردید. به ازاء هر ٦ گرم بافت اولیه ، ۲/۵ میلی لیتر بوتانول اشباع از آب اضافه گردید و خوب بهم زده شود. قیف در روی پایه مربوطه استقرار یافت . تا بعد از مدت چند دقیقه دو لایه تشکیل شود، که لایه پائینی عمدتاً حاوی آب و لایه بالائی حاوی الکل بوتانول بود.جمع آوری گردد. لایه آبدار پایینی مجدداً با همان مقدار اولیه بوتانل مخلوط و مجدداً لایه بوتانلی جدا و نگهداری گردید. این عمل جدا سازی سه بار انجام و سه فاز بوتانل با هم مخلوط و سپس با روتاری در خلاء و دمای ۵۵ درجه سانتی گراد تبخیر وبدین ترتیب ساپونین خالص تهیه شد . این رسوب در حداقل حجم متانل ۱۰۰ درصد حل و به طریقی که گفته شده جمع آوری گردید .

رسوب دهی ساپونینها: عصاره اخیر بوسیله یک قطعه کاغذ صافی از نوع CF/G ،داخل یک سیستم فیلتری از جنس فیبر و شیشه ساخت کمپانی Millipor ، صاف گردید. برای شست و شوی کامل عصاره از ۱۰ میلی لیتر متانول استفاده شد. مخلوط فوق در یک ظرف شیشه ای ۳۰ میلی لیتری با ۵ میلی لیتر دی اتیل اتر مخلوط و بهم زده شد. درب ظرف با پارافیلم مسدود و تا ته نشین شدن مواد، بی حرکت ماند. ماده ته نشین شده تا سه بار با دی اتیل اتر مخلوط گردید. در نهایت با سانتریفوژ، مواد جامد که ساپونین خالص است جدا و بعد از خشک شدن نگهداری شد. برای آنالیز ساپونینها. از کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد (۲۵،۲۱).

آنالیز ساپونینها با کروماتوگرافی لایه نازک: ماده جامد استحصالی از بافت برگی در متانول حل گردید. مقدار ۱۵ میکرولیتر از آن بر روی پلیت نمونه گذاری شد. فاصله نمونه ها از یکدیگر ۱ سانتیمتر بود . پلیتهای آماده شده در داخل یک تانک TLC حاوی حلال مخصوص آنالیز ساپونینی گذاشته شد تا عمل حرکت ترکیبات مختلف بر روی پلیتها انجام شود. این حلال ترکیبی از استات اتیل: آب مقطر: اسید استیک بترتیب به نسبت ۷: ۲: ۲ بود. بعد از حرکت حلال به طرف بالا و پخش شدن مایع در روی پلیت، پلیت مزبور از داخل تانک خارج و در زیر هود آزمایشگاه خشک و سپس با معرف متانول: انیدرید استیک و اسید سولفوریک به نسبت ۱۰: ۱: و ۱ اسپری گردید و در داخل آون با دمای ۱۰٤ درجه سانتی گراد، بمدت ۱۵ دقیقه قرار داه شد. لکه های باندی روی پلیت اسپری شده در زیر نور ماوراء بنفش (UV) با طول موج ۳۰۰ نانومتر ناشی از دستگاه ترانس لومیناتور رؤیت شد. محاسبه Rf برای هر باند ایجاد شده صورت گرفت.

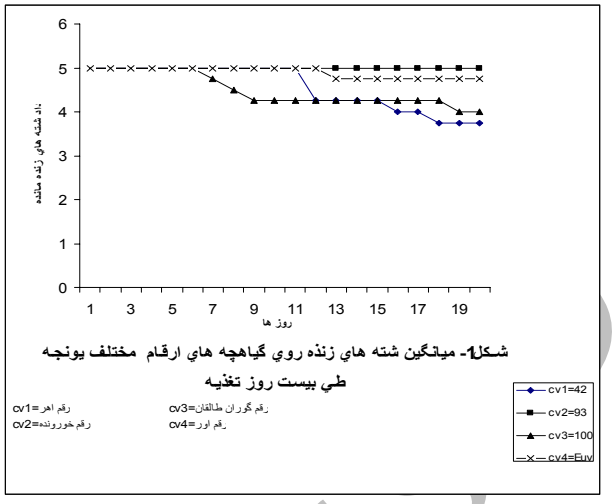
آنالیز آماری: تعداد شته های زنده باقی مانده و تعداد تجمعی پوره های تولید شده در روی گیاهچه های ارقام با تجزیه واریانس طرح کرتهای خرد شده در زمان (مشاهدات تکراری)، استفاده شد. در این آنالیز که بوسیله نرم افزار آماری MSTATC انجام شد، ارقام بعنوان فاکتور اصلی (اولین فاکتور) در ٤ سطح و روزهای بررسی بعنوان فاکتور فرعی در ۲۰ سطح برای گیاهچه های یونجه بکار رفت. برای هر تیمار تعداد ٤ تکرار در نظر گرفته شد. .

نتایج و بحث

ارزیابی زیستی۲۰ روزه شته ها تفاوت معنی داری در تعداد شته های زنده نشان نداد. تعداد شته ها در روی گیاهچه ها

Archive of SID
www.SID.ir

بمدت ۱۱ روز ثابت ماند و کم نشد. برای رقم اهر، این تعداد تا ۱۷ روز ثابت باقی ماند. میانگین شته های باقی مانده در روی ارقام گیاهی مختلف در روز بیستم برابر ٤/۳۷ شته بود.



شکل۱- میانگین شته هاي زنده روي گیاهچه هاي ارقام مختلف یونجه طي بیست روز تغذیه

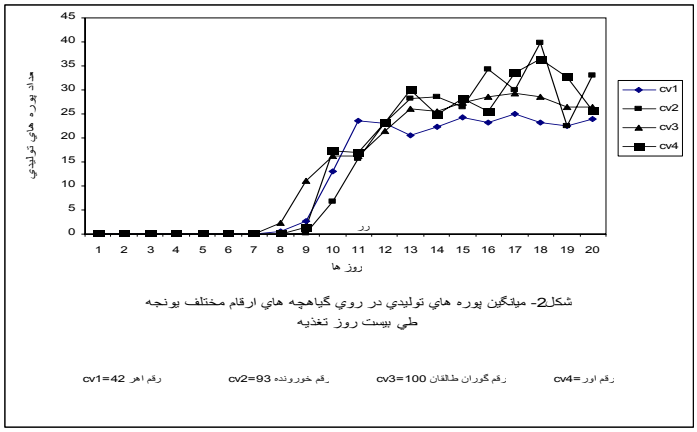
شکل۱ نشان دهنده نحوه پایداری و استقرار شته ها بر روی ارقام مختلف می باشد.

آنالیز واریانس پوره های تولیدی در جدول ۱ آمده است. هر چند از نظر تولید پورهو روند کلی تغییرات ارقام با هم تفاوت معنی داری نداشتند اما مقایسه تعداد تولید شده روی ارقام مختلف در روز های مورد مطالعه تفاوت معنی داری را در سطح ۱درصد نشان دادند. اثر متقابل رقم در زمان نیز معنی دار بود (شکل۲).

جدول۱- تجزیه واریانس داده های تعداد پوره های تولیدی مورد تغذیه در روی گیاهچه های ارقام یونجه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	Fc
تکرار	۳	۱۸۹/۹۱	۱/۵۸ ns
رقم	۳	۱۰۹/۰٤	۰/۹۱ ns
Ea	۹	۱۲۰/۳۹	
زمان	**۱۹**	۲۷۷۹/۳۸	۱۱۹/۸٤ **
زمان×رقم	۵۷	٤۱/۹۷	۱/۸۱ **
Eb	۲۲۸	۲۳/۱۹	
Ea = اشتباه اول	Eb = اشتباه دوم	ns= عدم تفاوت معنی دار	**= تفاوت در سطح ٪۱

Archive of SID
www.SID.ir



شکل2- ميانگين پوره هاي توليدي در روي گياهچه هاي ارقام مختلف يونجه طي بيست روز تغذيه

هر چند در این ارقام تفاوت ساپونینی مشهود نبود، ولی می توان بوجود احتمالی ترکیبات دیگری اشاره نمود. چنانچه می توان در این مورد، از واریته یونجه بنام زاپکو (Szapko) با مقدار ساپونین کم نام برد که از مقاومت بالا نسبت به استرس های زیستی برخوردار است (۵). این واریته را میتوان بعنوان واریته ای با اهمیت و مفید در تغذیه دام و از جهت اصلاح یونجه استفاده نمود. بنابر این می توان چنین استنباط کرد که عامل مقاومت در یونجه نسبت به تنشهای زیستی نمی تواند تنها مختص ساپونینها باشد بلکه عوامل شیمیایی و بیوشیمیایی دیگری نیز در این مقاومتها می تواند مؤثر باشد. همچنین یونجه حاوی ترکیبات دیگر مثل اسیدهای آمینه سمی، فنلها، و دیگر ترکیبات با اثرات بیولوژیکی بالا می باشد (۱۳) که بعضی از آنها مثل ساپونینها نقش ضد حشره ای دارند. عمده تحقیقات جهت کشف مکانیسم مقاومت در ارقام کلم با تکیه بر شناسایی ترکیبات ثانویه گیاهی و اثرات آنها بر روی حشرات آفت بوده است (۱۱). این نتایج فقط در مرحله گیاهچه ای می تواند مستمر باشد ولیکن افزایش سن گیاه در محیط یکسان و یا در محیط‌های مختلف می تواند نتایج مختلفی را در پی داشته باشد.

در این آزمایش، شته ها از نظر تولید پوره در مرحله گیاهچه ای یونجه تفاوت معنی داری با هم ندارند ولی مشاهده این صفت در روز های متوالی بعنوان تأثیر فاکتور زمان نظر تفاوت دیده شد (شکل۲).

در بررسی تولید تجمعی، بیشترین و کمترین تعداد پوره بترتیب روی رقم اور و رقم ٤٢ (اهر) مشاهده شد. شروع تولید پوره در رقم ٤٢ و ۱۰۰ بترتیب با میانگینهای ۱/۲۵ و ۷/۷۵ در روز هشتم و در روی ارقام ۹۳ (خورونده) و اور بترتیب با میانگینهای ۲/٤۲ و ۱۰/۱۲ در روز نهم بود. داده های حاصل از مشاهدات تقریبا ۱۲ روزه تولید پوره نشان داد که تولید پوره تا ۸ روز حالت افزایشی و در ٤ روز آخر حالت کاهشی دارد . وضعیت پوره تولیدی ارقام تا روز ۲۰ در جدول۲ مشاهده می شود.

جدول۲ – میانگینهای تجمعی پوره های تولیدی یک نسل شته های خالدار یونجه مستقر شده در روی گیاهچه های ارقام یونجه

ارقام	٤۲	۹۳	۱۰۰	اور
روز شروع تولید پوره	۸	۹	۸	۹
میانگین تولید پوره در اولین روز زاد آوری	۰/۵	۰/۲۵	۲/۲۵	۱/۵
میانگین تجمعی تولید پوره تا روز آخر (۲۰)	۲٤۷/۷۵	۲۸۸/۷۵	۳۱۵/۲۵	۲۹۵/۵۰

Archive of SID
www.SID.ir

اندازه بدن شته ها (طول و عرض شته ها) نیز در روز دهم تغذیه از گیاهچه های جوان ارقام مختلف یونجه مورد اندازه گیری قرار گرفت .همانطور که در جدول ۳ نشان می دهد تفاوت معنی داری بین ارقام متفاوت برای دو صفت مورد مطالعه مشاهده نشد.

جدول۳- تجزیه واریانس طول و عرض بدن شته های تحت تغذیه از گیاهچه های ارقام مختلف یونجه

صفت مورد بررسی	منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ضریب F محاسبه ای	ضریب تغییرات
طول بدن شته	ارقام	**۳**	۰/۰۰٤	۱/۱۹ ns	
	اشتباه آزمایشی	۹	۰/۰۰۳		٪۳/٤۷
عرض بدن شته	ارقام	۳	۰/۰۰۲	۰/٦۳ ns	
	اشتباه آزمایشی	۹	۰/۰۰۲		٪٦/٦۳

در ارزیابی اندازه بدن شته (عرض بدن) فقط و فقط رقم اور در افزایش اندازه عرض بدن شته مؤثر بود و دلیل این ممکن است اثر مثبت این رقم غیر بومی بدلیل وجود ساپونین نباشد با این حال، در صورت دخیل بودن ترکیبات دیگر موجود در ساپونینهای خام افزون بر ارقام داخلی (جدول٤)، و همچنین کاهش کیفی ساپونینهای رقم اور (شاهد) (شکل۳) می توانند از دلایل منجر به بروز اثرات پرابیوتیک در این رقم (اور) باشند. بهرحال، با توجه به نتایج فوق می توان چنین استنباط کرد که ارقام بعنوان میزبان از نظر مناسب بودن برای شته ها ، اثرات یکسان داشتند و حساسیت گیاهان نسبت به تغذیه شته ها بدلیل این است که شته خالدار بطور اختصاصی عمل می کند و ارقام از نظر دارا بودن ترکیبات بیو شیمیایی هر وضعیتی که داشته باشند، می توانند بخوبی مورد تغذیه حشرات مورد مطالعه قرار گیرند. امکان وجود آنزیمهای گوارشی هیدرولیز کننده ساپونینهای یونجه در شته خالدار نیز وجود دارد.

با کروماتوگرافی ترکیبات خام ساپونینی استخراجی از گیاهان یونجه الگو های تقریبا مشابهی روی سیلیکا ژل ظاهر شد . ساپونینهای خام حاصل از گیاهچه های رقم خارجی اور دارای تعداد باند متفاوت و بیشتری نسبت به ارقام داخلی داراست (جدول ٤). در این جدول Rf برای ساپونینهای بخشهای هوایی مشخص شده است.

١٤ باند ایجاد شده در ژل دارای رنگهای مختلفی بود . یکی از مشکلات بررسی حالت پرش و محو شدن سریع باند ها بعد از حرارت در آون بود. این مشکل می‌تواند به کیفیت مواد شیمیایی مورد استفاده نیز مربوط باشد. بهر حال، علامت گذاری روی پلیتهای TLC این امکان را میسر ساخت تا اندازه گیری Rf برای باند های مختلف فراهم شود. الگو های باندی مشاهده شده بر TLC کارمربوط به آنالیز ساپونینهای خام استخراج شده از ارقام داخلی از تشابه بالایی بر خوردار بودند. رقم خارجی اور نیز باندهایی متفاوت از ارقام داخلی را در روی ژل TLC ظاهر کرد، هر چند که از باندهای مشابه با ارقام داخلی نیز برخوردار بود. بهر حال، بهینه سازی بیشتری برای کار با TLC در شرایط موجود لازم بود که برای پژوهش در کارهای جداگانه نیز توصیه می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول٤- اندازه های Rf برای الگو های باندی ساپونینهای خام قسمتهای هوایی سه رقم گیاهچه ای یونجه ایرانی مورد مطالعه و یک رقم خارجی شاهد در روی پلیت TLC

اندازه Rf	رنگ فلوئور سنسی	رقم اور	رقم ۱۰۰ (گوران طالقان)	رقم ۹۳ همدان)	(خورونده	رقم ٤٢ (اهر)
۰/۰٤	آبی-سبز	*	–	–	–	–
۰/۰۷	آبی-سبز	*	*	*	*	*
۰/۱۲	آبی	*	–	–	–	–
۰/۱۳	قهوه ای	*	*	*	*	*
۰/۱۵	سبز	*	–	–	–	–
۰/۱۹	آبی	*	–	–	–	–
۰/۲۱	–	*	*	*	*	*
۰/۲۷	–	–	*	*	*	*
۰/۳۲	–	*	–	–	–	–
۰/۳٤	سبز	–	*	*	*	*
۰/٥٤	قهوه ای	*	–	–	–	–
۰/۹۲	ارغوانی	–	*	*	*	*
۰/۹٤	زرد	*	–	–	–	–
۱/۰۰	زرد	*	–	–	–	–

Rf= فاصله حرکت ترکیبات منحصر به فرد ساپونینی از نقطه شروع نمونه گذاری تا نقطه باند تشکیل شده به کل فاصله حرکت حلال در روی پلیت TLC.

* = وجود باند در روی پلیت TLC (تعداد زیاد علامت ستاره = شدت بیشتر رنگ باند) – = عدم وجود باند در روی پلیت TLC

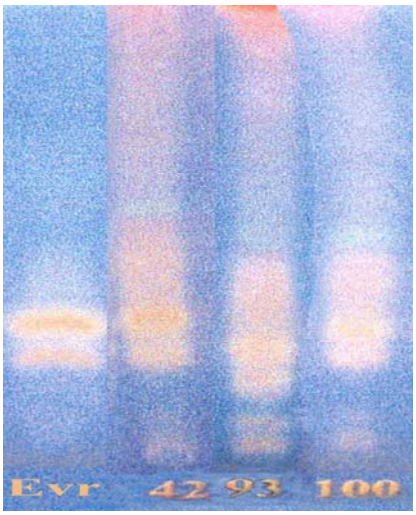
پدیده محو و نامرئی شدن باندها در ساپونینهای کنترل (شاهد) یا (رقم اور) نیز مشاهده شد . بنابراین مشکل نمی تواند به گیاهان و یا ژنوتیپ ارقام ربط داشته باشد (۲۱). در جدول٤، Rf از نسبت فاصله حرکت ترکیبات منحصر به فرد ساپونین از نقطه شروع نمونه گذاری تا نقطه تشکیل باند به کل فاصله حرکت حلال در روی پلیت TLC محاسبه می شود. با تعویض و جا به جایی بعضی مواد شیمیایی، مشکل محو شدن رنگها برطرف نشد. عدم وجود تفاوت معنی دار بعضی از صفات در بسیاری از حالات، در این آزمایشات زیست سنجی، تشابه کلی موجود و مشاهده شده در تعیین باندهای TLC را تأیید می نماید (جدول٤). با بکار گیری TLC برای ساپونینها و ساپوژنینهای استخراج شده از بافت گیاه شنبلیله، ظهور رنگهای متفاوت گزارش گردید ضمن اینکه از شاخص Rf برای بررسی ساپونینهای متنوع نیز استفاده شده است (۱). در آزمایش حاضر نیز علامت گذاری روی پلیتهای TLC این امکان را فراهم کرد تا اندازه گیری Rf مخصوص برای باند های مختلف میسر گردد. ابراهیم زاده و نیکنام (۱۳۷٤) با کشت بافت شنبلیله ساپوژنینهای استخراج شده از کالوس را با ساپونینهای حاصل از بذر با روش TLC مقایسه نمودند . آنها وجود تفاوت در نوع ساپونینهای گیاه شنبلیله را نیز گزارش کردند (۱). علاوه بر آن، محققین مربوطه چنین گزارش کردند که مقدار ساپونینهای فورواستانولی بذر در کالوس بذر بشدت کاهش می‌یابد با این حال، باند هایی به رنگ زرد (ساپونینهای اسپیرواستانولی) و نیز باند های دیگری در قسمت بالای پلیت ظاهر می گردد که همردیف آنها در بذر قابل تشخیص نیست (۱). مسلما چنین تفاوتهایی می تواند از وجود تفاوت در بخش "آگلی کن" و نیز از

Archive of SID
www.SID.ir

الیگوساکارید های متصل به آنها ناشی شود. با توجه به نقش ساپونینها در گیاهان و تأثیر پذیری آنها از محیط، تفاوتهای مشاهده شده بین ساپونینهای بذر و کالوس حاصل از شنبلیله را می توان بدین گونه تفسیر نمود که چون بافت کالوس در شرایط عاری از آلودگی قرار دارند، تشکیل ساپونینهای اسپیرواستانولی می تواند نتیجه تأثیر تنش غیر میکروبی در گیاه باشد.

در روشهای استخراج و خالص سازی ساپونینها بوسیله بوتانل اشباع از آب و متعاقباً رسوب گذاری با دی‌اتیل‌اتر، الگوی باندهای مرتبط با مخلوطی از ساپونینهای تری‌ترپنوئیدی خالص در روی پلیتهای TLC که در آزمایشگاه ساخته شده بودند بدست آمد (شکل۳). باقری و همکاران (۱۳۸۰) به ساپونینهای این مرحله از خالص سازی عنوان **β** داد. در این روش خالص سازی، مسلماً مواد قندی به داخل فاز آبی منتقل و از ترکیبات مورد نظر حذف می گردند. علاوه بر قندها، سایر ترکیبات نیز ممکن است تا حدی آبدوست بوده و حذف گردند. با این حال، ترکیبات غیر ساپونینی مثل فنلها نیز با استفاده از دی‌اتیل‌اتر در محلول شناور و در اثر سانتریفوژ و رسوب انحصاری ساپونینها حذف گردید (۲۱). شکل ۳ تصویری از وضعیت کیفی ساپونینهای بافت قسمتهای هوایی ارقام یونجه را که در آزمایشات جداگانه و در دانشگاه تهران انجام شد نشان می‌دهد (۲).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر می توان استنباط کرد که در شرایط گلخانه ای، رقم خورونده همدان (۹۳) و گوران طالقان (۱۰۰) جزء حساس ترین، و ارقام اهر (٤۲) و اور جزء ارقام گیاهی نسبتا مقاوم به شته خالدار یونجه می باشند. در مجموع قدرت زاد آوری شته ها در ارقام ۹۳ و ۱۰۰ از نظر زمانی، نسبتا زودتر و از نظر تعداد نیز در حد بالایی قرار داشت. این ارقام در آزمایشات جداگانه مزرعه ای و گلخانه ای نیز نتایج متضادی را نشان دادند (۷).



شکل۳- کروماتوگرافی لایه نازک TLC
برای ساپونینهای خالص شده ٤ رقم یونجه با بوتانل اشباع از آب
100= رقم گوران طالقان، 93= رقم خورونده همدان، 42= رقم اهر، Evr= رقم شاهد اور

جالب اینکه رقم ٤۲ بررسی شده ار نظر وضعیت مقاومت نسبت به سرخرطومی جزء حساس ترین ارقام د ر شرایط مزرعه ای بود. و در شرایط گلخانه ای نیز در زمره گیاهان خیلی حساس قرار گرفت. البته در این جا با این تعداد کم ارقام، هدف غربال کردن (سلکسیون) ارقام مقاوم نبود بلکه در صورت وجود تفاوت و تنوع در مواد ثانویه متابولیکی، هدف بررسی اثرات بیولوژیکی ساپونینها بود که آنچنان تفاوت مهمی از تکنیک لایه نازک کروماتوگرافی حاصل نشد. برای غربال کردن ارقام از نظر حساسیت و یا مقاومت نسبت به آفات، تعداد زیادی از ارقام لازم اند که در مدت کوتاهی مورد مطالعه قرار گیرند (۲٦). با توجه به نوسان اندازه جمعیت آفات از سالی به سال دیگر و تغییرات شرایط آب و هوایی، لزوم استفاده از آزمایشات مزرعه ای و گل خانه ای اجتناب ناپذیر است. لذا در جهت تعیین مقاومت و مکانیسم اصلی آن توصیه می گردد که هر دو نوع آزمایش برای بررسی مقاومت ارقام بعمل آید. انجام آزمایش برای بررسی مقاومت به تنشهای زیستی هم در مزرعه و هم در گلخانه ضروری است و در این چنین آزمایشاتی است که عمل غربال کردن نتیجه بخش است.

Archive of SID
www.SID.ir

در رابطه با اینکه نتایج مزرعه و گلخانه یکی می شود یا نه، باید با ارزیابی بهتر و بررسی محتاطانه در باره روابط بین متغیر های قابل مطالعه، قضاوت کرد (۲۲). هر چند که غربال ژنوتیپهای گندم برای مقاومت به شته روسی در شرایط اطاقک رشد، گلخانه و یا مزرعه مناسب شناخته شد. در این رابطه روش غربال ساده آزمایشگاهی (شرایط اطاقک رشد) با ارزیابی مزرعه ای منطبق بود (۸). با طریق غربال کردن ارقام مختلفی از گندم، شماری از ارقام ایرانی مقاوم به شته روسی گندم را معرفی شده‌اند (۳).

نتیجه کلی این تحقیقات این است که ساپونینها در مقاومت این ارقام نسبت به شته خالدار یونجه نقشی ندارند. لذا توصیه می گردد که برای روشن شدن تفاوت این ارقام فاکتور های دیگری مد نظر قرار گیرد. بنابراین پژوهشهای دیگری لازم است تا عامل اصلی افزایش عرض بدن شته در رقم اور روشن گردد.

منابع

۱- ابراهیم زاده، ح. و و. نیک نام. ۱۳۷٤. بررسی مقدار ترکیبات استروئیدی در کشت بافت شنبلیله (*Trigonella foenum* Graecum L.). مجله زیست شناسی ایران، ج۱، ش۱، ۵۸-٤۵

۲- باقری، م.، ب. یزدی صمدی و ح. مظاهری لقب. ۱۳۸۰. تجزیه کمی و کیفی ساپونینهای واریته های مختلف یونجه و بررسی رابطه آن‌ها با مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه. مجله علوم زراعی ایران. جلد۳. شماره۳، ٦٤-۵۲.

۳- شکاریان، ب. غ. رسولیان، و پ. آزمایش فرد. ۱۳۸۰. غربال گلخانه ای ۵۸ رقم گندم و یک رقم چاودار و یک رقم تریتیکاله در مرحله گیاهچه ای برای تعیین نسبت مقاومت آنها به شته روسی گندم (Diuraphis ***noxia***). مجله علوم کشاورزی ایران. ج۳۲، ش۱، ۲۵۳-۲۳۷.

٤- علی زاده، م. ع. ۱۳۷۹الف. ارزیابی واریته های مختلف یونجه در عکس العمل به قارچ فوزاریوم عامل بوته میری در شرایط گل خانه ای. پژوهش و سازندگی، ش٤۹، صفحات ۷-٤.

۵- علی زاده، م. ع. ۱۳۷۹ب. مقایسه واریته های یونجه در عکس العمل به قارچ فوزاریوم (*Fusarium spp*) در شرایط آزمایشگاه. پژوهش و سازندگی، ش٤۹، صفحات ۵۱-٤۹.

٦- کریمی ، ه (۱۳٦۹ب) یونجه ، چاپ اول، مرکز نشر دانشگاهی. تهران. ۲۳۷ صفحه

۷- مظاهری لقب ح. و ب. یزدی صمدی (۱۳۷۳). بررسی مقاومت ارقام یونجه به سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica* Gyll.). مجله علوم کشاورزی ایران، ج۲۵، ش۱، ص ۱۷-۱۱

۸- نجفی میرک، ت. ع. زالی، ع. ه. حسین زاده، ح. زینالی، غ. رسولیان، و ع. سعیدی. ۱۳۸۲. ارزیابی مقاومت تعدادی از ژنوتیپهای گندم نان و دروم به شته روسی گندم (*Diuraphis noxia*/Mordvilko). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. سال۷. ش٤. ۱۲۷-۱۱۵

۹- همتی، ف. ۱۳٦۸. مقاومت گیاهان در مقابل حشرات. زیتون، ش ۹۳، صفحات ۳۱-۲۸

10- Applebaum, S. W., S. Marco, and Y. Birk. 1969. Saponins as possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects. *Agric. Food Chem.* 17 (3): 618-622.

11- Bowyer, P., B. R. Clarke, P. Lunness, M. J. Daniels, and A. E. Osbourn. 1995. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science.* 267: 371-374.

12- Fenwick, G. R., K. R. Price, C. Tsukamoto and K. Okubo. 1991. Saponins in *Toxic substances in crop plants* (FelixD'Mello, J.P., C.M.Duffus and J.H.Duffus, eds.), pp. 285-327, *Royal society of chemistry*, Cambridge.

13- Gatehouse, A. M. R., B. H. Minney, P. Dobie, and V. Hilder. 1990. Biochemical resistance to bruchid attack in legume seeds; Investigation and exploitation. In: Bruchids and legumes: Economics, echology and coevolution. *Kluwer Academic Publishers*. Netherland. Pp. 241-256.

14- Gestetner, B., S. Shany, Y. Tencer, Y. Birk, and A. Bondi. 1970. LUCERN SAPONINS: II- Purification and fractionation of saponins from lucerne tops and roots and characterisationof the

Archive of SID
www.SID.ir

isolation fractions. *J. Sci. food Agric*. 21: 502-507.

15- Gorski, P. M., Miersch, J. and Ploszynski, M. 1991. Production and Biological Activity of Saponins and Canavanine in Alfalfa Seedling. *J. Chem. Ecol*. 17: 1135-1143.

16- Huhman, D.V. and L.W. Sumner. 2002. Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago trunculata* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry*. 59: 347-360

17- Kalat, P., K.R. Price and G.R. Fenwick. 1996. Changes in saponins content and composition during the ensilage of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Food Chemistry*. 56 (4): 377-380

18- Klita, P. T., G. W. Mathison, T. W. Fenton, and R. T. Hardin (1996) Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Animal. Sci*. 74: 1144-1156.

19- Massiot, G., Lavaud, C., Benkhaled, M. and Men-Oliver, L. L. (1992) Soyasaponin, A New Maltol Conjugate from Alfalfa and Soybean. *J. Nat. Prod.* 55: 1339-1342

20-Massiot, G., Lavaud, C., Guillaume, D. and Men-Oliver, L. L. (1988) Reinvestigation of the Sapogenins and Prosapogenins from Alfalfa *(Medicago sativa). J. Agric. Food Chem.* 36: 902-909

21- Mazahery-Laghab. H. 1997. Endogenous insect pest resistance factors; Engineering for enhanced resistance. Biological Science Department University of Durham, UK. *PhD Thesis*

22- Metcalf R.L. and W. H. Luckmann. 1982. Introduction to insect: Pest management. Second edition. *John Willey and Son.* 103-146.

23-Oleszek, W. (1988) Solid - Phase Extraction-Fractionation of Alfalfa Saponins. *J. Sci. Food Agric*. 44: 43-49

24- Pelah, D., Z. Abramovich, A. Markus and Z. Wiesman. 2002. The use of Commerical saponin from *Quilaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipens*. *J. of Ethnopharmacology* 81: 407-409

25- Price, K., I. T. Johnson and G. R. Fenwick. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs: in CRC Critical Reviews in food science and nutrition (Furia, T. E. ed.), 26: 27-135. USA.

26- Singh, D. P. 1986. Breeding for resistance to diseases and insect pests. *Springer-verlag*. New york

Archive of SID

www.SID.ir

Study of Saponins Extracted from the Shoots of 4 Cultivars of Alfalfa Seedlings and their effects on Spotted alfalfa Aphid (*Therioaphis maculata* Buckten) feeding

Mazahery Laghab H.[1] and Baghery A.R.[2]

[1]**Agricultural Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran**

[2]**University of Azade Eslami, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Alfalfa contains proteins and other metabolites such as alkaloids, phenolic compounds, and triterpenoid saponins. Alfalfa saponins cause bitterness and decreasing in palatability for animals. The second role is attributed to the formation of protectants against pests, pathogenes and nematodes. This factor is considered as an antibiotic against biostresses. So, it is expected that alfalfa necessarily is a resistant plant. However, specific pests and pathogens have been found to damage alfalfa and reduce yield. In order to study variability and also biological activity of saponins, the behavior of *Therioaphis maculata* was evaluated after aphids fed on the seedlings of 4 alfalfa cultivars. The neonates were transferred on seedlings. Number of suvivals, nymphs, and the size of aphids were recorded. Crude saponins were extracted using methanol 80% after cutting the tissues following freezing in liquid nitrogen and making powder in a mortar. Crude saponins were then purified with butanol following ether precipitation. TLC was used to analyze pure saponin mixtures. Different spots were expressed in variable colors but in same pattern for cultivars on TLC plate. The measurment of Rf showed no difference in saponin patterns. The usage of spotted alfalfa aphid was highly also useful for evaluation. Statistical analysis showed that survivals and nymphs were nearly the same. Although no difference of aphid sizes as well as survivals and production of nymphs in each growth stage was found between aphids feeding on different cultivars but aphid size in wide was significant when aphids were fed on cultivar Euver. However, saponins had no significant role in resistance to spotted alfalfa aphid. Further research is necessary to find out the factor increasing wide of aphid body.

Key words: Alfalfa Cultivars, Seedlings, *Therioaphis maculata*, Saponins, Feeding effects

Archive of SID

www.SID.ir