

## 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<sup>۱</sup> و علیرضا باقری<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

<sup>۲</sup> گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

### چکیده

گیاه علوفه ای یونجه مملو از ساپونینهای تری ترپنوئیدی 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 برگگی 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

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. Gatehouse و همکارانش (۱۹۹۰) بیان کردند که ترکیباتی مانند الکلئیدها، ساپونینها، اسیدهای آمینه غیر پروتئینی، پلی ساکاریدها و پروتئینهای مثل لکتین و ممانعت کننده های آنزیمی وظیفه

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 (۶).

آفت سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica* Gyll.) نماتد ها، قارچها، و بعضی باکتریها از جمله موارد محدود کننده در تولید یونجه محسوب می شوند (۴). با کنترل

۴۲ (اهر)، که قبلاً 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. بذره‌های ارقام یونجه کشت با لایه ای از ماسه پوشیده شدند. با مراقبتهای لازم، قسمتهای هوایی گیاهچه‌ها 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 پوره‌ها 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 به برگ گیاهچه‌های 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 گلدان‌ها مجهز به تورهای سیمی بسیار مرغوب بودند. برای هر رقم از گیاهچه‌های یونجه، تعداد ۴ گلدان به منزله ۴ 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

حفاظت گیاه را عهده دار هستند (۱۳). ساپونینها ترکیباتی طبیعی هستند که در گیاهان مخصوصاً لگومها و مقدار کمی در حیوانات آبری 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، ساپونین‌ها، گلیکوسایدهای تری ترپنئیدی متشکل از یک آگلی کن ۳۰ کربنه با یک یا چند شاخه قندی می باشند (۲۳،۱۸). در یونجه بیش از ۳۳ نوع آن با اثرات بیولوژیکی متفاوت شناخته شده است (۲۶،۲۴،۱۶،۱۴). رابطه بین محتویات ساپونینی در بذرها لگوم و مقاومت نسبت به لارو سوسک چهار نقطه ای حبوبات (*Callosobruchus maculatus*) در سال ۱۹۶۹ 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 شته‌های 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:** بذره‌های سه رقم یونجه، رقم ۱۰۰ (گوران طالقان)، ۹۳ (خورونده همدان)،

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 برگ 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 ۱۰:۱:۱ اسپری گردید و در داخل آون با دمای ۱۰۴ 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 کرتهاای 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 ۴ سطح و روزهای بررسی بعنوان فاکتور فرعی در ۲۰ سطح برای گیاهچه های یونجه بکار رفت. برای هر تیمار تعداد ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

### نتایج و بحث

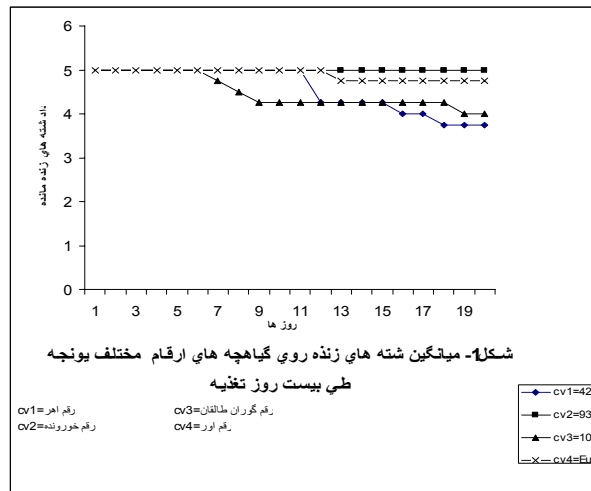
ارزیابی زیستی ۲۰ روزه شته ها تفاوت معنی داری در تعداد شته های زنده نشان نداد. تعداد شته ها در روی گیاهچه ها

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 ۴۵ 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 ۶ 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 پائینی مجدداً با همان مقدار اولیه بوتانول مخلوط و مجدداً لایه بوتانولی جدا و نگهداری گردید. این عمل جدا سازی سه بار انجام و سه فاز بوتانول با هم مخلوط و سپس با روتاری در خلاء و دمای ۵۵ درجه سانتی گراد تبخیر و بدین ترتیب ساپونین خالص تهیه شد. این رسوب در حداقل حجم متانول 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 پارافیلیم 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

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

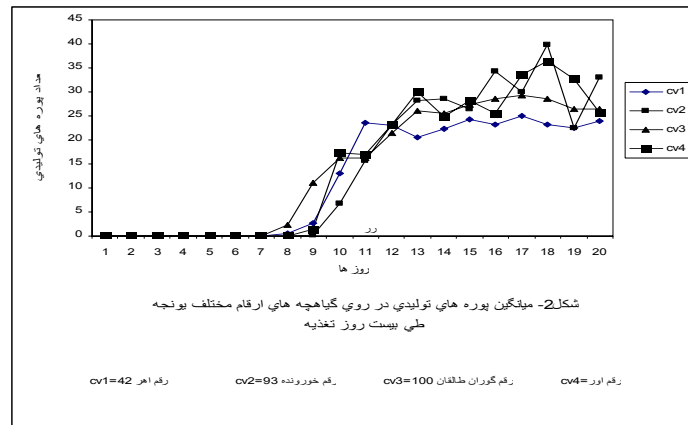


شکل ۱ نشان دهنده نحوه پایداری و استقرار شته ها بر روی ارقام مختلف می باشد.

آنالیز واریانس پوره های تولیدی در جدول ۱ آمده است. هر چند از نظر تولید پوره و روند کلی تغییرات ارقام با هم تفاوت معنی داری نداشتند اما مقایسه تعداد تولید شده روی ارقام مختلف در روزهای مورد مطالعه تفاوت معنی داری را در سطح ۱ درصد نشان دادند. اثر متقابل رقم در زمان نیز معنی دار بود (شکل ۲).

جدول ۱- 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	۱۰۹/۰۴	۰/۹۱ ns
<b>Ea</b>	۹	۱۲۰/۳۹	
زمان	۱۹	۲۷۷۹/۳۸	۱۱۹/۸۴ **
زمان×رقم	۵۷	۴۱/۹۷	۱/۸۱ **
<b>Eb</b>	۲۲۸	۲۳/۱۹	
Ea = اشتباه اول	Eb = اشتباه دوم	ns = عدم تفاوت	** = تفاوت در سطح
		معنی دار	٪۱



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 روزهای متوالی بعنوان تأثیر فاکتور زمان نظر تفاوت دیده شد (شکل ۲).

در بررسی تولید تجمعی، بیشترین و کمترین تعداد پوره بترتیب روی رقم اور و رقم ۴۲ (اهر) مشاهده شد. شروع تولید پوره در رقم ۴۲ و ۱۰۰ بترتیب با میانگینهای ۱/۲۵ و ۷/۷۵ در روز هشتم و در روی ارقام ۹۳ (خورونده) و اور بترتیب با میانگینهای ۲/۴۲ و ۱۰/۱۲ در روز نهم بود. داده های حاصل از مشاهدات تقریباً ۱۲ روزه تولید پوره نشان داد که تولید پوره تا ۸ روز حالت افزایشی و در ۴ روز آخر حالت کاهشی دارد. وضعیت پوره تولیدی ارقام تا روز ۲۰ در جدول ۲ مشاهده می شود.

هر چند در این ارقام تفاوت ساپونینی مشهود نبود، ولی می توان بوجد احتمال 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

جدول ۲ - میانگینهای تجمعی پوره های تولیدی یک نسل شته های خالدار یونجه مستقر شده در روی گیاهچه های ارقام یونجه

ارقام	۴۲	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)	۲۴۷/۷۵	۲۸۸/۷۵	۳۱۵/۲۵	۲۹۵/۵۰

دهد تفاوت معنی داری بین ارقام متفاوت برای دو صفت مورد مطالعه مشاهده نشد.

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

جدول ۳- تجزیه واریانس طول و عرض بدن شته های تحت تغذیه از گیاهچه های ارقام مختلف یونجه

صفت بررسی	مورد منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ضریب F محاسبه ای	ضریب تغییرات
طول بدن شته	ارقام	۳	۰/۰۰۴	ns	۱/۱۹
	اشتباه آزمایشی	۹	۰/۰۰۳		٪۳/۴۷
عرض بدن شته	ارقام	۳	۰/۰۰۲	ns	۰/۶۳
	اشتباه آزمایشی	۹	۰/۰۰۲		٪۶/۶۳

ظاهر شد. ساپونینهای خام حاصل از گیاهچه های رقم خارجی اور دارای تعداد باند متفاوت و بیشتری نسبت به ارقام داخلی داراست (جدول ۴). در این جدول Rf برای ساپونینهای بخشهای هوایی مشخص شده است.

۱۴ 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 آن بود. این مشکل می تواند به کیفیت مواد شیمیایی مورد استفاده نیز مربوط باشد. بهر حال، علامت گذاری روی پلتهای TLC این امکان را میسر ساخت تا اندازه گیری Rf برای باند های مختلف فراهم شود. الگو های باندها مشاهده شده بر TLC کارمربوط به آنالیز ساپونینهای خام استخراج شده از ارقام داخلی از تشابه بالایی برخوردار 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.

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 (جدول ۴)، و همچنین کاهش کیفی ساپونینهای رقم اور (شاهد) (شکل ۳) 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 بیوشیمیایی 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 تقریباً مشابهی روی سیلیکا ژل

جدول ۴- اندازه های Rf برای الگو های بانندی ساپونینهای خام قسمتهای هوایی سه رقم گیاهچه ای یونجه ایرانی مورد مطالعه و یک رقم خارجی شاهد در روی پلیت TLC

اندازه Rf	رنگ فلورنورسنسی	رقم اور	رقم ۱۰۰ (طالبان)	رقم ۹۳ (همدان)	رقم ۴۲ (اهر)
۰/۰۴	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	-	*	-	-	-
۰/۳۴	سبز	-	*	*	*
۰/۵۴	قهوه ای	*	-	-	-
۰/۹۲	ارغوانی	-	*	*	*
۰/۹۴	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

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 (۱۳۷۴) با کشت بافت شبلیله ساپونینهای استخراج شده از کالوس را با ساپونینهای حاصل از بذر با روش TLC مقایسه نمودند. آنها وجود تفاوت در نوع ساپونینهای گیاه شبلیله را نیز گزارش کردند (۱). علاوه بر آن، محققین مربوطه چنین گزارش کردند که مقدار ساپونینهای فورواستانولی بذر در کالوس بذر بشدت کاهش می یابد 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). مسلماً چنین تفاوتی می تواند از وجود تفاوت در بخش "آگلی کن" و نیز از

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 جدول ۴، 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 (جدول ۴). با بکار گیری TLC برای ساپونینها و ساپونینهای استخراج شده از بافت گیاه شبلیله، ظهور رنگهای متفاوت گزارش گردید ضمن اینکه از شاخص Rf برای بررسی ساپونینهای



شکل ۳- کروماتوگرافی لایه نازک TLC

برای ساپونینهای خالص شده ۴ 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 ۴۲ بررسی شده از نظر وضعیت مقاومت نسبت به سرخرطومی جزء حساس ترین ارقام در 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 (۲۶). 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.

الیگوساکارید های متصل به آنها ناشی شود. با توجه به نقش ساپونینها در گیاهان و تأثیر پذیری آنها از محیط، تفاوت های 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 دی اتیل اتر، الگوی باندهای مرتبط با مخلوطی از ساپونینهای تری ترینوئیدی خالص در روی پلیتهای TLC که در آزمایشگاه ساخته شده بودند بدست آمد (شکل ۳). باقری و همکاران (۱۳۸۰) به ساپونینهای این مرحله از خالص سازی عنوان  $\beta$  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 دی اتیل اتر 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 می دهد (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 (۴۲) و اور جزء ارقام گیاهی نسبتاً مقاوم به شته خالدار یونجه می باشند. در مجموع قدرت زاد آوری شته ها در ارقام ۹۳ و ۱۰۰ از نظر زمانی، نسبتاً 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).



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 می‌گردد که برای روشن شدن تفاوت این ارقام فاکتورهای دیگری مد نظر قرار گیرد. بنابراین پژوهشهای دیگری لازم است تا عامل اصلی افزایش عرض بدن شته در رقم اور روشن گردد.

در رابطه با اینکه نتایج مزرعه و گلخانه یکی می‌شود یا نه، باید با ارزیابی بهتر و بررسی محتاطانه در باره روابط بین متغیرهای 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

## منابع

- ۱- ابراهیم زاده، ح. و. نیک نام. ۱۳۷۴. بررسی مقدار ترکیبات استروئیدی در کشت بافت شنبليله (*triginella foenum Graecum L.*). مجله زیست شناسی ایران، ج ۱، ش ۱، ۵۸-۴۵
- ۲- باقری، م. ب. یزدی صمدی و ح. مظاهری لقب. ۱۳۸۰. تجزیه کمی و کیفی ساپونینهای وارسته های مختلف یونجه و بررسی رابطه آنها با مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه. مجله علوم زراعی ایران. جلد ۳. شماره ۳، ۶۴-۵۲.
- ۳- شکاریان، ب. غ. رسولیان، و ب. 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. ج ۳۲، ش ۱، ۲۵۳-۲۳۷.
- ۴- علی زاده، م. ع. ۱۳۷۹ الف. ارزیابی وارسته های مختلف یونجه در عکس العمل به قارچ فوزاریوم عامل بوته میری در شرایط گل خانه ای. پژوهش و سازندگی، ش ۴۹، صفحات ۷-۴.
- ۵- علی زاده، م. ع. ۱۳۷۹ ب. مقایسه وارسته های یونجه در عکس العمل به قارچ فوزاریوم (*Fusarium spp*) در شرایط آزمایشگاه. پژوهش و سازندگی، ش ۴۹، صفحات ۵۱-۴۹.
- ۶- کریمی، ه. (۱۳۶۹ اب) 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، ج ۲۵، ش ۱، 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. سال ۷. ش ۴. ۱۲۷-۱۱۵
- ۹- همتی، ف. ۱۳۶۸. 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* (Felix D'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, ecology 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 characterisation of the

- 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 Saponins 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 Commercial 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

## 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.<sup>1</sup> and Baghery A.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

<sup>2</sup>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 survivals, 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 measurement 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