

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر میزان ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی گیاه دارویی مینای چمنی (*Bellis perennis* L.) آلوده به قارچ و باکتری

رمضانعلی خاوری نژاد، صدیقه مهرابیان، اکرم اسدی:
دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

تعدادی از گونه‌های گیاهی ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی را به عنوان قسمتی از فرآیند طبیعی رشد و نمویشان سنتز می‌کنند. نمونه‌هایی از این گیاهان به عنوان منابع دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اهمیت این ترکیبات ناشی از خصوصیات دارویی، فعالیت ضد میکروبی و احتمالاً نقش آن‌ها به عنوان تعیین کننده‌های مقاومت گیاه در برابر بیماری است. در این پژوهش، گیاه دارویی مینای چمنی از تیره کمپوزیته، ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی خود را عمدتاً در ریشه، در پاسخ به سالیسیلیک اسید و عامل بیماری‌زا افزایش می‌دهد. نتایج حاکی از آن است که مقدار ساپونین‌ها در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید نسبت به گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و بدون آلودگی (گیاهان کنترل) افزایش پیدا کرد. همچنین مقدار ساپونین‌ها در گیاهان آلوده و بدون تیمار سالیسیلیک اسید بیش‌تر از گیاهان کنترل بود. و در زمانی که گیاهان آلوده، با سالیسیلیک اسید تیمار شدند، افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار ساپونین‌ها نسبت به گیاهان کنترل مشاهده شد. همچنین قله‌های به دست آمده از نمونه‌ها به روش HPLC و مقایسه آن‌ها با ساپونین استاندارد، نتایج فوق را تأیید کرد.

مقدمه

گیاهان متابولیت‌های ثانوی گوناگونی تولید می‌کنند، تعدادی از آن‌ها می‌توانند رشد میکروب‌ها را در شرایط *in vitro* مهار کنند. این ترکیبات مهار کننده، ممکن است در طی رشد و نمو طبیعی گیاه تولید شوند (ترکیبات ضد میکروبی عمل کننده یا فیتوانتی‌سیپین‌ها) [۲۱]، [۱۸]، [۱۲]. و یا این‌که، ممکن است در گیاهان سالم حضور نداشته باشند، بلکه تنها در پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا یا تنش (فیتوآلکسین‌ها) و همچنین ترکیبات دیگر مانند ترکیبات فنلی (سالیسیلیک اسید) تولید شوند [۱۴]، [۸]. به طور کلی ترکیبات ضد میکروبی گیاهان شامل، مجموعه متنوعی از ترکیبات از جمله: ساپونین‌ها، فنل‌ها، هیدروکسامیک اسیدهای حلقوی، گلیکوزیدهای سیانوزنیک، ایزوفلانونوئیدها، سزکونی‌ترپنوییدها، مشتقات ایندولی در بردارنده سولفور و تعدادی دیگر از ترکیبات هستند. ساپونین‌ها به عنوان یکی از متابولیت‌های ثانوی مهم، به ۳ رده اصلی تقسیم می‌شوند: ۱- گلیکوزیدهای تری‌ترپنی،

کلمات کلیدی: سالیسیلیک اسید - ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی - مینای چمنی - باکتری و قارچ.

۲- گلیکوزیدهای استروئیدی^۳- گلیکوزیدهای آلکالوئیدی استروئیدی. این ترکیبات با یکی از این ساختارها و با هر ۳ ساختار در تعدادی از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند [۱۸]، [۱۶]، [۱۱]، [۵]. اهمیت این ترکیبات به این دلیل است که تعدادی از آن‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی مؤثری هستند و اغلب در مقادیر بالایی در گیاهان سالم یافت می‌شوند، این مولکول‌ها به عنوان حفاظت کننده‌های گیاهی^۱ ضد میکروبی شناخته شده‌اند [۱۸]، [۱۶]، [۱۲]، [۱۱]، [۵]. برای مثال در عصاره ریشه‌های گیاه مینای چمنی، مخلوطی از چهار ساپونین تری تربنوییدی، بلیس ساپونین‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ (BA1, BA2, BA3, BA4) شناسایی شده است. و ساپونین‌های موجود به عنوان عوامل تعیین کننده، در مقاومت مینای چمنی در برابر عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۹]، [۱۵]. بنا براین، پژوهش حاضر درصدد فراهم آوردن شرايطی است که بتوان تولید ساپونین‌های موجود در گیاه دارویی مینای چمنی را، که از ساپونین‌های تری تربنوییدی است، در مواقعی که گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرد با استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید به حداکثر رساند. زیرا پژوهش‌های موجود نشان می‌دهد، زمانی که کشت‌های سوسپانسیون سلولی توتون با رها کننده‌های قارچی^۲ مجاور می‌شوند، میزان سنتز استرول‌ها و الفاکندنه‌های سنتز ساپونین افزایش می‌یابد. به طوری که غالب ساختار ساپونین‌های تولید شده سزکوئی تربنوییدی است [۱۰]، [۱]. اخیراً توتون تولید کننده سالیسیلیک اسید نهادی^۳ به وسیله ورود ژن-entC از باکتری اشریشیاکلی^۴ و ژن-pms از باکتری *Pseudomonas fluorescens*^۵ در گیاه توتون^۶، تولید شده است. این ژن‌ها به ترتیب کد کننده آنزیم‌های ایزوکوریسمات سنتاز (ICS) و ایزوکوریسمات پیرووات لیاز (IPL) هستند. هر دو آنزیم در تولید سالیسیلیک اسید در میکروارگانیسم‌ها نقش دارند [۱۰]، [۹]. تولید نهادی سالیسیلیک اسید، بیان ژن‌های درگیر در مقاومت اکتسابی همگانی (SAR) را افزایش داده و موجب می‌گردد، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) بطور نهادی در گیاهان تولید شوند [۲۲]. از طرف دیگر مشاهده شده، همزمان با افزایش SAR و تولید پروتئین‌های PR، تولید ساپونین تنها در محل آلودگی القا می‌شود، بطوریکه این القای سریع و مؤثر در محل آلودگی موجب آسیب کمتری به گیاه می‌گردد، و در نتیجه طول عمر گیاه افزایش می‌یابد [۴]. برای مثال تولید پروتئین‌های PR توسط فیتوفتور/کیپسیسی^۷ در کشت سوسپانسیون سلولی فلفل، تجمع فیتوالکسین سزکوئی تربنویید کیپسیدیول را تنها در محل آلودگی القا می‌کند [۱۰]، [۳]. همین‌طور گیاهان توتون-CSA^۸ ای یافت شده‌اند، که مقاومت بیش‌تری در مقابل آلودگی‌های قارچی نشان دادند [۲۲]. بنا براین تولید گیاهان تولید کننده سالیسیلیک اسید، که در نهایت منجر به تولید ترکیبات ضد میکروبی مفید از جمله ساپونین‌ها و افزایش مقاومت گیاه در برابر آلودگی می‌گردد، از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه خواهد بود. البته در این پژوهش شرايطی فراهم شده تا سالیسیلیک اسید، به شکل یک تیمار خارجی به گیاه داده شود، تا بتوان اثر این ترکیب را در میزان تولید

^۱ Phytoprotectants ^۲ Fungal elicitor ^۳ Constitutive salicylic acid producing (CSA)

^۴ *Escherichia coli* ^۵ *Pseudomonas fluorescens* ^۶ *Nicotiana tabacum*

^۷ *Phytophthora capsici*

ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی گیاه مینای چمنی در زمان آلودگی مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان

بعد از تهیه بذرها از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، بخش گیاهان دارویی، و ضد عفونی آن‌ها، بستر مورد نیاز برای انتقال بذرها شامل $\frac{2}{3}$ ماسه و $\frac{1}{3}$ رس تهیه شده و سپس بذرها به این سطح انتقال یافت. گلدان‌ها در مقابل پنجره قرار داده شدند و بعد از جوانه‌زنی، گلدان‌های حاوی دانمرست به اتاق کشت (بانک نوری) منتقل گردیدند. مقدار نور در طول روز نوسان داشت. در صبح مقدار نور ۲۵۸۵ لوکس بود و این مقدار افزایش می‌یافت تا اینکه به ۳۰۰۰ لوکس در میانه روز می‌رسید و این مقدار در عصر به همان مقدار نور در صبح می‌رسید. بنا براین برای به حداقل رساندن آثار میکروکلیمایی در محوطه رشد گیاه، گردش وضعی و جابجایی تصادفی گلدان‌ها به طور روزانه در دوره رشد انجام پذیرفت. از روز دهم تا بیست و پنجم حجم معینی از محلول غذایی هوگلند به ترتیب با غلظت‌های $\frac{1}{2}$ ، $\frac{1}{4}$ ، $\frac{1}{8}$ و کامل به نسبت وزن معینی از خاک به گلدان‌ها اضافه شد. از روز بیست و نهم که گیاهان در آستانه تشکیل برگ سوم بودند، تیماردهی با غلظت‌های ۷، ۳ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید آغاز شد.

زمان و روش تلقیح

میکروارگانیزم‌های مورد پژوهش به طور خالص از مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، بخش باکتریولوژی تهیه شد. سرده جنس باکتری و قارچ مورد مطالعه به ترتیب عبارتند از: *اروینیا کاروتوورا*^۱ و *آلترناریا اس پی پی*^۲. میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش از لحاظ خالص بودن مورد بررسی قرار گرفتند. و جهت حفظ باکتری‌ها و قارچ‌ها هر پانزده روز یک بار بر روی محیط کشت جدید از سویه‌های فوق، کشت جدید تهیه می‌شد. عمل تلقیح بر طبق روش انیدی [۲] شصت روز پس از جوانه‌زنی انجام شد. در هر گیاه سطح تحتانی دو برگ با سرنگ بدون سوزن استریل زخمی شد. سپس ماده تلقیحی تهیه شده (در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری (10^8 بر میلی‌لیتر CFU) همچنین در ۱۵ میلی‌لیتر دی‌گر آب مقطر استریل یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی (10^6 بر میلی‌لیتر spore) اضافه شد و بر روی گیاه مربوطه پاشیده شد و ماده تلقیحی بر روی محل زخم با دست به آرامی مالش داده شد تا از نفوذ میکروارگانیزم مربوطه اطمینان حاصل گردد، سپس گیاهان تلقیح شده به وسیله قارچ یا باکتری به مدت ۴۸ ساعت به طور جداگانه در اتاق‌های تاریک قرار گرفتند، و بعد از این مدت به اتاق کشت جداگانه (بانک نوری) منتقل شدند. از روز اول تا روز دهم بعد از

۱-Erwinia carotovora ۲-Alternaria spp.

تلقیح که معادل روز هفتام و زمان برداشت بود، شدت بیماری در طی روز گزارش شد.

روش استخراج ساپونین

مقدار معینی از پودر ریشه همراه با متانل ۸۰ درصد، در یک بالن ریخته (به ازای هر گرم ماده گیاهی ۱۰ میلی‌لیتر متانل استفاده شد) و با کمک میرد و دستگاه بن ماری به مدت یک ساعت نمونه‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد رفلکس شدند، پس از سرد شدن، عصاره حاصل از رفلکس صاف شده و با دستگاه تبخیر کننده گردان^۱ به منظور تبخیر حلال تبخیر شد. سپس عصاره حاصل، در مقدار کمی آب مقطر حل شد. به منظور چربی‌زدایی از مخلوط کلروفرم و آب با نسبت (۱:۱) (H₂O:CHCl₃) استفاده شد. سپس لایه چربی‌زدایی شده با n-بوتانل اشباع شده با آب، به منظور ورود ساپونین به این فاز، مخلوط شد. پس از گذشت زمان معینی دو لایه تشکیل گردید. لایه بالایی که دارای n-بوتانل بود، با دستگاه روتاری تبخیر گردید. عصاره باقی مانده در مقدار کمی متانل حل شد و برای رسوب ساپونین، عصاره متانلی بر روی دی‌اتیل اتر (Et₂O) قطره قطره ریخته شد. از عصاره متانلی حل شده در دی‌اتیل اتر به منظور سنجش ساپونین به وسیله کروماتوگرافی ستونی استفاده شد [۱۹].

شناسایی ساپونین با روش HPLC

در سنجش ساپونین، نمونه استخراجی از ریشه در آخرین مرحله وارد فرآیند جداسازی توسط کروماتوگرافی ستونی (پیش ستون) شد. بدین منظور یک ستون شیشه‌ای به طول ۵۰ سانتی متر و قطر داخلی ۱۲ میلی‌متر از سیلیکاژل به عنوان فاز ثابت در نظر گرفته شد. این فاز در محلول حاوی فاز متحرک شامل: تری کلرومتان، متانل، آب با نسبت (۲:۱۰:۱۵) به تعادل رسید. فاز متحرک به همراه نمونه در فضای داخل فاز ثابت با سرعت ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت به حرکت درآمد، و از برم فنل بلو به عنوان اندیکاتور برای نشانه‌گذاری فاز متحرک استفاده شد. تغییرات جذب توسط آشکارساز مدل «دکتوریونیکوم»^۲ ارزیابی و نقاط دارای جذب به هم ارتباط یافت و توسط ثبات به صورت منحنی رسم گردید. محلول خروجی از آشکارساز در فاصله‌ای که جذب قابل توجه بود، برای مرحله بعد با استفاده از HPLC جمع آوری شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به دستگاه HPLC مدل «کریستال ۲۰۰»^۳ (رکورد دستگاه فیلیپس پی‌ام^۴ ۸۲۶۱) تزریق شد و با ستون C_{۱۸} با ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر تحت شرایط ایزوکراتیک عمل شستشو توسط متانل ۷۵٪ و سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. جذب توسط آشکارساز در ۲۲۵ نانومتر برای وجود ساپونین‌های تری ترپنوئیدی تعیین شد. برای تعیین غلظت ساپونین نمونه‌ها از نمونه استاندارد مرک^۵ ۵۰٪ با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۷، ۰/۰۸، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۱۲، ۰/۱۴، ۰/۱۶، ۰/۱۸، ۰/۲۰، ۰/۲۲، ۰/۲۴، ۰/۲۶، ۰/۲۸، ۰/۳۰، ۰/۳۲، ۰/۳۴، ۰/۳۶، ۰/۳۸، ۰/۴۰، ۰/۴۲، ۰/۴۴، ۰/۴۶، ۰/۴۸، ۰/۵۰، ۰/۵۲، ۰/۵۴، ۰/۵۶، ۰/۵۸، ۰/۶۰، ۰/۶۲، ۰/۶۴، ۰/۶۶، ۰/۶۸، ۰/۷۰، ۰/۷۲، ۰/۷۴، ۰/۷۶، ۰/۷۸، ۰/۸۰، ۰/۸۲، ۰/۸۴، ۰/۸۶، ۰/۸۸، ۰/۹۰، ۰/۹۲، ۰/۹۴، ۰/۹۶، ۰/۹۸، ۰/۱۰۰، ۰/۱۰۲، ۰/۱۰۴، ۰/۱۰۶، ۰/۱۰۸، ۰/۱۱۰، ۰/۱۱۲، ۰/۱۱۴، ۰/۱۱۶، ۰/۱۱۸، ۰/۱۲۰، ۰/۱۲۲، ۰/۱۲۴، ۰/۱۲۶، ۰/۱۲۸، ۰/۱۳۰، ۰/۱۳۲، ۰/۱۳۴، ۰/۱۳۶، ۰/۱۳۸، ۰/۱۴۰، ۰/۱۴۲، ۰/۱۴۴، ۰/۱۴۶، ۰/۱۴۸، ۰/۱۵۰، ۰/۱۵۲، ۰/۱۵۴، ۰/۱۵۶، ۰/۱۵۸، ۰/۱۶۰، ۰/۱۶۲، ۰/۱۶۴، ۰/۱۶۶، ۰/۱۶۸، ۰/۱۷۰، ۰/۱۷۲، ۰/۱۷۴، ۰/۱۷۶، ۰/۱۷۸، ۰/۱۸۰، ۰/۱۸۲، ۰/۱۸۴، ۰/۱۸۶، ۰/۱۸۸، ۰/۱۹۰، ۰/۱۹۲، ۰/۱۹۴، ۰/۱۹۶، ۰/۱۹۸، ۰/۲۰۰، ۰/۲۰۲، ۰/۲۰۴، ۰/۲۰۶، ۰/۲۰۸، ۰/۲۱۰، ۰/۲۱۲، ۰/۲۱۴، ۰/۲۱۶، ۰/۲۱۸، ۰/۲۲۰، ۰/۲۲۲، ۰/۲۲۴، ۰/۲۲۶، ۰/۲۲۸، ۰/۲۳۰، ۰/۲۳۲، ۰/۲۳۴، ۰/۲۳۶، ۰/۲۳۸، ۰/۲۴۰، ۰/۲۴۲، ۰/۲۴۴، ۰/۲۴۶، ۰/۲۴۸، ۰/۲۵۰، ۰/۲۵۲، ۰/۲۵۴، ۰/۲۵۶، ۰/۲۵۸، ۰/۲۶۰، ۰/۲۶۲، ۰/۲۶۴، ۰/۲۶۶، ۰/۲۶۸، ۰/۲۷۰، ۰/۲۷۲، ۰/۲۷۴، ۰/۲۷۶، ۰/۲۷۸، ۰/۲۸۰، ۰/۲۸۲، ۰/۲۸۴، ۰/۲۸۶، ۰/۲۸۸، ۰/۲۹۰، ۰/۲۹۲، ۰/۲۹۴، ۰/۲۹۶، ۰/۲۹۸، ۰/۳۰۰، ۰/۳۰۲، ۰/۳۰۴، ۰/۳۰۶، ۰/۳۰۸، ۰/۳۱۰، ۰/۳۱۲، ۰/۳۱۴، ۰/۳۱۶، ۰/۳۱۸، ۰/۳۲۰، ۰/۳۲۲، ۰/۳۲۴، ۰/۳۲۶، ۰/۳۲۸، ۰/۳۳۰، ۰/۳۳۲، ۰/۳۳۴، ۰/۳۳۶، ۰/۳۳۸، ۰/۳۴۰، ۰/۳۴۲، ۰/۳۴۴، ۰/۳۴۶، ۰/۳۴۸، ۰/۳۵۰، ۰/۳۵۲، ۰/۳۵۴، ۰/۳۵۶، ۰/۳۵۸، ۰/۳۶۰، ۰/۳۶۲، ۰/۳۶۴، ۰/۳۶۶، ۰/۳۶۸، ۰/۳۷۰، ۰/۳۷۲، ۰/۳۷۴، ۰/۳۷۶، ۰/۳۷۸، ۰/۳۸۰، ۰/۳۸۲، ۰/۳۸۴، ۰/۳۸۶، ۰/۳۸۸، ۰/۳۹۰، ۰/۳۹۲، ۰/۳۹۴، ۰/۳۹۶، ۰/۳۹۸، ۰/۴۰۰، ۰/۴۰۲، ۰/۴۰۴، ۰/۴۰۶، ۰/۴۰۸، ۰/۴۱۰، ۰/۴۱۲، ۰/۴۱۴، ۰/۴۱۶، ۰/۴۱۸، ۰/۴۲۰، ۰/۴۲۲، ۰/۴۲۴، ۰/۴۲۶، ۰/۴۲۸، ۰/۴۳۰، ۰/۴۳۲، ۰/۴۳۴، ۰/۴۳۶، ۰/۴۳۸، ۰/۴۴۰، ۰/۴۴۲، ۰/۴۴۴، ۰/۴۴۶، ۰/۴۴۸، ۰/۴۵۰، ۰/۴۵۲، ۰/۴۵۴، ۰/۴۵۶، ۰/۴۵۸، ۰/۴۶۰، ۰/۴۶۲، ۰/۴۶۴، ۰/۴۶۶، ۰/۴۶۸، ۰/۴۷۰، ۰/۴۷۲، ۰/۴۷۴، ۰/۴۷۶، ۰/۴۷۸، ۰/۴۸۰، ۰/۴۸۲، ۰/۴۸۴، ۰/۴۸۶، ۰/۴۸۸، ۰/۴۹۰، ۰/۴۹۲، ۰/۴۹۴، ۰/۴۹۶، ۰/۴۹۸، ۰/۵۰۰، ۰/۵۰۲، ۰/۵۰۴، ۰/۵۰۶، ۰/۵۰۸، ۰/۵۱۰، ۰/۵۱۲، ۰/۵۱۴، ۰/۵۱۶، ۰/۵۱۸، ۰/۵۲۰، ۰/۵۲۲، ۰/۵۲۴، ۰/۵۲۶، ۰/۵۲۸، ۰/۵۳۰، ۰/۵۳۲، ۰/۵۳۴، ۰/۵۳۶، ۰/۵۳۸، ۰/۵۴۰، ۰/۵۴۲، ۰/۵۴۴، ۰/۵۴۶، ۰/۵۴۸، ۰/۵۵۰، ۰/۵۵۲، ۰/۵۵۴، ۰/۵۵۶، ۰/۵۵۸، ۰/۵۶۰، ۰/۵۶۲، ۰/۵۶۴، ۰/۵۶۶، ۰/۵۶۸، ۰/۵۷۰، ۰/۵۷۲، ۰/۵۷۴، ۰/۵۷۶، ۰/۵۷۸، ۰/۵۸۰، ۰/۵۸۲، ۰/۵۸۴، ۰/۵۸۶، ۰/۵۸۸، ۰/۵۹۰، ۰/۵۹۲، ۰/۵۹۴، ۰/۵۹۶، ۰/۵۹۸، ۰/۶۰۰، ۰/۶۰۲، ۰/۶۰۴، ۰/۶۰۶، ۰/۶۰۸، ۰/۶۱۰، ۰/۶۱۲، ۰/۶۱۴، ۰/۶۱۶، ۰/۶۱۸، ۰/۶۲۰، ۰/۶۲۲، ۰/۶۲۴، ۰/۶۲۶، ۰/۶۲۸، ۰/۶۳۰، ۰/۶۳۲، ۰/۶۳۴، ۰/۶۳۶، ۰/۶۳۸، ۰/۶۴۰، ۰/۶۴۲، ۰/۶۴۴، ۰/۶۴۶، ۰/۶۴۸، ۰/۶۵۰، ۰/۶۵۲، ۰/۶۵۴، ۰/۶۵۶، ۰/۶۵۸، ۰/۶۶۰، ۰/۶۶۲، ۰/۶۶۴، ۰/۶۶۶، ۰/۶۶۸، ۰/۶۷۰، ۰/۶۷۲، ۰/۶۷۴، ۰/۶۷۶، ۰/۶۷۸، ۰/۶۸۰، ۰/۶۸۲، ۰/۶۸۴، ۰/۶۸۶، ۰/۶۸۸، ۰/۶۹۰، ۰/۶۹۲، ۰/۶۹۴، ۰/۶۹۶، ۰/۶۹۸، ۰/۷۰۰، ۰/۷۰۲، ۰/۷۰۴، ۰/۷۰۶، ۰/۷۰۸، ۰/۷۱۰، ۰/۷۱۲، ۰/۷۱۴، ۰/۷۱۶، ۰/۷۱۸، ۰/۷۲۰، ۰/۷۲۲، ۰/۷۲۴، ۰/۷۲۶، ۰/۷۲۸، ۰/۷۳۰، ۰/۷۳۲، ۰/۷۳۴، ۰/۷۳۶، ۰/۷۳۸، ۰/۷۴۰، ۰/۷۴۲، ۰/۷۴۴، ۰/۷۴۶، ۰/۷۴۸، ۰/۷۵۰، ۰/۷۵۲، ۰/۷۵۴، ۰/۷۵۶، ۰/۷۵۸، ۰/۷۶۰، ۰/۷۶۲، ۰/۷۶۴، ۰/۷۶۶، ۰/۷۶۸، ۰/۷۷۰، ۰/۷۷۲، ۰/۷۷۴، ۰/۷۷۶، ۰/۷۷۸، ۰/۷۸۰، ۰/۷۸۲، ۰/۷۸۴، ۰/۷۸۶، ۰/۷۸۸، ۰/۷۹۰، ۰/۷۹۲، ۰/۷۹۴، ۰/۷۹۶، ۰/۷۹۸، ۰/۸۰۰، ۰/۸۰۲، ۰/۸۰۴، ۰/۸۰۶، ۰/۸۰۸، ۰/۸۱۰، ۰/۸۱۲، ۰/۸۱۴، ۰/۸۱۶، ۰/۸۱۸، ۰/۸۲۰، ۰/۸۲۲، ۰/۸۲۴، ۰/۸۲۶، ۰/۸۲۸، ۰/۸۳۰، ۰/۸۳۲، ۰/۸۳۴، ۰/۸۳۶، ۰/۸۳۸، ۰/۸۴۰، ۰/۸۴۲، ۰/۸۴۴، ۰/۸۴۶، ۰/۸۴۸، ۰/۸۵۰، ۰/۸۵۲، ۰/۸۵۴، ۰/۸۵۶، ۰/۸۵۸، ۰/۸۶۰، ۰/۸۶۲، ۰/۸۶۴، ۰/۸۶۶، ۰/۸۶۸، ۰/۸۷۰، ۰/۸۷۲، ۰/۸۷۴، ۰/۸۷۶، ۰/۸۷۸، ۰/۸۸۰، ۰/۸۸۲، ۰/۸۸۴، ۰/۸۸۶، ۰/۸۸۸، ۰/۸۹۰، ۰/۸۹۲، ۰/۸۹۴، ۰/۸۹۶، ۰/۸۹۸، ۰/۹۰۰، ۰/۹۰۲، ۰/۹۰۴، ۰/۹۰۶، ۰/۹۰۸، ۰/۹۱۰، ۰/۹۱۲، ۰/۹۱۴، ۰/۹۱۶، ۰/۹۱۸، ۰/۹۲۰، ۰/۹۲۲، ۰/۹۲۴، ۰/۹۲۶، ۰/۹۲۸، ۰/۹۳۰، ۰/۹۳۲، ۰/۹۳۴، ۰/۹۳۶، ۰/۹۳۸، ۰/۹۴۰، ۰/۹۴۲، ۰/۹۴۴، ۰/۹۴۶، ۰/۹۴۸، ۰/۹۵۰، ۰/۹۵۲، ۰/۹۵۴، ۰/۹۵۶، ۰/۹۵۸، ۰/۹۶۰، ۰/۹۶۲، ۰/۹۶۴، ۰/۹۶۶، ۰/۹۶۸، ۰/۹۷۰، ۰/۹۷۲، ۰/۹۷۴، ۰/۹۷۶، ۰/۹۷۸، ۰/۹۸۰، ۰/۹۸۲، ۰/۹۸۴، ۰/۹۸۶، ۰/۹۸۸، ۰/۹۹۰، ۰/۹۹۲، ۰/۹۹۴، ۰/۹۹۶، ۰/۹۹۸، ۰/۱۰۰۰، ۰/۱۰۰۲، ۰/۱۰۰۴، ۰/۱۰۰۶، ۰/۱۰۰۸، ۰/۱۰۱۰، ۰/۱۰۱۲، ۰/۱۰۱۴، ۰/۱۰۱۶، ۰/۱۰۱۸، ۰/۱۰۲۰، ۰/۱۰۲۲، ۰/۱۰۲۴، ۰/۱۰۲۶، ۰/۱۰۲۸، ۰/۱۰۳۰، ۰/۱۰۳۲، ۰/۱۰۳۴، ۰/۱۰۳۶، ۰/۱۰۳۸، ۰/۱۰۴۰، ۰/۱۰۴۲، ۰/۱۰۴۴، ۰/۱۰۴۶، ۰/۱۰۴۸، ۰/۱۰۵۰، ۰/۱۰۵۲، ۰/۱۰۵۴، ۰/۱۰۵۶، ۰/۱۰۵۸، ۰/۱۰۶۰، ۰/۱۰۶۲، ۰/۱۰۶۴، ۰/۱۰۶۶، ۰/۱۰۶۸، ۰/۱۰۷۰، ۰/۱۰۷۲، ۰/۱۰۷۴، ۰/۱۰۷۶، ۰/۱۰۷۸، ۰/۱۰۸۰، ۰/۱۰۸۲، ۰/۱۰۸۴، ۰/۱۰۸۶، ۰/۱۰۸۸، ۰/۱۰۹۰، ۰/۱۰۹۲، ۰/۱۰۹۴، ۰/۱۰۹۶، ۰/۱۰۹۸، ۰/۱۱۰۰، ۰/۱۱۰۲، ۰/۱۱۰۴، ۰/۱۱۰۶، ۰/۱۱۰۸، ۰/۱۱۱۰، ۰/۱۱۱۲، ۰/۱۱۱۴، ۰/۱۱۱۶، ۰/۱۱۱۸، ۰/۱۱۲۰، ۰/۱۱۲۲، ۰/۱۱۲۴، ۰/۱۱۲۶، ۰/۱۱۲۸، ۰/۱۱۳۰، ۰/۱۱۳۲، ۰/۱۱۳۴، ۰/۱۱۳۶، ۰/۱۱۳۸، ۰/۱۱۴۰، ۰/۱۱۴۲، ۰/۱۱۴۴، ۰/۱۱۴۶، ۰/۱۱۴۸، ۰/۱۱۵۰، ۰/۱۱۵۲، ۰/۱۱۵۴، ۰/۱۱۵۶، ۰/۱۱۵۸، ۰/۱۱۶۰، ۰/۱۱۶۲، ۰/۱۱۶۴، ۰/۱۱۶۶، ۰/۱۱۶۸، ۰/۱۱۷۰، ۰/۱۱۷۲، ۰/۱۱۷۴، ۰/۱۱۷۶، ۰/۱۱۷۸، ۰/۱۱۸۰، ۰/۱۱۸۲، ۰/۱۱۸۴، ۰/۱۱۸۶، ۰/۱۱۸۸، ۰/۱۱۹۰، ۰/۱۱۹۲، ۰/۱۱۹۴، ۰/۱۱۹۶، ۰/۱۱۹۸، ۰/۱۲۰۰، ۰/۱۲۰۲، ۰/۱۲۰۴، ۰/۱۲۰۶، ۰/۱۲۰۸، ۰/۱۲۱۰، ۰/۱۲۱۲، ۰/۱۲۱۴، ۰/۱۲۱۶، ۰/۱۲۱۸، ۰/۱۲۲۰، ۰/۱۲۲۲، ۰/۱۲۲۴، ۰/۱۲۲۶، ۰/۱۲۲۸، ۰/۱۲۳۰، ۰/۱۲۳۲، ۰/۱۲۳۴، ۰/۱۲۳۶، ۰/۱۲۳۸، ۰/۱۲۴۰، ۰/۱۲۴۲، ۰/۱۲۴۴، ۰/۱۲۴۶، ۰/۱۲۴۸، ۰/۱۲۵۰، ۰/۱۲۵۲، ۰/۱۲۵۴، ۰/۱۲۵۶، ۰/۱۲۵۸، ۰/۱۲۶۰، ۰/۱۲۶۲، ۰/۱۲۶۴، ۰/۱۲۶۶، ۰/۱۲۶۸، ۰/۱۲۷۰، ۰/۱۲۷۲، ۰/۱۲۷۴، ۰/۱۲۷۶، ۰/۱۲۷۸، ۰/۱۲۸۰، ۰/۱۲۸۲، ۰/۱۲۸۴، ۰/۱۲۸۶، ۰/۱۲۸۸، ۰/۱۲۹۰، ۰/۱۲۹۲، ۰/۱۲۹۴، ۰/۱۲۹۶، ۰/۱۲۹۸، ۰/۱۳۰۰، ۰/۱۳۰۲، ۰/۱۳۰۴، ۰/۱۳۰۶، ۰/۱۳۰۸، ۰/۱۳۱۰، ۰/۱۳۱۲، ۰/۱۳۱۴، ۰/۱۳۱۶، ۰/۱۳۱۸، ۰/۱۳۲۰، ۰/۱۳۲۲، ۰/۱۳۲۴، ۰/۱۳۲۶، ۰/۱۳۲۸، ۰/۱۳۳۰، ۰/۱۳۳۲، ۰/۱۳۳۴، ۰/۱۳۳۶، ۰/۱۳۳۸، ۰/۱۳۴۰، ۰/۱۳۴۲، ۰/۱۳۴۴، ۰/۱۳۴۶، ۰/۱۳۴۸، ۰/۱۳۵۰، ۰/۱۳۵۲، ۰/۱۳۵۴، ۰/۱۳۵۶، ۰/۱۳۵۸، ۰/۱۳۶۰، ۰/۱۳۶۲، ۰/۱۳۶۴، ۰/۱۳۶۶، ۰/۱۳۶۸، ۰/۱۳۷۰، ۰/۱۳۷۲، ۰/۱۳۷۴، ۰/۱۳۷۶، ۰/۱۳۷۸، ۰/۱۳۸۰، ۰/۱۳۸۲، ۰/۱۳۸۴، ۰/۱۳۸۶، ۰/۱۳۸۸، ۰/۱۳۹۰، ۰/۱۳۹۲، ۰/۱۳۹۴، ۰/۱۳۹۶، ۰/۱۳۹۸، ۰/۱۴۰۰، ۰/۱۴۰۲، ۰/۱۴۰۴، ۰/۱۴۰۶، ۰/۱۴۰۸، ۰/۱۴۱۰، ۰/۱۴۱۲، ۰/۱۴۱۴، ۰/۱۴۱۶، ۰/۱۴۱۸، ۰/۱۴۲۰، ۰/۱۴۲۲، ۰/۱۴۲۴، ۰/۱۴۲۶، ۰/۱۴۲۸، ۰/۱۴۳۰، ۰/۱۴۳۲، ۰/۱۴۳۴، ۰/۱۴۳۶، ۰/۱۴۳۸، ۰/۱۴۴۰، ۰/۱۴۴۲، ۰/۱۴۴۴، ۰/۱۴۴۶، ۰/۱۴۴۸، ۰/۱۴۵۰، ۰/۱۴۵۲، ۰/۱۴۵۴، ۰/۱۴۵۶، ۰/۱۴۵۸، ۰/۱۴۶۰، ۰/۱۴۶۲، ۰/۱۴۶۴، ۰/۱۴۶۶، ۰/۱۴۶۸، ۰/۱۴۷۰، ۰/۱۴۷۲، ۰/۱۴۷۴، ۰/۱۴۷۶، ۰/۱۴۷۸، ۰/۱۴۸۰، ۰/۱۴۸۲، ۰/۱۴۸۴، ۰/۱۴۸۶، ۰/۱۴۸۸، ۰/۱۴۹۰، ۰/۱۴۹۲، ۰/۱۴۹۴، ۰/۱۴۹۶، ۰/۱۴۹۸، ۰/۱۵۰۰، ۰/۱۵۰۲، ۰/۱۵۰۴، ۰/۱۵۰۶، ۰/۱۵۰۸، ۰/۱۵۱۰، ۰/۱۵۱۲، ۰/۱۵۱۴، ۰/۱۵۱۶، ۰/۱۵۱۸، ۰/۱۵۲۰، ۰/۱۵۲۲، ۰/۱۵۲۴، ۰/۱۵۲۶، ۰/۱۵۲۸، ۰/۱۵۳۰، ۰/۱۵۳۲، ۰/۱۵۳۴، ۰/۱۵۳۶، ۰/۱۵۳۸، ۰/۱۵۴۰، ۰/۱۵۴۲، ۰/۱۵۴۴، ۰/۱۵۴۶، ۰/۱۵۴۸، ۰/۱۵۵۰، ۰/۱۵۵۲، ۰/۱۵۵۴، ۰/۱۵۵۶، ۰/۱۵۵۸، ۰/۱۵۶۰، ۰/۱۵۶۲، ۰/۱۵۶۴، ۰/۱۵۶۶، ۰/۱۵۶۸، ۰/۱۵۷۰، ۰/۱۵۷۲، ۰/۱۵۷۴، ۰/۱۵۷۶، ۰/۱۵۷۸، ۰/۱۵۸۰، ۰/۱۵۸۲، ۰/۱۵۸۴، ۰/۱۵۸۶، ۰/۱۵۸۸، ۰/۱۵۹۰، ۰/۱۵۹۲، ۰/۱۵۹۴، ۰/۱۵۹۶، ۰/۱۵۹۸، ۰/۱۶۰۰، ۰/۱۶۰۲، ۰/۱۶۰۴، ۰/۱۶۰۶، ۰/۱۶۰۸، ۰/۱۶۱۰، ۰/۱۶۱۲، ۰/۱۶۱۴، ۰/۱۶۱۶، ۰/۱۶۱۸، ۰/۱۶۲۰، ۰/۱۶۲۲، ۰/۱۶۲۴، ۰/۱۶۲۶، ۰/۱۶۲۸، ۰/۱۶۳۰، ۰/۱۶۳۲، ۰/۱۶۳۴، ۰/۱۶۳۶، ۰/۱۶۳۸، ۰/۱۶۴۰، ۰/۱۶۴۲، ۰/۱۶۴۴، ۰/۱۶۴۶، ۰/۱۶۴۸، ۰/۱۶۵۰، ۰/۱۶۵۲، ۰/۱۶۵۴، ۰/۱۶۵۶، ۰/۱۶۵۸، ۰/۱۶۶۰، ۰/۱۶۶۲، ۰/۱۶۶۴، ۰/۱۶۶۶، ۰/۱۶۶۸، ۰/۱۶۷۰، ۰/۱۶۷۲، ۰/۱۶۷۴، ۰/۱۶۷۶، ۰/۱۶۷۸، ۰/۱۶۸۰، ۰/۱۶۸۲، ۰/۱۶۸۴، ۰/۱۶۸۶، ۰/۱۶۸۸، ۰/۱۶۹۰، ۰/۱۶۹۲، ۰/۱۶۹۴، ۰/۱۶۹۶، ۰/۱۶۹۸، ۰/۱۷۰۰، ۰/۱۷۰۲، ۰/۱۷۰۴، ۰/۱۷۰۶، ۰/۱۷۰۸، ۰/۱۷۱۰، ۰/۱۷۱۲، ۰/۱۷۱۴، ۰/۱۷۱۶، ۰/۱۷۱۸، ۰/۱۷۲۰، ۰/۱۷۲۲، ۰/۱۷۲۴، ۰/۱۷۲۶، ۰/۱۷۲۸، ۰/۱۷۳۰، ۰/۱۷۳۲، ۰/۱۷۳۴، ۰/۱۷۳۶، ۰/۱۷۳۸، ۰/۱۷۴۰، ۰/۱۷۴۲، ۰/۱۷۴۴، ۰/۱۷۴۶، ۰/۱۷۴۸، ۰/۱۷۵۰، ۰/۱۷۵۲، ۰/۱۷۵۴، ۰/۱۷۵۶، ۰/۱۷۵۸، ۰/۱۷۶۰، ۰/۱۷۶۲، ۰/۱۷۶۴، ۰/۱۷۶۶، ۰/۱۷۶۸، ۰/۱۷۷۰، ۰/۱۷۷۲، ۰/۱۷۷۴، ۰/۱۷۷۶، ۰/۱۷۷۸، ۰/۱۷۸۰، ۰/۱۷۸۲، ۰/۱۷۸۴، ۰/۱۷۸۶، ۰/۱۷۸۸، ۰/۱۷۹۰، ۰/۱۷۹۲، ۰/۱۷۹۴، ۰/۱۷۹۶، ۰/۱۷۹۸، ۰/۱۸۰۰، ۰/۱۸۰۲، ۰/۱۸۰۴، ۰/۱۸۰۶، ۰/۱۸۰۸، ۰/۱۸۱۰، ۰/۱۸۱۲، ۰/۱۸۱۴، ۰/۱۸۱۶، ۰/۱۸۱۸، ۰/۱۸۲۰، ۰/۱۸۲۲، ۰/۱۸۲۴، ۰/۱۸۲۶، ۰/۱۸۲۸، ۰/۱۸۳۰، ۰/۱۸۳۲، ۰/۱۸۳۴، ۰/۱۸۳۶، ۰/۱۸۳۸، ۰/۱۸۴۰، ۰/۱۸۴۲، ۰/۱۸۴۴، ۰/۱۸۴۶، ۰/۱۸۴۸، ۰/۱۸۵۰، ۰/۱۸۵۲، ۰/۱۸۵۴، ۰/۱۸۵۶، ۰/۱۸۵۸، ۰/۱۸۶۰، ۰/۱۸۶۲، ۰/۱۸۶۴، ۰/۱۸۶۶، ۰/۱۸۶۸، ۰/۱۸۷۰، ۰/۱۸۷۲، ۰/۱۸۷۴، ۰/۱۸۷۶، ۰/۱۸۷۸، ۰/۱۸۸۰، ۰/۱۸۸۲، ۰/۱۸۸

میلی‌گرم در میلی‌لیتر) استفاده و به ترتیب به دستگاه تزریق شد. استانداردها کروماتوگرافی شدند و زمان بازداری^۱ و قله‌هایشان با یک هماهنگ کننده مدل^۲ تعیین شد. زمان بازداری، جهت شناسایی و تعیین مقدار ساپونین‌ها در یک نمونه و مقایسه آن‌ها با غلظت شناخته شده در یک نمونه استاندارد می‌باشد.

محاسبات آماری

پس از تعیین نتایج خام اولیه جهت تفسیر نتایج از محاسبات آماری استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS جهت تعیین میانگین، انحراف معیار و آنالیز واریانس دوعاملی استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی بیوشیمیایی ساپونین‌ها

سنجش مقدار ساپونین‌های کل^۳ با استفاده از HPLC انجام شد. با محاسبه سطح زیر منحنی و مقایسه زمان بازداری هر کدام از نمونه‌ها و مقایسه آن‌ها با نمونه استاندارد، مقادیر ساپونین تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱- مقادیر ساپونین (X±SE) بر حسب میلی‌گرم بر گرم dw سنجش شده به روش HPLC

SA= ۱۱	SA= ۷	SA= ۳	Control	سالیسیلیک اسید (μM) پاتوژن
***۱۲۲ ± ۱۲/۵	*۵۹ ± ۷/۵	۷۳ ± ۹/۴	۴۲ ± ۶/۵	Control
***۱۳۵ ± ۱۴/۷	***۱۷۱ ± ۱۷/۸	***۱۰۶ ± ۱۱/۵	**۶۳ ± ۸/۷	<i>E.carotovora</i>
***۱۴۴ ± ۱۶/۷	***۸۲ ± ۱۰/۶	***۱۵۳ ± ۱۷/۷	***۹۶ ± ۱۱/۴	<i>Alternaria spp</i>

*=P < ۰/۰۵, **=P < ۰/۰۱, ***=P < ۰/۰۰۱

چنانچه از جدول ۱ استنباط می‌گردد، مقدار ساپونین در گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و فاقد آلودگی (گیاهان کنترل) ۴۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است. زمانی که گیاهان با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند و بدون هر گونه آلودگی هستند، افزایش قابل توجهی در مقدار ساپونین مشاهده می‌گردد، به طوری که مقدار ساپونین از ۴۲ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۷۳ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۵۹ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۲۲ میلی‌گرم بر گرم برای گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دوعاملی تفاوت معنی‌داری

۱-Retention time

۲-model 3396, Hewlett-Pad card

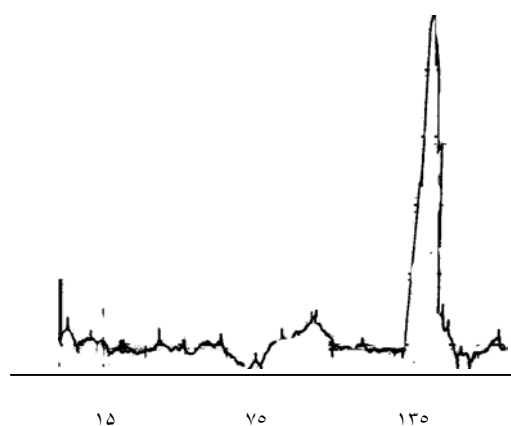
۳-Total saponins

بین گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و تیمار شده با غلظت‌های ۷ ($P < 0/05$) و ۱۱ ($P < 0/001$) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر مقدار ساپونین مشاهده گردید. و در غلظت ۳ میکرومولار تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید بر تجمع ساپونین مشاهده نشد. زمانی که گیاهان با باکتری *اروینیا کاروتوورا* آلوده می‌شوند، مقدار ساپونین در ریشه‌ها از ۴۲ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۶۳ میلی‌گرم برگرم افزایش نشان می‌دهد. و آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده با باکتری *اروینیا* در $P < 0/01$ بر تجمع ساپونین نشان داد. اما زمانی که گیاهان آلوده با این باکتری با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در مقدار ساپونین مشاهده می‌گردد، به طوری که مقدار ساپونین از ۶۳ میلی‌گرم برگرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۱۰۶ میلی‌گرم برگرم برای نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۱۷۱ میلی‌گرم برگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۳۵ میلی‌گرم برگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. و با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳ ($P < 0/001$)، ۷ ($P < 0/001$) و ۱۱ ($P < 0/001$) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر تجمع ساپونین مشاهده شد.

در گیاهان آلوده با قارچ *آلترناریا* پی‌پی مقدار ساپونین در ریشه‌ها از ۴۲ میلی‌گرم برگرم در گیاهان کنترل به ۹۶ میلی‌گرم برگرم افزایش نشان می‌دهد. و آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده با قارچ *آلترناریا* در $P < 0/001$ بر مقدار ساپونین نشان داد. در زمانی که گیاهان آلوده با قارچ *آلترناریا* با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، افزایشی در مقدار ساپونین مشاهده گردید. به طوری که مقدار ساپونین از ۹۶ میلی‌گرم برگرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۱۵۳ میلی‌گرم برگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۱۴۴ میلی‌گرم برگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. اما مقدار ساپونین در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید نسبت به نمونه آلوده، تیمار نشده (۹۶ میلی‌گرم برگرم) افزایش نشان نداد. ولی با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید در $P < 0/001$ بر تجمع ساپونین مشاهده گردید.

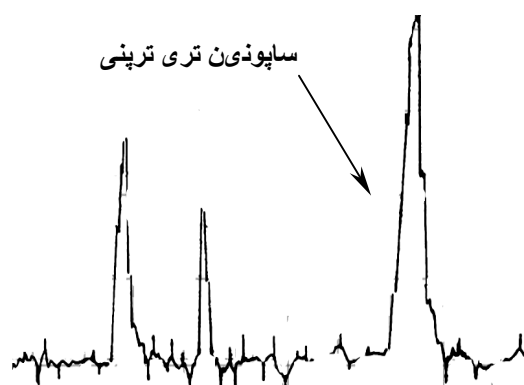
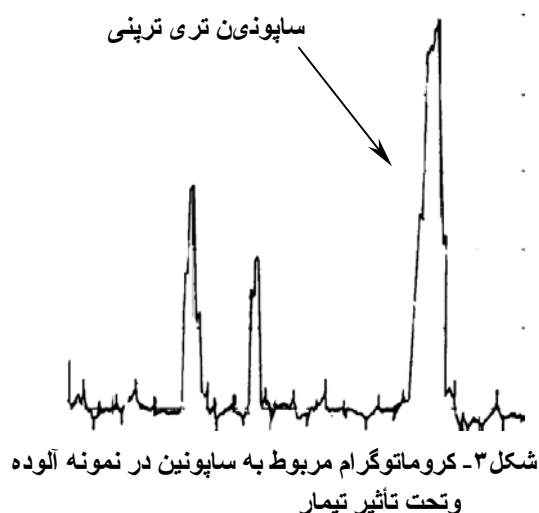
نمودار HPLC از ساپونین‌های تری‌ترینی، استخراج شده از گیاهان کنترل، یک قله اصلی با زمان بازداری ۱۳۴/۵ دقیقه هماهنگ با نمونه استاندارد (۱۳۵ دقیقه) نشان می‌دهد (شکل ۱ و ۲). همچنین نمودار HPLC

ساپونین‌های تری‌ترپنی استخراج شده از گیاهان آلوده و تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید یک قله اصلی با زمان بازداری ۱۳۴/۵ دقیقه را نشان می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۱- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه استاندارد

Time(min)



شکل ۲- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه کنترل

شکل ۳- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه آلوده و تحت تأثیر تیمار

بحث

نتایج حاکی از آن است که زمانی که گیاهان تیمار شده با غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید، آلوده می‌شوند، افزایش قابل توجهی در میزان تجمع ساپونین نسبت به گیاهانی که تنها با سالیسیلیک اسید تیمار شده‌اند و بدون هر گونه آلودگی هستند، نشان می‌دهند. همچنین طول عمر گیاهان آلوده تیمار شده، بیش‌تر از گیاهان آلوده تیمار نشده است. همچنین مشاهده شد بین افزایش طول عمر در این گیاهان که در اثر تیمار سالیسیلیک اسید ایجاد شد، با افزایش میزان ساپونین رابطه معنی‌داری مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده). هامرزچمید^۱ [۴] در پژوهشی که

^۱-Hammerschmidt

در مورد چگونگی عمل برخی از ترکیبات از جمله سالیسیلیک اسید در القای مقاومت و توقف رشد عوامل بیماری‌زا در گیاهان انجام داد، به نتایج مشابهی با پژوهش حاضر دست یافت. او بیان کرد همزمان با افزایش SAR و تولید پروتئین‌های PR، که در اثر تیمار سالیسیلیک اسید ایجاد می‌شود، افزایش تولید ساپونین به عنوان یکی از ترکیبات ضد میکروبی، تنها در محل آلودگی القا می‌شود، همزمان با القای سریع و مؤثر ساپونین در محل آلودگی، آسیب کمتری به گیاه وارد شده و از گسترش آلودگی به گیاه جلوگیری می‌گردد، و در نتیجه طول عمر گیاه افزایش می‌یابد. زیرا تسسوکی^۱ و همکاران [۲۰] گزارش کردند فعالیت ضد میکروبی در هر دو گروه ساپونین‌های تری ترپنی و استروئیدی وجود دارد، زیرا به محض آلودگی گیاه و خرابی بافت، آنزیم‌هایی رها می‌شوند که بر روی ساپونین‌های با ساختار بی‌سموزیدیک اثر گذاشته و آن‌ها را تبدیل به مشتقات مونوسموزیدشان می‌کنند، در نتیجه ساپونین‌ها می‌توانند، یک حالت دفاعی علیه حمله میکروبی ایجاد کنند و از گسترش بیماری جلوگیری کنند. همچنین «پاپادوپولو^۲، مالامی^۳، مالک^۴ و راسکین^۵» [۱۷]، [۱۳] [۷]، [۶]، نتایجی همسو با این پژوهش گزارش کردند. آن‌ها اظهار داشتند گیاهان به دلیل ساختار غشاهایشان، مکانیسم‌های دفاعی قابل القای مجزایی را به منظور حفاظت خود در برابر عوامل بیماری‌زا بروز می‌دهند. برای مثال به محض تلقیح گیاهان با عوامل بیماری‌زا و استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید و یا هر ترکیب سنتتیک طبیعی دیگر، ظرفیت پاسخهای دفاعی گیاه افزایش می‌یابد و موجب می‌گردد محتوی ترکیبات ضد میکروبی آن‌ها از جمله: ساپونین‌ها، فنل‌ها، سزکوئی ترپنوئیدها، ایزوفلانوئیدها و تعدادی دیگر از ترکیبات افزایش یابد. بنا براین به نظر می‌رسد استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید می‌تواند شرایط مناسبی در جهت افزایش تولید ساپونین در گیاه مینای چمنی در زمانی که گیاهان آلوده نیستند و همچنین زمانی که آلوده می‌شوند، فراهم کند.

منابع

1. J. Chappell and R. Nable, Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor, *Plant Physiol*, 85 (1987) 469-473.
2. A.J. Enyedi, N. Yalpani, P. Silverman and I. Raskin, Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests, *Cell*, 70 (1992) 879-886.
3. M.D. Garcia-Perez, C. Egea and M.E. Candela, Defense response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *phytophthora capsici*, *Physiol. Plant*, 103 (1998) 527-533.

^۱-Tschesche

^۴-Maleck

^۲-Papadopoulou

^۵-Raskin

^۳-Malamy

4. R. Hammerschmidt, Induced disease resistance how to induced plants stop pathogens, *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 55 (1999) 77-84.
5. K.A. Hostettman and A. Marston, *Saponins* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K), (1991).
6. J. Malamy and D.F. Klessig, Salicylic acid and plant disease resistance, *Plant J*, 2 (1992) 643-654.
7. K. Maleck and K. Lawton, Plant strategies for resistance to pathogens, *Current Opinion in Biotechnology*, 9 (1998) 208-213.
8. K.O. Muller and H. Borger, Experimentelle untersuchungen uber die phytophthora-resistenz der kartoffel, *Arb. Biol. Reichsanstalt. Landw. Forstw. Berlin*, 23 (1940) 189-223.
9. L.H. Nugroho, M.C. Verberne and R. Verpoorte, Salicylic acid produced by isochorismate synthase and isochorismate pyruvate lyase in various parts of constitutive salicylic acid producing tobacco plants, *Plant Sci*, 161 (2001) 911-915.
10. L.H. Nugroho, Anja M. G. Peltenburg-Looman, M. C. Verberne and R. Verpoorte, Is accumulation of sesquiterpenoid phytoalexins induced in tobacco plants constitutively producing salicylic acid?, *Plant Science*, 162 (2002) 989-993.
11. A.E. Osbourn, Saponins and plant defence- a soap story, *Trends in Plant Sci*, 1 (1996) 4-9.
12. A.E. Osbourn, Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack, *Plant Cell*, 8 (1996) 1821-1831.
13. K. Papadopoulou, R. E. Melton, M. Leggett, M. J. Daniels and A. E. Osbourn, Compromised disease resistance in saponin-deficient plants, *PNAS*, 96 (1999) 12923-12928.
14. J.D. Paxton, *Phytopathol Z*, 101 (1981) 106-109.
15. Avato Pinarosa and Tava Aldo, Acetylenes and terpenoids of *Bellis perennis*, *Phytochemistry*, 40 (1995) 141-147.
16. K.R. Price, I.T. Johnson and G. R. Fenwick, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 26 (1987) 27-133.
17. I. Raskin, Role of salicylic acid in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 43 (1992) 439-463.

18. F. Schonbeck and E. Schlosser, In Physiological Plant Pathology, eds. Heitefuss, R. and Williams, P.H. (Springer, Berlin), (1976) 653-678.
19. T. Schopke, V. Wray, B. Rzazewska and K. Hiller, Bellis saponins BA1 and BA2 acylated saponins from *Bellis perennis*, Phytochemistry, 30 (1991) 627-631.
20. R. Tschesche and G. Wulff, Chemie und biologie der saponine, Prog. Chem. Org. Nat. Prods, 30 (1972) 462-606.
21. H.D. VanEtten, J.W. Manfield, J.A. Bailey and E.E. Farmer, Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins", Plant Cell, 6 (1994) 1101-1122
22. M.C. Verberne, R. Verpoorte, J.F. Bol, J. Mercado-Blanco and H.J.M. Linthorst, Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes results in enhanced resistance to pathogens, Nat. Biotechnol, 18 (2000) 779-783.