بررسی اثر سالیسیلیک ا سید بر میزان ساپونین‌های تری ترپنوئیدی 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 تری‌ترپنوئیدی را به عنوان قسمتی از فرآیند طبیعی رشد و نموشان 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. دراین پژوهش، گیاه دارویی مینای چمنی از تیره کمپوزیته، ساپونین‌های تری ترپنوئیدی 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 تأ یید 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 فیتوآنتی سیپین‌ها)[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[۱٤]،[۸]. به طورکلی ترکیبات ضد میکروبی گیاهان شامل، مجموعه متنوعی از ترکیبات از جمله: ساپونین‌ها، فنل‌ها، هیدروکسامیک اسیدهای حلقوی، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، ایزوفلاونوئیدها، سزکوئی ترپنوئیدها، مشتقات ایندولی در بردارنده سولفور و تعدادی دیگر از ترکیبات هستند. ساپونین‌ها به عنوان یکی از متابولیت‌های ثانوی مهم، به۳ رده اصلی تقسیم می‌شوند:۱-گلیکوزیدهای تری‌ترپنی،

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

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

۲- گلیکوزیدهای استروئیدی۳- گلیکوزیدهای آلکالوئیدی استروئیدی. این ترکیبات با یکی از این ساختارها و یا هر۳ 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 مقادیربالایی 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 ترپنوئیدی، بلیس ساپونین‌های ۳،۲،۱ و۴(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 شرایطی است که بتوان تولید ساپونین‌های موجود در گیاه دارویی مینای چمنی را، که از ساپونین‌های تری ترپنوئیدی است، در مواقعی که گیاه در برابرعوامل 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] مجاورمی‌شوند، میزان سنتز استرول‌ها و القاکننده‌های سنتز ساپونین افزایش می‌یابد. به طوری که غالب ساختار ساپونین‌های تولید شده سزکوئی ترپنوئیدی 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 *پسودوموناس فلوئورسنس*[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 دوآنزیم در تولید سالیسیلیک اسید درمیکروارگانیسم‌ها 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 *فیتوفوتورا کپسیسی*[۷] در کشت سوسپانسیون سلولی فلفل، تجمع فیتوآلکسین سزکوئی ترپنوئید کپسیدیول را تنها در محل آلودگی القا می‌کند[۱۰]،[۳].همین طور گیاهان توتون-CSAای 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 شرایطی 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)
٤- *Escherichia coli* ٥- *Pseudomonas fluorescens* ٦- *Nicotiana tabacum*
۷ *Phytophthora capsici*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

ساپونین‌های تری ترپنوئیدی 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 $\frac{۲}{۳}$ماسه و $\frac{۱}{۳}$ رس تهیه شده و سپس بذرها به این سطح انتقال یافت. گلدان‌ها در مقابل پنجره قرار داده شدند و بعد از جوانه‌زنی، گلدان‌های حاوی دانه‌رست 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 باغلظت‌های $\frac{۲}{۱۰}$، $\frac{۱}{۵}$ ، $\frac{۱}{۲}$ 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

میکروارگانیسم‌های 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]. میکروارگانیسم‌های 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 ازجوانه‌زنی انجام شد. درهر گیاه سطح تحتانی دو برگ با سرنگ بدون سوزن استریل زخمی شد. سپس ماده تلقیحی تهیه شده (در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطراستریل یک میلی‌لیترسوسپانسیون باکتری ($۱۰^{۸}$برمیلی‌لیترCFU) همچنین در۱۵میلی‌لیتردیگرآب مقطراستریل یک میلی‌لیترسوسپانسیون قارچی($۱۰^{۵}$ برمیلی‌لیترspore) 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 میکروارگانیسم 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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

تلقیح که معادل روز هفتادم 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 مبرد و دستگاه بن ماری به مدت یک ساعت نمونه‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد رفلاکس شدند، پس از سردشدن، عصاره حاصل از رفلاکس صاف شده و با دستگاه تبخیر کننده گردان[۱] به منظور تبخیر حلال تبخیر شد. سپس عصاره حاصل، در مقدارکمی آب مقطرحل شد. به منظور چربی‌زدایی از مخلوط کلروفرم و آب با نسبت(۱:۱ $H_2O:CHCL_3$) 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 دولایه 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(Et_2O) قطره قطره ریخته شد. ازعصاره 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 (۱۵:۱۰:۲) 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 آشکارسازمدل« دتکتوریونیکوم»[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 ازHPLC 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_{18} با ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی متر 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، ۰/۰۱، ۰/۰۲،....۰/۱

۱-Rotary evaporator ۲-UV-detector-uniCom 4225 ۳-Crystal-200
۴-Philips-PM 8261 ۵-Quillage source(Terpenoid)Merck

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

میلی‌گرم در میلی‌لیتر) استفاده و بـه ترتیب بـه 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).

جدول۱- مقادیر ساپونین(X±SE) بر حسب میلی‌گرم بر گرم dw سنجش شده به روش HPLC

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

*=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 از۴۲ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۷۳ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۵۹ میلی‌گرم برگرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۲۲ میلی‌گرم برگرم برای گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس دوعاملی تفاوت معنی‌داری

۱-Retation time ۲-model 3396, Hewlett-Pad card ۳-Total saponins

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

بین گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و تیمارشده با غلظت‌های ۷ ($P <۰/۰۵$) و ۱۱($P <۰/۰۰۱$) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر مقدار ساپونین مشاهده گردید. و درغلظت ۳ میکرومولار تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید بر تجمع ساپونین مشاهده نشد.

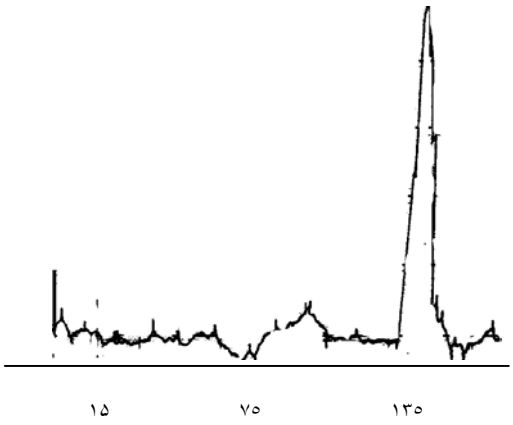
زمانی که گیاهان با باکتری *اروینیا کاروتوورا* آلوده می‌شوند، مقدار ساپونین درریشه‌ها از ۴۲ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۶۳ میلی‌گرم برگرم افزایش نشان می‌دهد. و آنالیز واریانس دوعاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده با باکتری اروینیا در $P <۰/۰۱$ بر تجمع ساپونین نشان داد. اما زمانی که گیاهان آلوده با این باکتری با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، تغییرات قابل ملاحظه ای 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 بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۳۵ میلی‌گرم بر گرم 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 دوعاملی تفاوت معنی داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳ ($P <۰/۰۰۱$)، ۷ ($P <۰/۰۰۱$) و ۱۱($P <۰/۰۰۱$) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر تجمع ساپونین مشاهده شد.

در گیاهان آلوده با قارچ *آلترنیاس پی پی* مقدار ساپونین در ریشه‌ها از ۴۲ میلی‌گرم برگرم در گیاهان کنترل به ۹۶ میلی‌گرم بر گرم افزایش نشان می‌دهد. و آنالیز واریانس دوعاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده با قارچ آلترناریا در $P <۰/۰۰۱$ 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 تیمارشده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۱۴۴ میلی‌گرم برگرم درنمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. اما مقدار ساپونین در نمونه آلوده تیمارشده با غلظت ۷ میکرومولار (۸۲ میلی‌گرم برگرم) نسبت به نمونه آلوده، تیمار نشده (۹۶ میلی‌گرم برگرم) افزایش نشان نداد. ولی با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دوعاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید در $P <۰/۰۰۱$ بر تجمع ساپونین مشاهده گردید.

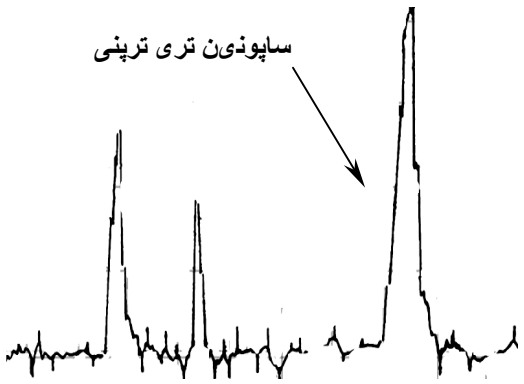
نمودار HPLC از ساپونین‌های تری ترپنی، استخراج شده از گیاهان کنترل، یک قله اصلی با زمان بازداری ۱۳۴/۵ دقیقه هماهنگ با نمونه استاندارد (۱۳۵ دقیقه) نشان می‌دهد (شکل۱و۲). همچنین نمودار HPLC

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

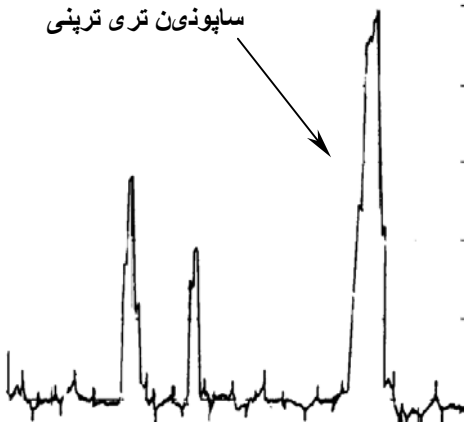
ساپونین‌های تری ترپنی استخراج شده از گیاهان آلوده و تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید یک قله اصلی با زمان بازداری ۱۳۴/۵ دقیقه را نشان می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۱- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه استاندارد



شکل۲- کروماتوگرام مربوط به ساپونین درنمونه‌کنترل



شکل۳- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه آلوده وتحت 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 (داده ها نشان داده نشده). هامرزچمید[۱] [۴] در پژوهشی که

۱-Hammerschmidt

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

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 درنتیجه 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 بی‌دسموزیدیک اثر گذاشته و آن‌ها را تبدیل به مشتقات مونودسموزیدشان می‌کنند، در نتیجه ساپونین‌ها می‌توانند، یک حالت دفاعی علیه حمله میکروبی ایجاد کنند و از گسترش بیماری جلوگیری کنند. همچنین« پاپادوپلو[۲]، مالامی[۳]، مالک[۴] و راسکین[۵] »[۱۷]،[۱۳] [۷]،[٦]، 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، فنل ها، سزکوئی ترپنوئیدها، ایزوفلاونوئیدها و تعدادی دیگراز 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 suspend-sion 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 resis -tance to pathogens and pets, 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 ۲-Papadopoulou ۳-Malamy
٤-Maleck ٥-Raskin

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

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. Reichsasnstalt. 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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

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, Overprodu -ction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes results in enhanced resistance to pathogens, Nat. Biotechnol, 18 (2000) 779-783.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]