جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

"مجله علوم زراعی ایران"
جلد سوم، شماره ۳، ۱۳۸۰

تجزیه کمّی و کیفی ساپونین‌های واریته‌های مختلف یونجه و بررسی رابطهٔ آن‌ها با مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه

Quantitative and Qualitative Analysis of Saponins in Different Varieties of Alfalfa and their Relationships with Weevil Resistance

محمود باقری[۱]، بهمن یزدی صمدی[۲]، حجت ا... مظاهری لقب[۳] و کاظم پوستینی[۴]

چکیده

۲۲ رقم یونجه ایرانی و خارجی از نظر میزان کل ساپونین (تجزیه کمّی) و انواع ساپونینها (تجزیه کیفی) مورد بررسی قرار گرفتند. در تجزیه کمّی که با روش اسپکتروفتومتری صورت گرفت. واریته‌های مورد آزمایش از نظر میزان کل ساپونین تفاوت معنی دار نشان دادند. میزان کل ساپونین با میزان خسارت لاروسرخرطومی فاقد همبستگی معنی دار بود. در تجزیه کیفی که با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)انجام پذیرفت هشت نوع ساپونین در واریته‌های مورد آزمایش مشاهده گردید. از مقایسه الگوی نواربندی این ساپونین‌ها با الگوی نواربندی ساپونین‌های استاندارد مشخص شد که ساپونین شماره ۳، مدیکوسایدجی، ساپونین شماره ۴، سویاساپونین I و ساپونین شماره ۷، مدیکو سایدآ است. پنج ساپونین دیگر با ساپونین‌های استاندارد موجود قابل شناسایی نبودند. ساپونین‌های شماره ۱، ۲ و ۸ با میزان خسارت لاروسرخرطومی برگ یونجه همبستگی منفی معنی دار، ساپونین‌های شماره ۳ و ۴ همبستگی مثبت معنی دار و ساپونین‌های شماره ۵، ۶ و ۷ عدم همبستگی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: یونجه، ساپونین، تجزیه کمی و کیفی، مقاومت به سرخرطومی.

مقدمه

آفات و بیماری‌های گیاهی از جمله مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده محصولات کشاورزی می‌باشند. یکی از روش‌های ایجاد واریته‌های مقاوم استفاده از سیستم خود دفاعی گیاه مبتنی بر مواد درون زای گیاهی است. مواد متابولیکی ثانویه (متابولیت‌های ثانویه) حاصل از متابولیسم گیاهی از جمله مهم‌ترین این موادند. آنتی بیوتیک‌ها، آلکالوئیدها، ترپن‌ها، گلیکوزیدها و فنل‌ها از جمله متابولیت‌های ثانویه گیاهی اند. در سال‌های اخیر، توجّه زیادی به ساپونین‌های گیاهی معطوف گردیده است. ساپونین‌ها در بیش از ۱۰۰ خانواده گیاهی یافت می‌شوند که تیره بقولات را می‌توان مهم‌ترین خانواده گیاهی واجد ساپونین نام برد (Mazahery-Laghab,1997). ساپونین‌ها، گروهی مجزااز مواد هستند که از نظر شیمیایی پیچیده و دارای وزن ملکولی بالا بوده و در واکوئل گیاهی جای دارند (Hostettmann and Marston, 1995). عواملی چون مبداء ژنتیکی گیاه، سن گیاه، وضع فیزیولوژیکی، عوامل محیطی و زراعی مرتبط با رشد گیاه و تیمارهای پس از برداشت از جمله عواملی که میزان ساپونین را تغییر می‌دهند

تاریخ دریافت: ۱۳۷۹/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۱/۲/۵

۱ـ کارشناس ارشد اصلاح نباتات ۲ـ استاد دانشگاه تهران ۳ـ استادیار دانشگاه بوعلی سینا ۴ـ دانشیار دانشگاه تهران

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

(Fenwick et al.,1991).

مطالعات انجام شده د رمورد ساپونین‌های یونجه دو نتیجه دربر داشته است: یکی اثر مفید آن مربوط به سمیّت ساپونین ها در برابر حشرات، قارچ‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌ها و دیگری اثر مضر آن مربوط به نفخ زایی ساپونین‌ها در نشخوار کنندگان (Mazahery-Laghab,1997).

نشان داده شده است که جزء بزرگ واریانس میزان کل ساپونین مربوط به ژنوتیپ است؛ این نتیجه گویای موثر بودن انتخاب در تعدیل و تغییر میزان ساپونین هاست (هنسون، ۱۳۷۲).

ساپونین‌های سویا به صورت یک عامل دفاعی در برابر سوسک چینی حبوبات *(Callosobruchus chinensis)* عمل می‌کنند و دلیل آن ناتوانی لاروها برای هیدرولیز ساپونین‌های سویا می‌باشد(Mazahery- Laghab, 1997).فنویک و همکاران (Fenwick et al.,1991) اظهار کردند که ساپونین‌های ریشه یونجه که غنی از مشتقات مدیکاژنیک اسید می‌باشند به طور مشخصی در برابر سوسک آرد *(Tribolium castaneum)* سمی اند.پدرسن و همکاران (Pedersen et al., 1976) نشان دادند که انتخاب برای غلظت کم و زیاد ساپونین در یونجه با استفاده از قارچ تریکودرما، مقاومت به آفات را تحت تاثیر قرار می‌دهد به طوری که انتخاب برای میزان ساپونین کم مقاومت را کاهش می‌دهد. آن‌ها هم‌چنین دریافتند که مقاومت یونجه به شته ماکروپیزوم پیزی *(Macropysum pisi)*بستگی به غلظت‌های بالای ساپونین در واریته‌های مقاوم دارد و مقاومت به شته خالدار یونجه *(Therioaphis maculata)* با این انتخاب‌ها تحت تاثیر قرار نگرفت. عمر وهمکاران (Omar et al.,1996) نشان دادند که ساپونین‌های یونجه به طور معنی داری رشد میسیلیوم‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید پیاز *(Sclerotium cepivoum)* راکاهش می‌دهند. آن‌ها نتیجه گرفتند که ساپونین‌ها به عنوان یک ماده طبیعی گیاهی، اثر بازدارندگی قارچ کش‌های پیشنهادی (سومیسلکس و بن لات) را در کنترل بیماری پوسیدگی سفید پیاز نشان می‌دهند. استاتویل و اسکینر(Stuteville and Skinner, 1987) اثر انتخاب برای مقاومت به سفیدک داخلی یونجه بر روی میزان ساپونین‌های یونجه را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که ساپونین‌ها نقشی در مقاومت به این قارچ ندارند.

از سال‌ها قبل ساپونین به عنوان یکی از عوامل مهم تولید نفخ شناخته شده است.اثر نفخ زایی ساپونین‌ها مربوط به خاصیت کف کنندگی آن‌هاست، به طوری که حیوان قادر به آروغ زدن نخواهد بود و حباب‌های گاز از شکمبه خارج نمی‌شوند و تجمع می‌یابند. تجمع گاز باعث درد قابل توجّه و بعضا" مرگ حیوان می‌گردد(کرمی، ۱۳۶۹).

تحقیقات صورت گرفته نشان میدهند که ساپونین‌ها با مقاومت به برخی آفات و بیماری‌ها رابطه مستقیم دارند درحالی که با برخی دیگر رابطه‌ای نشان نداده‌اند. از طرفی ساپونین‌ها به عنوان اصلی‌ترین عامل ایجاد نفخ در نشخوارکنندگان شناخته شده‌اند.انتخاب برای میزان ساپونین کم در یونجه به منظور کاهش میزان نفخ زایی یونجه و در نتیجه بهبود کیفیت غذایی آن باعث کاهش مقاومت یونجه به آفات وبیماری‌ها گردیده است (Pedersen et al., 1976). نکته قابل تامل این است که ساپونین‌های یونجه انواع مختلفی دارند واخیرا" مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که برخی از انواع سابونین‌های یونجه علاوه براین که سمیت بالایی علیه حشرات و قارچ‌ها دارند، میزان نفخ زایی آن‌ها نیز کم می‌باشد (Mazahery - Laghab, 1997).

هدف از این مطالعه بررسی میزان کل ساپونین‌ها در واریته‌های مورد آزمایش یونجه و هم‌چنین بررسی انواع ساپونین‌های موجود و تعیین رابطه آن‌ها با مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه *(Hypera postica* Gyll.) می‌باشد. این حشره از مهم‌ترین آفات یونجه است که سالانه خسارت عمده‌ای به یونجه کاران وارد می‌سازد. نسل اول این حشره بعضا" تمامی محصول چین اول یونجه را از بین می‌برد(اسماعیلی و همکاران، ۱۳۷۴).

مواد و روش‌ها

۱ـ ارقام مورد آزمایش

۲۲ رقم یونجه ایرانی و خارجی که قبلا" در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کشت شده بودند (جدول ۱) مورد مطالعه قرار گرفتند. مقاومت به سرخرطومی

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

این واریته‌ها قبلا" به صورت میزان خسارت لاروسرخرطومی برحسب رتبه دهی بین ۰ تا ۹ تعیین گردیده بود و میانگین میزان خسارت برای هر رقم در جدول ۱ ارائه گردیده است (مظاهری لقب و یزدی صمدی، ۱۳۷۰).

جدول ۱ - میانگین نمره ارزیابی خسارت لارو سرخرطومی ارقام مورد آزمایش (مظاهری لقب و یزدی صمدی، ۱۳۷۰)

Table 1. Mean larval damage of alfalfa varieties used in the experiment (Mazzahery-Laghab and Yazdi Samadi, 1991)

شماره واریته Variety No.	نام واریته Variety name		نمره میانگین خسارت Mean damage scoring
1	Bam	بم	2.17
2	Kerman	کرمان	2.25
3	Hamadan	متفرقه‌همدان	2.16
4	Ahar	اهر	2.42
5	Polycross Yazd-6	پلی کراس یزد - ٦	2.06
6	Polycross Yazd-7	پلی کراس یزد - ۷	2.06
7	Polycross Bam-12	پلی کراس بم - ۱۲	2.16
8	Polycross Bam -11	پلی کراس بم - ۱۱	2.20
9	Polycross Shiraz-8	پلی کراس شیراز - ۸	2.18
10	Polycorss Bam-10	پلی کراس بم - ۱۰	2.11
11	Polycross Lahontan-7	پلی کراس لاهوتان - ۷	2.15
12	Shiraz	شیراز	2.15
13	Gazzaghestan	قزاقستان	2.17
14	Krisarry	کریساری	2.15
15	Simertchenskaya	سیمرچنسکایا	2.12
16	Khorvandeh Hamadan	خورونده همدان	1.90
17	UC-66	یوسی - ٦٦	2.28
18	UC73	یوسی - ۷۳	2.15
19	UC-78	یوسی - ۷۸	2.12
20	UC-80	یوسی - ۸۰	2.26
21	Sefidboran Ghazvin	سفید بوران قزوین	2.09
22	Ghooran Taleghan	گوران طالقان	1.85

۲ - نمونه برداری

نمونه برداری از اندام‌های هوایی، قبل از مرحله غنچه‌دهی، در دو تکرار انجام پذیرفت.

نمونه‌های گیاهی بوسیلهٔ نیتروژن مایع منجمد، و سپس سریعا" در ۲۰۰C - تا زمان نیاز ذخیره گردیدند.

۳ - استخراج ساپونین‌ها

استخراج ساپونین‌ها به طریقی که مظاهری لقب (Mazahery-Laghab, 1997) این روش را با استفاده از روش‌های استخراج ساپوژنین‌ها (Massiot et al., 1992 & 1988) بهینه سازی کرد صورت گرفت. ۲۰ گرم از هر نمونه یونجه برداشت گردید وباکمک ازت مایع در یک هاون چینی کاملا" آسیاب گردید. ۱۰۰ میلیلیتر متانول ۸۰ درصد به نمونه اضافه گردید (۵ میلیلیتر برای هر گرم بافت تازه گیاهی) محلول در داخل ارلن ۲۵۰ میلیلیتری به مدت یک شب در دمای اتاق توسط دستگاه تکان دهنده (shaker) بهم زده شد. سپس نمونه برداشته شد و با استفاده از کاغذ صافی، قیف بوخنر و باکمک

دستگاه مکنده (Vaccuum) دو مرتبه صاف گردید. عصاره حاصل توسط دستگاه تبخیر کننده چرخشی (Rotary evaporator) در ۴۰۰°C+ تبخیر شد و باقیمانده در ۲۰ میلیلیتر آب مقطر حل گردید. محلول حاصل در این مرحله آلفا α نامیده شد که در واقع عصاره ساپونین خام (Crude saponin) می‌باشد. محلول α برای تمامی واریته‌ها و تکرارها به دست آمد و تا زمان نیاز ۲۰۰°C- ذخیره گردید.

۴- خالص سازی ساپونین‌ها با بوتانل نرمال

محلول α به قیف جداکننده ۲۵۰ میلیلیتری ریخته شد و ۱۰ میلیلیتر بوتانل نرمال اشباع از آب به آن اضافه و کاملا" بهم زده شد. اجازه داده شد تا دو لایه کاملا" مجزا تشکیل گردد: لایهٔ سبز رنگ بالایی بوتانل و لایهٔ آبکی پایینی. لایهٔ آبکی جداگردید و لایهٔ بوتانل بالایی ذخیره شد. لایهٔ آبکی دوباره به قیف جداکننده ریخته شد و عمل یاد شده با ۵ میلیلیتر بوتانل اشباع از آب انجام گردید و برای بار سوم با ۲/۵ میلیلیتر بوتانل اشباع از آب تکرار گردید. با این سه تکرار تقریبا" تمامی ساپونین‌های موجود در عصار α جداگردید. سه لایهٔ بوتانل با هم مخلوط گردید و با دستگاه تبخیر کننده چرخشی در ۵۵°C+ تبخیر شد و باقیمانده در ۲۰ میلیلیتر متانول خالص حل گردید. این محلول β نامیده شد. محلول β مخلوطی از ساپونین‌های خالص است. محلول β تا زمان نیاز در ۲۰°C- ذخیره گردید.

۵- تعیین میزان کل ساپونین‌ها (تجزیه کمّی)

برای تعیین میزان کل ساپونین‌ها از روش اسپکتروفتومری تعیین میزان ساپونین‌های تریترپنوئید ارائه شده توسط ابراهیم‌زاده ونیکنام (Ebrahimzadeh and Niknam, 1998) استفاده شد. این روش براساس میزان جذب اشعهٔ ماوراء بنفش می‌باشد. بدین منظور از دستگاه اسپکتروفتومتری UV-160 Shimadzu استفاده گردید. مقادیر معینی از ساپونین سفید خالص (بین ۰ تا ۴۰۰ میکروگرم) در یک حلال (آب) حل گردید. لوله‌های آزمایش حاوی این محلول‌ها به آون ۱۰۰۰°C± منتقل شد تا حلال‌های مربوط تبخیر گردد. لوله‌های آزمایش از آون برداشته شد و پس از خنک شدن، ۵ میلیلیتر وانیلین ۰/۷ درصد در اسید سولفوریک ۶۵ درصد به هر لوله آزمایش اضافه گردید. این معرف ناپایدار است و بایستی روزانه به صورت تازه تهیه گردد. لوله‌های آزمایش به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۶۰±۱۰°C قرار گرفتند. سپس این لوله‌ها به مدت ده دقیقه در داخل یخ خرد شده قرار گرفتند و نهایتا" جذب نمونه‌ها در ۴۷۳ نانومتر ثبت گردید. با استفاده از این اعداد، معادله و خط رگرسیون غلظت ساپونین و جذب در ۴۷۳ نانومتر به دست آمد.

مقدار نیم میلیلیتر از محلول β برداشته و در لولهٔ آزمایش ریخته شد. تمام مراحلی که برای غلظت‌های استاندارد انجام گرفت، برای محلول‌های β نیز انجام گردید و با توجّه به معادله و خط رگرسیون موجود با میزان جذب این نمونه‌ها در ۴۷۳ نانومتر میزان غلظت ساپونین در نمونه‌ها تعیین گردید و نهایتا" میزان کل ساپونین واریته‌ها برحسب گرم ساپونین در کیلوگرم بافت تازه یونجه به دست آمد.

۶- تعیین انواع ساپونین‌ها (تجزیه کیفی)

برای تعیین انواع ساپونینها از روش کروماتوگرافی لایه نازک Thin Layer Chromatography TLC استفاده گردید.این روش به کمک سیلیکاژل کشیده شده روی صفحات شیشه‌ای ۲۰×۲۰ سانتیمتر انجام گرفت. برای انجام کروماتوگرافی، نمونه محلول‌های β به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در g (گراوتید) ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند و مواد شناور (غیر رسوبی) برای TLC برداشته شد. ۲۲ نقطه مربوط به تیمارها (هر دو تکرار مخلوط گردید) و شش نقطه مربوط به ساپونین‌های استاندارد (جدول ۲)(برای شناسایی باندهای تفکیک شده) لکه گذاری گردید. صفحات TLC در داخل یک تانک TLC حاوی حلال اتیل استات: استیک اسید: آب مقطر به نسبت حجمی ۷:۲:۲ قرار گرفتند و وقتی حلال پس از حرکت از پایین صفحات به‌سمت بالا به یک سانتیمتری بالای صفحات رسید صفحات از تانک برداشته شد و اجازه داده شد در هوای آزاد خشک گردند. سپس صفحات با ترکیب متانول: استیک ان هیدرید: اسید سولفوریک به نسبت حجمی ۱۰:۱:۱ معرف پاشی گردیدند. (این معرف بایستی همواره به صورت تازه تهیه گردد). سپس صفحات TLC به آون خشک‌کن ۱۰۴°C به مدت ۱۵ دقیقه منتقل گردیدند. صفحات

TLC از آون برداشته شدند و با لامپ UV مشاهده، شناسایی، رتبه دهی و عکسبرداری گردیدند. رتبهٔ صفر برای عدم وجودنوار و رتبهٔ ۱۰ برای شدیدترین نوار موجود بین الگوهای نواری.

۷- تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس طرح بلوک های کامل تصادفی برای میزان کل ساپونین‌ها و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن در سطح ۱٪ انجام پذیرفت. تاثیر میزان کل ساپونین هر تیمار و هم‌چنین تاثیر میزان هر کدام از ساپونین‌های هشتگانه تفکیک شده بر میزان خسارت لارو سرخرطومی برگ یونجه به روش همبستگی پیرسون انجام پذیرفت.

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و بررسی همبستگی‌ها و رسم نمودارها بااستفاده از نرم‌افزار EXCEL انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

۱ـ تجزیهٔ کمّی

میزان کل ساپونین تیمارها بر حسب گرم در کیلوگرم بافت تازه یونجه در جدول ۳ ارائه گردیده است. نتایج تجزیه واریانس میزان کل ساپونین واریته‌ها نیز در جدول ۴ دیده می‌شود. همان طور که مشاهده می‌گردد دو تکرار استفاده شده تفاوت معنی داری باهم ندارند ولی واریته‌ها از نظر میزان کل ساپونین تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۱ دارند.

مقایسهٔ میانگین تیمارها به روش دانکن در سطح ۰/۰۱ (جدول ۵) وجود ۱۰ گروه را نشان داد. رقم شماره ۱ (بمی) به تنهایی با بیشترین میزان ساپونین در گروه A و دو رقم ۲۱ و ۲۲ (به ترتیب سفید بوران قزوین و گوران طالقان) با کمترین میزان ساپونین در گروه J قرار گرفتند.

بررسی همبستگی بین میانگین کل ساپونین واریته‌ها و میزان خسارت لارو سرخرطومی نشان می‌دهد که ضریب همبستگی برابر r=0.408 و معادله خط رگرسیون مربوط عبارت از Y=1.834+0.039X است که معادله (۱) نامیده می‌شود. نمودار خط رگرسیون این معادله در شکل ۱ دیده می‌شود.

۲ـ تجزیه کیفی

در تجزیه کیفی ساپونین‌های ارقام مورد آزمایش (شکل ۲)

جدول ۲ـ نام و فرمول شیمیایی ساپونین‌های استاندارد (مرجع) مورد استفاده

Table 2. Names and formulae of standard saponins

نام ساپونین Saponin		علامت Mark	فرمول شیمیایی Formula
Soyasaponin I	سویا ساپونین آی	A	3-o-a-rhamopyranosyl(1->2)-β-D-galactopyranosyl(1->2)β-D-glucuronopyranosyl soyasapogenol B
Medicoside J	مدیکوساید جی	B	3-0-b-O-glucopyranosyl-28-O-[b-D-glucopyranosyl(1->4)-α-L-rhamnopyranosyl] medicagenic acid
Medicoside A	مدیکوساید آ	C	3-O-b-D-glucopyranosyl medicagenic acid
*		D	3-O-[b-D-glucopyranosyl(1->2)-β-D-glucopyranosyl]-28-O-[b-D-xylopynosyl (1->4)-a-L-rhamnopyranosyl(1->2)-α-L- arabinopyranosyl] medicagenic acid
Medicoside I	مدیکوساید آی	E	3-O-[α-L-arabinopyranosyl(1->2)-β-D-glucopyranosyl(1->2)-α-L-arabinopyranosyl]-28-O-β-D-glucopyoanosyl medicagenic acid
Medicoside G	مدیکوساید جی	F	3-O-b-D- glucopyranosyl - 28 - O- β- D-glucopyranosyl medicagenic acid

* نام این ساپونین ذکر نگردیده است.

جدول ۳- میزان کل ساپونین ارقام برحسب گرم ساپونین در کیلوگرم بافت تازه یونجه

Table 3. Total amount of saponins in alfalfa varieties (g/kg fresh weight)

شماره واریته Variety No.	بلوک اول Rep.I	بلوک دوم Rep.II	میانگین Mean
1	10.493	10.412	10.452
2	7.319	7.132	7.225
3	6.615	6.521	6.568
4	7.608	8.702	8.155
5	8.930	9.160	9.045
6	8.035	8.425	8.230
7	8.427	8.596	8.511
8	7.400	7.106	7.253
9	9.549	9.200	9.374
10	8.791	8.922	8.857
11	8.305	7.653	7.979
12	8.207	8.613	8.410
13	7.761	7.453	7.607
14	6.948	8.962	7.955
15	8.746	8.444	8.595
16	7.392	7.322	7.357
17	8.706	8.768	8.737
18	8.598	8.607	8.598
19	7.608	7.798	7.703
20	9.294	9.627	9.460
21	5.162	5.396	5.279
22	5.216	5.276	5.246

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس میزان کل ساپونین ارقام یونجه

Table 4. Results of analysis of variance for total saponins

منابع تغییرات S.O.V.		درجه آزادی d.f.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F
Rep,	بلوک	1	0.204	0.204	1.348ns
Variety	واریته	21	64.927	3.092	20.464**
e	اشتباه آزمایشی	21	3.173	0.151	
Total	کل	43	68.303		

ns و ** به ترتیب معنی دار در سطح ۱ / ۰ احتمال.

ns, **: Non significant and significant at the 1% level of probability respectively.

جدول ۵ - مقایسه میانگین رقم یونجه از نظر میزان کل ساپونین به روش دانکن

Table 5. Mean comparisons of the total saponin concentration of the alfalfa cultivars, using Duncan's Multiple Range test(p>o.o1)

شماره واریته Variety No.	گروه بندی Group	شماره رقم Variety No.	گروه بندی Group
1	a	12	c d e f g h
2	a b	13	d e f g h
3	a b c	14	d e f g h
4	b c d	15	e f g h i
5	b c d e	16	e f g h i
6	b c d e	17	f g h i
7	b c d e f	18	g h i
8	b c d e f	19	h i
9	b c d e f g	20	i
10	b c d e f g h	21	j
11	b c d e f g h	22	j

هشت الگوی نواری مشخص مشاهده گردید.با مقایسه این الگوهای نواری با الگوی نواری ساپونین‌های استاندار (شکل ۲C ستون‌های A تا R)مشخص گردید که ساپونین شماره ۳ با $Rf=\frac{\text{میزان حرکت نوار مورد نظر از محل نقطه گذاری}}{\text{میزان کل حرکت حلال از محل نقطه گذاری}}$ ۰/۲۳ نشان دهنده ساپونین مدیکوساید جی می‌باشد. ساپونین شماره ۴ قهوه‌ای رنگ با Rf= ۰/۳۱ سویا ساپونین I و ساپونین شماره ۷ به رنگ سبز روشن با Rf = ۰/۵۹ مدیکوسایدآ می‌باشند. پنج ساپونین دیگر با ساپونین‌های استاندارد موجود هم خوانی نداشته و لذا قابل شناسایی نبودند.

رتبه دهی برای الگوهای نوارش هتشگانه در ارقام مورد آزمایش انجام پذیرفت که در جدول ٦ مشاهده می‌گردد. بررسی رابطه بین رتبه بندی انواع ساپونین‌ها و میزان خسارت لارو سرخرطومی برگ یونجه و واریته‌های مورد آزمایش، نتایج ارائه شده در جدول ۷ را دربرداشته است. در شکل ۳ نمودارهای رگرسیون خطی مربوط به این معادلات مشاهده می‌گردد.

بررسی رابطهٔ بین رتبه بندی انواع ساپونین‌ها (جدول ٦) و میزان خسارت لارو سرخرطومی برگ یونجه (جدول ۲) در ارقام مورد آزمایش، نتایج ارائه شده در جدول ۷ را در برداشته است.در شکل ۳ نمودارهای رگرسیون خطی مربوط به این معادلات مشاهده می‌گردد.

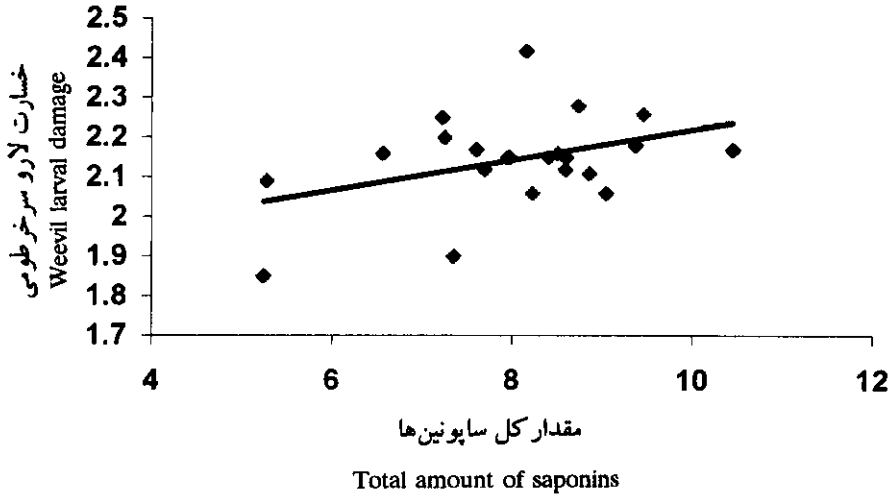
نتایج و بحث

معادله (۱) معنی دار نبودن ضریب همبستگی بین میزان کل ساپونین و میزان خسارت لارو سرخرطومی را نشان می‌دهد. از این معادله معلوم می‌شود که میزان کل ساپونین‌های یونجه اثر زیان آوری علیه تغذیه لارو سرخرطومی برگ یونجه ندارند که با نظرات پری و بیرک (Peri and Birk, 1980) در مورد مهم‌تر بودن نقش ساپونین‌ها در مقابله با حشرات پلی فاژ در مقایسه با حشرات اینگوفاژ مطابقت دارد؛ زیراکه سرخرطومی برگ یونجه از جمله آفات اختصاصی یونجه است. سمی نبودن ساپونین‌های یونجه برای لاروسرخرطومی یونجه را می‌توان این گونه تفسیر کرد که در طی سالیان متمادی این آفت خود را برای تغذیه از یونجه سازگار نموده است و ممکن است از همین طریق در زمره آفات اختصاصی و مهم یونجه قرار گرفته باشد. سازگار بودن لاروهای سرخرطومی برای تغذیه از یونجه می‌تواند با توانایی این لاروها برای هیدرولیز و سم زدایی ساپونین‌ها مرتبط باشد که با نظریات اپل باوم و همکاران (Applebaum et al., 1965) در مورد ناتوانی لاروهای سوسک چینی حبوبات

جدول ٦ـ الگوهای باندی TLC و نمره دهی آن‌ها در ارقام مورد آزمایش

Table 6. TLC banding patterns and their scores for alfalfa varieties

الگوی باندی Banding pattern	Varieties used in the experiment ارقام مورد آزمایش																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
ساپونین شماره ۱ Saponin No.1 Rf=0.052	2	2	2	3	3	3	2	1	2	3	3	2	2	2	2	3	2	1	2	1	4	4
ساپونین شماره ۲ Saponin No.2 Rf=0.09	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3	3
ساپونین شماره ۳ Saponin No.3 Rf=0.23	6	6	6	5	5	4	5	4	5	4	5	4	4	5	4	3	5	5	5	5	4	4
ساپونین شماره ۴ Saponin No.4 Rf=0.31	8	8	7	7	8	6	7	7	8	8	6	6	6	7	7	4	10	10	9	9	4	5
ساپونین شماره ۵ Saponin No.5 Rf=0.46	4	1	1	1	3	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	3	3	3	3
ساپونین شماره ۶ Saponin No.6 Rf=0.52	6	4	6	4	5	3	2	6	3	5	3	3	5	6	6	6	8	8	3	4	3	3
ساپونین شماره ۷ Saponin No.7 Rf=0.59	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	8	8	1	2	0	0
ساپونین شماره ۸ Saponin No.8 Rf=0.8	3	2	1	2	3	3	3	2	3	3	2	1	1	1	3	3	2	3	2	1	2	3



شکل ۱ـ نمودار رگرسیون خطی بین میزان کل ساپونین و میزان خسارت لارو سرخرطومی برگ یونجه

Fig. 1. Diagram showing linear regression between total saponins and weevil larval damage

جدول ۷ـ معادلات رگرسیونی مربوط به ارتباط میزان کل ساپونین و خسارت سرخرطومی برگ یونجه

Table 7. Regression equations and correlation coefficients for total saponins and weevil damage

معادلهٔ رگرسیون Regression equation	ضرایب همبستگی Correlation coefficients	شماره معادله Equation No.
Y+=-0.07X+1 + 2.306	r1++= - 0.499*	(2)
Y0=-0.079X2 + 2.23	r2=-0.505*	(3)
Y=0.081X3 + 1.764	r3=0.537**	(4)
Y=0.039X4 + 1.868	r4=0.539**	(5)
Y=-0.031X5 + 2.244	r5=-0.269n.s.	(6)
Y=0.009X6 + 2.103	r6=0.125n.s.	(7)
Y=0.017X7 + 2.113	r7=0.292n.s.	(8)
Y=-0.061X8 + 2.28	r8=-0.423*	(9)

+ Y: میزان خسارت لاروسرخرطومی برگ یونجه، xi رتبه بندی ساپونین شماره i

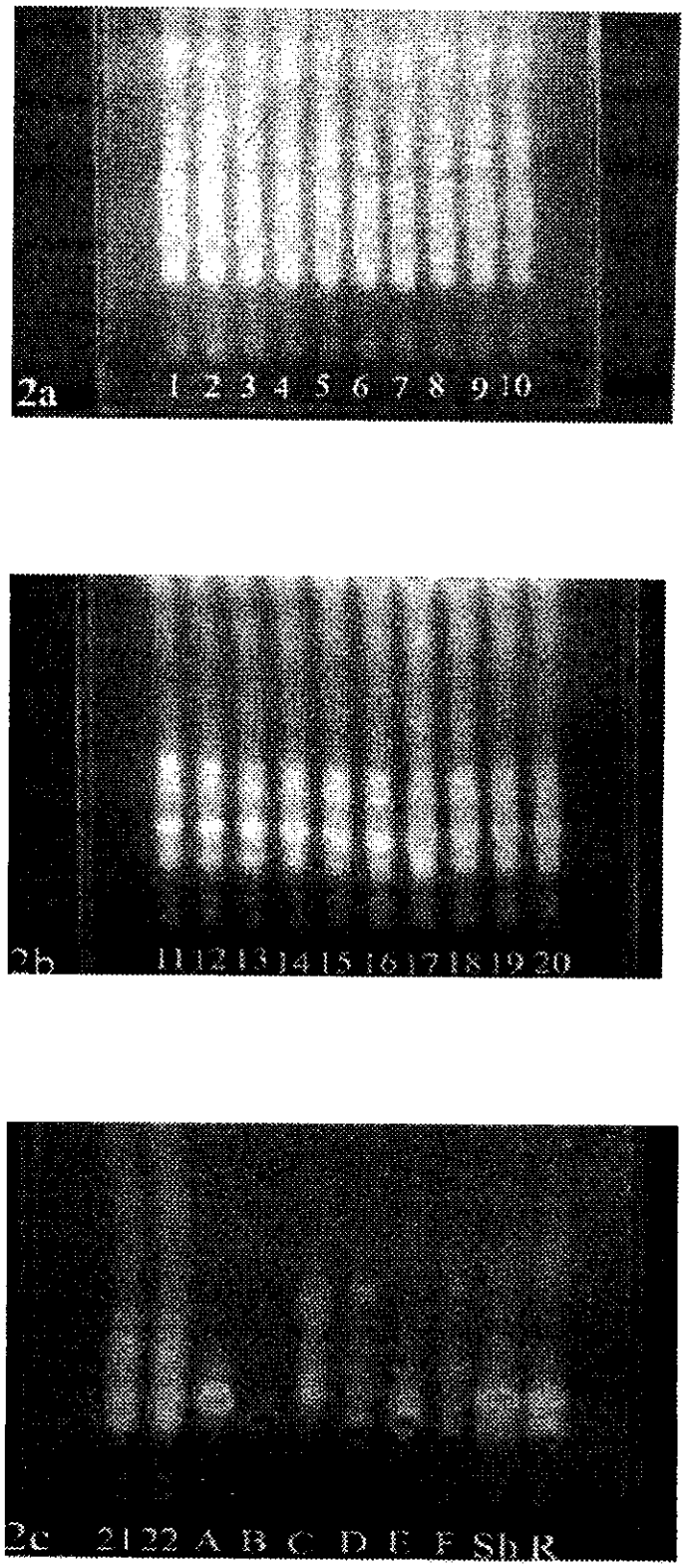
++ ri ضریب همبستگی بین الگوی باندی شماره i و میزان خسارت لاروسرخرطومی

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱، ns= غیر معنی دار

(Callosobruchus chinensis) در هیدرولیز ساپونین‌های سویا مطابقت ندارد. علاوه براین وجود برخی از ساپونین‌های واجد اثر مفید تغذیه‌ای (Probiotic effects)می‌تواند آثار منفی برخی از ساپونین‌های مضر را نسبتا" خنثی نماید و لذا لازم است که علاوه بر آزمایش اثر کل ساپونین، به بررسی اثر منحصر به فرد ساپونین‌ها نیز اقدام شود (Masahery - Laghab, 1997).

سمی نبودن ساپونین‌های یونجه برای لاروسرخرطومی برگ یونجه گویای آن است که انتخاب در جهت کاهش میزان کل ساپونین به منظور بهبود کیفیت غذایی یونجه احتمالا" کاهش در مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه ایجاد نخواهد کرد. البته اگر قصد چنین انتخاب و اصلاحی وجود داشته باشد نیاز است که آفات و بیماری‌های مهم یونجه، حداقل برای هر منطقه یا برای مناطق خاص در نظر گرفته شود.

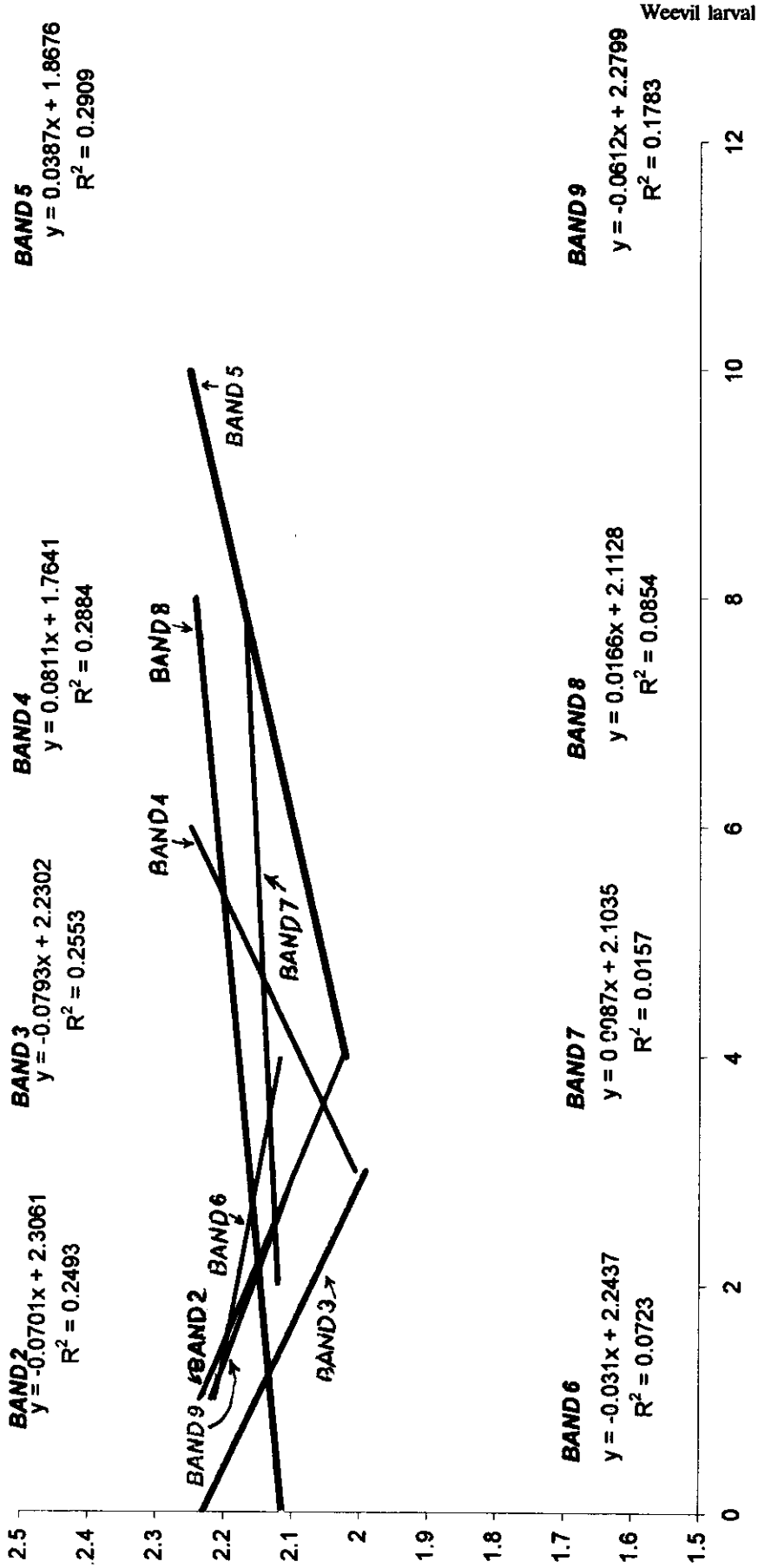
در بیشتر مطالعاتی که در مورد اثر متقابل ساپونین‌های یونجه‌با مقاومت به حشرات و بیماری‌ها انجام پذیرفته است میزان کل ساپونین در نظر گرفته شده است، لیکن از آنجا که در



شکل ۲ـ تصاویر TLC ارقام مورد آزمایش، عکسبرداری شده به کمک اشعهٔ UV(a,b,c)

Fig. 2. TLC pictures of varieties under study, photogaphed under UV (a,b,c)

خسارت لارو سرخرطومی Weevil larval damage



شکل ۳- نمودارهای رگرسیون خطی مربوطه به رابطه بین ساپونین‌های هشت گانه و خسارت لارو سرخرطومی برگ پونجه (معادلات ۲ تا ۹ جدول ۷)

Fig. 1. Diagram showing linear regression between different saponins and weevil larval damage (equations 2 to 9 in Table 7)

یونجه ساپونین‌های متفاوت با فعالیت بیولوژیکی متفاوت وجود دارند لذا بررسی انواع ساپونین‌ها و بررسی رابطه آن‌ها با مقاومت به آفات و بیماری‌ها می‌تواند درک بهتری از روابط موجود را میسر سازد. به همین منظور در این مطالعه، انواع ساپونین‌های اندام‌های هوایی یونجه در ارقام مورد آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند. همان طور که از معادلات (۲)،(۳) و (۹) برمی آید. ساپونین‌های شماره ۱، ۲ و ۸ با میزان خسارت لارو سرخرطومی برگ یونجه همبستگی منفی معنی دار دارند و به عبارتی رابطهٔ مستقیم با مقاومت به این آفت دارند. به چنین ترکیباتی اصطلاحا" آلومون (Allomone) گفته می‌شود. ترکیبات آلومون موادی هستند که توسط گیاه تولید شده و روی گیاهخوار اثر منفی دارند (Panda and Khush,1995). اصلاح در جهت کاهش میزان این ساپونین‌ها به منظور بهبود کیفیت غذایی یونجه باعث افزایش حساسیت به سرخرطومی یونجه خواهد شد. اگر این ساپونین‌ها رابطه‌ای با نفخ زایی نداشته باشند اصلاح در جهت افزایش این ترکیبات، می‌تواند باعث افزایش مقاومت به سرخرطومی گردد.

همان گونه که از معادلات (۴) و (۵) برمی آید، ساپونین‌های شماره ۳ و ۴ همبستگی مثبت معنی دار با میزان خسارت لاروسرخرطومی دارند و به عبارتی با میزان مقاومت به سرخرطومی همبستگی منفی دارند. به چنین ترکیباتی اصطلاحا" کایرومون (Kairomone) گفته می‌شود. ترکیبات کایرومون موادی هستند که توسط گیاه تولید شده و اثر مثبت روی گیاهخوار دارند (Panda and Khush, 1995). اصلاح در جهت کاهش میزان این ساپونین‌ها، علاوه بر بهبود کیفیت غذایی باعث افزایش مقاومت به سرخرطومی نیز خواهد شد. چنین وضعیتی بسیار مطلوب است و می‌توان گفت که در میان هشت ساپونین تفکیک شده، این دو ساپونین از لحاظ ارزش اصلاحی مهم‌ترین می‌باشند. از طرف دیگر این دو ساپونین شدیدترین الگوهای باندی را نیز در ارقام مختلف دارا بودند یعنی نسبت بالایی از ساپونین کل را شامل می‌شوند، و بنابراین اهمّیت کار اصلاحی بر روی آن‌ها دو چندان می‌گردد.

با ملاحظهٔ معادلات (۶)، (۷) و (۸) مشاهده می‌گردد که ساپونین‌های شماره ۵، ۶ و ۷ رابطه‌ای با میزان خسارت لاروسرخرطومی نشان نمی‌دهند. به منظور بهبود کیفیت غذایی یونجه می‌توان عملیات اصلاحی را در جهت کاهش این ساپونین‌ها انجام داد، بدون این که تغییری در مقاومت به سرخرطومی یونجه بوجود آید.

همانطور که مشاهده شد از هشت ساپونین تجزیه شده توسط TLC، سه ساپونین با میزان خسارت لاروسرخرطومی برگ یونجه رابطهٔ عکس، دو ساپونین رابطهٔ مستقیم و سه ساپونین عدم همبستگی نشان دادند و شاید بهمین دلیل باشد که میزان کل ساپونینها با مقاومت به سرخرطومی همبستگی نشان نمی‌دهد.

سپاسگزاری

این بررسی با کمک مالی دانشگاه تهران انجام شده است که بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده References

اسماعیلی، م. پ. آزمایش فرد و ا. میرکریمی. ۱۳۷۴. حشره‌شناسی کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران.

کریمی، هادی. ۱۳۶۹. یونجه. مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

هنسون. ک. ه. ۱۳۷۲. به نژادی یونجه. ترجمهٔ ع. م. رضایی، مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

مظاهری لقب، ح. ا. و ب. یزدی صمدی. ۱۳۷۰. بررسی مقاومت ارقام یونجه به سرخرطومی برگ یونجه. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۵. شماره ۱. صفحات ۱۱ تا ۱۷.

Applebaum, S.W., B. Gestenter, and Y.Birk. 1965. Physiological aspects of host specificity in the Bruchida-IV.Development incompatibility of soybeans for Callosobruchus .J. Insect Physiol 11:611-616.

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. Sci. 267:371-374.

Ebrahimzadeh, H. and V.Niknam. 1998. A revised spectrophotometric method for determination of triterpenoid saponins. Indian Drugs. **35**:379-381.

Fenwick, G.R., K.R. Price, C. Tsukamoto and K. Okubo. 1991. Saponis in toxic substances in crop plants. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 285-327.

Hostettmann, K. and A. Marston. 1995. Saponins. Cambridge University Press, Cambridge.

Ireland, P. A. 1987. Analysis of sapanins. Ph.D. thesis. Reading University,U.K.

Khalil, A.H. and T.A.El-Adawy. 1994. Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes. Food Science and TechnologDepartment,Faculty of Agriculture, Menofiya Universiy, Shibin El-Kom,Egypt.

Massiot, G.C.Lavaud, M.Benkhaled, and L.L.Men-Oliver.1992. Soyasaponin A. New maltol cojugate from alfalfa and soybean. J. Nat. prod. **55**:1339-1342.

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

Mazahery-Laghab, H. 1997. Endogenous resistance to insect pests in alfalfa engineering for enhanced resistance. Ph.D. thesis. Durham Unkversity, U.K.

Omar, S.A., N.A. I. Osman and A.A. Hanafi. 1996. Controlling white rot disease in onion using alfalfa saponin. Bulletin of Facuity of Agriculture,University of Cario. **47**:319-330.

Panda, N. and G. S. Khush. 1995. Host plant resistance to insects. CAB International. Pedersen, M.W., D.K. Barnes, E.L. Sorensen, G.D.Gliffin, M.W.Nielson,

R.R.Hill, F.I. Frosheiser, R.M. Sonoda, C.H.Hanson, O.J.Hunt, R.N. Peaden, J.H.Elgin, T.E.Davine, M.J. Anderson, B.P.Goplen, L.J. Elling and R.E. Howarth. 1976. Effects of low and high saponin selection in alfalfa on agronomic and pest resistance traits and the interrelation of these traits. Crop Sci. **16**:193-199.

Peri, I., and Y.Birk. 1980. Biosynthesis of triterpenoid sapogenols in soybean and alfalfa seedlings. Phytochem. **18**:1671-1674.

Shany, S.B. Gestenter, Y.Birk and A.Bondi. 1970.Lucerne saponins: III. Effecsts of lucerne saponins on larval growth and their detoxification by various sterols. J. Sci. Food Agric. **21**:508-510.

Stuteville, D.L. and D.Z. Skinner. 1987. Effect of selecting for downy mildew resistance in alfalfa on saponin content. Crop Sci. **27**:906-908.