

بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات ساپونینی استخراجی از برگ چغندر قند (*Beta vulgaris* L.)
روی شته خالدار یونجه (*Therioaphis maculate* Buckten)

Biological effects of saponin components extracted from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaf on spotted alfalfa aphid (*Therioaphis maculate* Buckten)

مهدی کاکایی^۱ و حجت‌اله مظاهری‌لقب^{۲*}

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۲

م. کاکایی و ح.ا. مظاهری لقب. ۱۳۹۴. بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات ساپونینی استخراجی از برگ چغندر قند (*Beta vulgaris* L.)، روی شته خالدار یونجه (*Therioaphis maculate* Buckten). چغندر قند، ۳۱(۲): ۱۸۹-۱۹۹

چکیده

در آزمایش حاضر، نقش بیولوژیکی ساپونین‌های برگ چغندر قند در سنجش‌های زیستی شته خالدار یونجه با به‌کارگیری تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک مطالعه شد. بعد از استخراج ساپونین از برگ و تأیید وجود ساپونین، سه غلظت از ساپونین‌ها، به علاوه یک تیمار جیره غذایی فاقد ساپونین (شاهد) در پنج تکرار مورد تغذیه اجباری شته قرار گرفتند. وضعیت زنده مانی و باروری آن‌ها ارزیابی و مورد تجزیه آماری قرار گرفت. نتایج زیست‌سنجی، نه تنها اختلال در باروری را نشان داد بلکه، سمیت ساپونین برگ برای شته‌ها را در غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر ثابت کرد. برعکس، غلظت پایین ساپونین (۱/۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به دو تیمار ساپونین‌دار دیگر واجد اثرات مفید حیاتی یک برای تولید پوره بود. غلظت‌های متوسط نیز باعث کاهش ۵۰ درصدی باروری شته‌ها نسبت به تیمار شاهد شدند. نتیجه حاصل از کروماتوگرافی، بیان دو لکه متراکم ساپونین ترپنوئیدی برگ روی پلیت TLC بود. نتیجه کلی این‌که ترکیبات ساپونینی برگ چغندر قند واجد اثرات بیولوژیکی هستند. لذا، علاوه بر این که امکان استفاده از ساپونین برگ چغندر قند برای کنترل آفات از طریق اصلاح و ایجاد تحمل در گیاهان وجود دارد، می‌توان بعد از آزمایشات خاص، از آن‌ها به عنوان سم بیولوژیک و حتی دارو نیز استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اثرات زیستی، چغندر قند، ساپونین برگ، شته خالدار یونجه، کروماتوگرافی لایه نازک

۱ - استادیار دانشگاه پیام‌نور، گروه مهندسی کشاورزی (اصلاح نباتات و ژنتیک)، تهران - ایران
۲ - دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا-همدان. *نویسنده مسئول mazahery@yahoo.co.uk

مقدمه

چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) منبع مولد ساکارز و بسیاری از مواد و ترکیبات بیوشیمیایی است. برگ، تفاله و ملاس آن در سطح وسیع برای تغذیه دام مصرف دارند. وزن تر برگ تقریباً معادل با ریشه است، برداشت برگ از این گیاه، حدود ۵۰ تن در هکتار معادل با، پنج تا شش تن ماده خشک می‌باشد (Cooke and Scott 1998). برگ چغندر قند در زراعت به عنوان یکی از اجزا بدون استفاده کشاورزی محسوب می‌گردد که هر ساله بعد از برداشت ریشه، در مزرعه چغندر قند باقی می‌ماند. مقداری از آن به مصرف دام و بقیه به عنوان کود سبز به خاک برگردانده می‌شود (Feizi 2009). تغذیه بیش از حد و طولانی مدت دام از برگ چغندر قند به صورت تازه و یا خشک، مشکلات تغذیه‌ای را در پی دارد، با این حال، برگ چغندر قند اهمیت زیادی دارد به طوری که حذف متداول برگ این گیاه، در مراحل مختلف رشد به هر میزانی که باشد، باعث کاهش عملکرد ریشه و افت کیفیت چغندر قند شده و ضایعات شکر استحصالی را به دنبال دارد (Cooke and Scott 1998).

کاهش میزان کلسترول و گلیسیرید در بدن، کاهش فشار خون، سم‌زدایی و پاکسازی بدن، پیشگیری از سرطان پوست و ریه، شوره‌زدایی از موی سر و خاصیت شپش‌کشی از جمله خواص موجود در برگ‌های چغندر قند گزارش شده‌اند (Jadidi et al. 2011). تا کنون، اثرات بیولوژیکی ساپونین‌ها روی حلزون‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، حشرات، پروتوزوآها، سلول‌های غیرطبیعی کبد موش صحرائی، سلول‌های وخیم، سلول‌های تنفسی ماهی، زاد و ولد حیوانات، غشاءهای سلولی، جذب غذا و رشد حیوانی، جذب مواد غذایی، هضم پروتئین، واکنش‌های اکسیداسیونی، متابولیسم کلسترول، و سیستم‌های ایمنی و عصبی بررسی شده‌اند

(Mazahery-Laghab et al. 2011). این موارد می‌تواند به وجود اثرات مفید بیولوژیکی مثل بهداشتی، دارویی و حشره‌کشی و غیره در برگ چغندر قند ارتباط داشته باشد. کشف و شناسایی عوامل بیوشیمیایی مثل ساپونین‌های واجد اثرات بیولوژیکی، امکان دسترسی به ابزارهای ژنتیکی قابل انتقال به گیاه (ان) جدید را فراهم می‌کند. ساپونین‌ها واجد ترکیبات پیچیده و متنوع هستند، مقدار آن‌ها نیز حتی در یک گیاه با هم فرق دارد (Bowyer et al. 1995 و Fenwick et al. 1991). برخی از گیاهان زراعی واجد ساپونین مثل چغندر قند، جودوسر (*Avena sativa* L.) و حبوبات مصرف انسانی، برخی مثل یونجه (*Lupinus* sp.) و گونه‌های لوپین (*Medicago sativa* L.) مصرف حیوانی و برخی مثل *Panax* sp., *Gypsophila* *Yucca* sp., *Glycyrrhiza glabra* sp., مصرف دارویی، عطری و بهداشتی دارند (Fenwick et al. 1991). ارزیابی بیولوژیکی ترکیبات بیوشیمیایی موجود در تره تیزک‌های زمستانی (*Lepidium sativum* L.) کاملاً حساس و مقاوم به لارو سوسک جهنده تره-تیزک (*Barbarea vulgaris* R.)، مرگ‌ومیر لارو این حشره آفت بررسی گردید (Kuzina et al. 2009). نتیجه بررسی نشان داد که اثرات موجود در نتاج F2، به وجود ساپونین‌های هدرآژنین (*Hederagenin cellobioside*) و اولتانولیک اسید (*Oleanolic acid*) و دو ساپونین متفرقه دیگر بستگی دارد. وجود ساپونین‌های چغندر قند که مهم‌ترین آن‌ها با نام گلیکوساید اولتانولیک اسید خوانده می‌شود، بیش از ۱۰۰ سال است که توسط ریدوت و همکاران (Ridout et al. 1994) از ساختمان یکی از فراوان‌ترین ساپونین‌های چغندر قند توأم با یک ترکیب دیگر مونودسموسایدی سه‌قندی اولتانولیک اسید که قبلاً به عنوان ترکیبی غیر ساپونینی گزارش شده بود، نیز گزارش دادند. این

مواد و روش‌ها

از مزرعه یونجه (واریته همدانی) شته‌های خالدار جمع‌آوری گردید پرورش و تجدید نسل دوباره شته‌ها روی بوته‌های یونجه به عنوان میزبان اصلی، در گلخانه و اطاقک پرورش حشره دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد. با تغذیه مناسب و کنترل دقیق شته‌ها، جامعه والدی یکسان (کلون) ایجاد گردید. در آزمایشگاه استخراج و خالص‌سازی ساپونین، و همچنین ارزیابی بیولوژیکی شته‌ها صورت گرفت. از شته‌های با حداکثر سن یک روز برای ارزیابی زیستی استفاده گردید.

استخراج ساپونین‌های خام از برگ چغندر قند

برگ‌های چیده شده چغندر قند مورد کشت در همدان در نیتروژن مایع مورد عمل انجماد قرار گرفته و در شرایط سرما به یک هاون چینی (روی یخ خرد شده) منتقل و سپس ضمن افزودن نیتروژن مایع، پودر گردیدند. برای استخراج ساپونین‌ها، ۵۰ گرم از بافت‌های پودر شده در ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ (پنج میلی‌لیتر در ازای هر گرم بافت برگ) در شرایط آزمایشگاه و در یک شبانه‌روز (۲۴ ساعت) در روی یک دستگاه گرداننده مغناطیسی به هم زده شدند. محلول حاضر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $3600 \times g$ سانتریفوژ شد، دو لایه در داخل فلاسک مربوطه ایجاد شد. لایه متانول بالایی از لایه پایینی محتوی مواد جامد بافت برگ جدا و به فلاسک ته گرد کوچک‌تری منتقل شد. متانول موجود در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه تبخیرکننده چرخشی تبخیر گردید. مقدار ماده رسوبی باقی مانده در ته فلاسک، با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر مورد شست‌وشو قرار گرفت و تا موقع لزوم، به عنوان ساپونین‌های خام، در فریزر در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگاه‌داری گردید.

ساپونین‌ها در ریشه گیاه تازه و شاداب دیده نشدند اما از ملاس و قسمت‌های هوایی گیاه مثل برگ‌ها جدا گشتند (Ridout *et al.* 1994). وجود ساپونین‌های بتا- وولگاروساید I، II، III و IV توسط یوشیکاوا و همکاران (Yoshikawa *et al.* 1999) و بعد از شناسایی نوعی مشابه با این خانواده کوچک ساپونین در گیاه چغندر قند به نام بتا- وولگاروساید ۳، سنتز مصنوعی آن نیز توسط Zhu و همکاران در سال 2008 گزارش شد.

یوشیکاوا و همکاران (1999) با استفاده از مستندات شیمیایی و فیزیکوشیمیایی الیگوسایدهای اولئانولیک اسید، بتا وولگاروسایدهای I، II، III، و IV محتوی یک اسید در ریشه چغندر قند به همراه بتا وولگاروسایدهای VI، VII و VIII خبر دادند. یکی از آفات مهم یونجه شته خالدار یونجه است. این گونه، واکنش‌های سمی سختی را در بوته‌های یونجه حساس به علت کلروزه و نکروزه شدن برگ‌ها که از قسمت‌های پائین گیاه شروع می‌شود ایجاد می‌نماید. یکی از علایم خسارت غیرعادی شته خالدار یونجه، بی‌رنگ شدن رگ برگ‌های، برگ‌های تازه تشکیل شده انتهایی است که نواری شدن رگ برگ نامیده می‌شود. بوته‌هایی که شدیداً به شته آلوده هستند طی یک تا دو هفته از بین می‌روند و ممکن است کاهش استقرار گیاه مخصوصاً در سال‌هایی که آلودگی در آخر زمستان یا بهار رشد رویشی کم است زیاد باشد. هم‌چنین شته خالدار یونجه تهدیدی جدی برای مزارع تازه کشت شده است چرا که فراوانی فصلی آن از مرداد تا مهرماه در حداکثر مقدار خود است. از طرف دیگر احتمال از بین بردن مزارع تازه کشت شده حتی در واریته‌های مقاوم وجود دارد. هدف اصلی آزمایش حاضر، مطالعه و مشاهده ساپونین تری-نوییدی در برگ چغندر قند و بررسی نقش بیولوژیکی این ساپونین (ها) روی شته خالدار یونجه می‌باشد.

خالص سازی ساپونین ها

۵۰ میلی لیتر ساپونین های خام به قیف جدا کننده ۲۵۰ میلی لیتری منتقل گردید. ۲۵ میلی لیتر بوتانول نرمال اشباع شده از آب به محلول اضافه و خوب مخلوط گردید. فونل در روی پایه مربوطه اسقرار یافت تا بعد از مدت چند دقیقه عمل جداسازی محلول مخلوط صورت گرفت و دو لایه تشکیل شد. لایه بالایی بوتانل و لایه پایینی آب بود. لایه آبدار مجدداً با همان مقدار اولیه بوتانل اشباع از آب مخلوط و لایه بوتانلی جدا و حفظ گردید. این عمل جداسازی سه بار انجام شد. لایه های بوتانل با هم مخلوط و بوتانل آن در سیستم روتاری در حالت خلاء و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد تبخیر و ساپونین های خالص باقی ماندند. ماده جامد ساپونین خالص کل با ۱/۵ میلی لیتر متانول ۱۰۰ درصد حل و برداشت شد. ۱۵۰ میکرولیتر از این محلول متانولی جهت کروماتوگرافی برداشته شد. الکل مابقی محلول در دستگاه روتاری تبخیر و رسوب حاصل در ۴۵ میلی لیتر آب مقطر حل و جهت استفاده در ارزیابی زیستی شته در یخچال نگه داری گردید.

کروماتوگرافی لایه نازک

این تکنیک با نمونه گذاری ۱۰ میکرولیتری برداشت شده از فاز بالایی ساپونین های استخراجی و خالص شده با بوتانول اشباع از آب و یا ۱۵ میکرولیتر از نمونه ساپونین های خام حل شده در متانول روی پلئیت شیشه ای پوشیده شده با ژل سیلیکای از نوع 60F254 ساخت کمپانی مرک آلمان انجام شد. ابتدا نمونه های ساپونین دار مایع در لوله های ۱/۵ میلی لیتری اپندروف به مدت دو الی سه دقیقه، در دور $3600 \times g$ سانتریفوژ شدند. نمونه گذاری ساپونین ها با سمپلر صورت گرفت. نمونه ها با فاصله ۱/۵ سانتی متر از یکدیگر در روی پلئیت چکانیده شدند و سریعاً با

یک مو خشک کن برقی خشک گردیدند تا از عمل پراکندگی زیاد آن ها جلوگیری شود. پلئیت آماده شده در مایع حلال ترکیبی به صورت استات اتیل: آب مقطر: اسید استیک به ترتیب به نسبت ۷:۲:۲ حجمی مخصوص آنالیز ساپونینی در داخل یک تانک TLC گذاشته شدند تا عمل حرکت و جداسازی ترکیبات مختلف بر روی پلئیت ها خوب انجام شد.

بیان باندهای ساپونین روی پلئیت TLC

پلئیت TLC بعد از خشک شدن در زیر هود آزمایشگاه، با معرف اسیدی مرکب از متانول: استیک آن هیدریک: و اسید سولفوریک به نسبت ۱۰:۱:۱۰ اسپری گردید و در داخل آن در دمای ۱۰۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پلئیت اسپری شده در زیر نور ماوراء بنفش با طول موج ۳۰۰ نانومتر در دستگاه ترانس لومیناتور مورد رؤیت واقع شد. به دلیل وجود خاصیت محو شدن سریع رنگ های مربوط به باندهای ساپونینی، فاصله نسبی برای هر باند ایجاد شده محاسبه گردید. ضمناً از TLC های مناسبی که باند واضح تری داشتند، عکس تهیه گردید.

تغذیه آزمایشگاهی شته ها

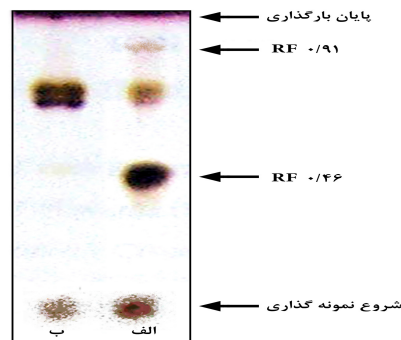
از پتری دیش های استریل با قطر دهانه ۲/۵ سانتی متر برای تغذیه حشرات استفاده گردید. جیره غذایی به صورت مایع و فرموله شده و بر اساس روش (Febvey et. al. 1988)، تهیه شد. ترکیبات تشکیل دهنده این جیره شامل ۱۰ نوع ویتامین، ۲۲ نوع اسید آمینه، پنج نوع ترکیبات فلزدار، و ترکیبات دیگر محتوی سولفات و پتاس و هم چنین ساکارز بودند. به منظور ارزیابی بیولوژیکی شته، ابتدا تعداد پنج شته با حداکثر سن ۱۲ ساعت (یک روزه) به وسیله بورس نرم و مناسبی به روی کاغذ صافی

پوره‌های تولیدی از شته‌های مادر به صورت تجمعی مورد ثبت و یادداشت‌برداری قرار گرفتند.

تجزیه آماری با بکارگیری نرم افزار Statview (v.4.5) صورت پذیرفت. تفاوت‌های موجود در بین تیمارها و کنترل با آزمون‌های تی غیرجفتی اما تفاوت در وضعیت‌های باروری و زنده مانی با بکارگیری آزمون Mann-Whitney ارزیابی شدند. معیار پذیرش فرض یک در این پژوهش با احتمال کمتر از پنج درصد منظور شد.

نتایج و بحث

مجموعه ساپونین خام استخراجی از برگ بعد از افتراق و جداسازی، خالص و از طریق کروماتوگرافی لایه نازک تجزیه گشته و مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج حاصل از کروماتوگرافی در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱ کروماتوگرافی ساپونین‌های خام و خالص شده استخراجی از برگ چغندرقد نوار الف- عصاره‌های خام ساپونین‌ها، نوار ب- مخلوط ساپونین‌های خالص شده با بوتانل

کروماتوگرافی لایه نازک، باندهایی روی ژل سیلیکا ایجاد شدند که از شدت و رنگ‌های مختلفی برخوردار بودند. بنابراین، به عنوان نشانگرهای خوبی برای وجود و اثبات ساپونین

موجود در ته پتری دیش منتقل و مستقر شدند (واحد آزمایش). یک لایه پارافیلیم بر روی دهانه پتری کشیده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غذای مصنوعی بوسیله سمپلر بر روی پارافیلیم نمونه‌گذاری گردید. لایه دیگری از پارافیلیم مجدداً روی پارافیلیم اولی کشیده شد به طوری که غذای مصنوعی در بین دو لایه پارافیلیم قرار گرفت. در مجموع، سه سطح تیماری به صورت سه غلظت ساپونین به مقادیر ۰/۱، ۰/۳ و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر و یک شاهد شامل منحصراً جیره غذایی و بدون ساپونین بود. تعداد پنج تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. مجموعه پتری دیش‌های حاوی شته‌ها در روی یک سینی مناسب از نوع پلاستیک سخت و فشرده در اتاقک رشد استریل و تنظیم شده در ۲۲/۵ درجه سلسیوس و نسبت روشنایی به تاریکی ۱۶ به هشت ساعت، نگهداری شدند. جیره غذایی بین پارافیلیم‌ها یک روز در میان تعویض شد. زیست‌سنجی شته‌ها حدوداً دو هفته طول کشید، هر روز تعداد مرگ‌ومیر شته‌های در حال تغذیه و تعداد

روشی که برای استخراج ساپونین‌ها اعمال گردید، منحصراً خاص استخراج ساپونین‌های گلیکوساید از نوع تربوئیدی بود. با تجزیه ساپونین‌های برگ چغندرقد از طریق

ترکیب ساپونینی بر اساس نتایج حاصل از کروماتوگرافی و پژوهش یوشیکاوا و همکاران (Yoshikawa *et al.* 1996) وجود ساپونین‌های بتا- وولگاروساید پنج و نه را در روی TLC اثبات کرد. بتا وولگاروساید III نیز توسط ژو و همکاران (Zhu *et al.* 2008)، معرفی گردید. کار بیشتر جهت شناسایی دقیق‌تر این ساپونین‌ها با به‌کارگیری ساپونین‌های خالص تجاری و سایر روش‌های شناسایی جهت تعیین هویت ساختمانی مثل CNMR بعد از خالص‌سازی کامل آن‌ها الزامی و مورد توصیه اکید می‌باشد.

سنجش زیستی شته و تعیین اثرات بیولوژیکی ساپونین‌ها مرگ و میر شته‌ها

ارزیابی بیولوژیکی شته‌ها و تعیین نقش و فعالیت بیولوژیکی ساپونین‌های با غلظت‌های مختلف، در شکل‌های ۲ و ۳ که بیان‌گر نحوه تأثیر ساپونین‌ها بر روی بقا و زادوولد حشرات مورد مطالعه می‌باشند، به عمل آمد. هر سه غلظت ساپونین‌های برگ چغندر قند در ۴-۶ روز اول ارزیابی، اثراتی نسبتاً مشابه ولی متفاوت از شاهد روی تلفات و مرگ‌ومیر شته‌های تغذیه‌کننده در روی تیمارهای حاوی جیره غذایی داشتند (شکل ۲). در این مدت، در تیمارهای با غلظت‌های متفاوت ساپونین، تعداد حشرات به ۶۰-۵۰ درصد در مقایسه با شاهد نسبت به جمعیت اولیه، کاهش یافتند. بعد از این کاهش سریع اولیه، تعداد شته‌های زنده مانده در روی تیمارهای ساپونین و شاهد از یک وضعیت بدون تغییری برخوردار بود. به نظر می‌رسد که این شته قادر است بعد از حدود شش روز تغذیه تا مدت پنج الی شش روز دیگر بدون مرگ‌ومیر و به صورت نسبتاً پایدار زندگی کند و احتمالاً این وضعیت می‌تواند به به باروری شته‌ها منتج شود. همان‌طور که در شکل ۳ پیداست،

تری‌ترپنوئیدی در برگ چغندر قند مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه ترکیبات خام اولیه، لکه باندی با رنگ قهوه‌ای سوخته بسیار متراکم در $R_f = 0/46$ ایجاد کرد (شکل ۱-الف). باند دیگری در بالاتر از باند قبلی و در $R_f = 0/74$ لکه‌ای نسبتاً تاریک به رنگ زرد ایجاد شد. لکه سوم در این نوار، در $R_f = 0/91$ با تراکم بسیار ضعیف و رنگ نامشخص پدیدار شد. امکان این که این باندها ناشی از ترکیبات ساپونینی باشد وجود دارد با این حال، هر چند روشی که در این پژوهش به‌کار گرفته شد، خاص استخراج ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی خام می‌باشد، وجود ترکیبات بیوشیمیایی دیگری در استخراج متانولی (نوار الف)، دور از انتظار نیست. خالص‌سازی با استفاده از بوتانول اشباع از آب، مخلوطی از ساپونین‌های خالص را بوجود می‌آورد به‌طوری که دو لکه متراکم و نزدیک به یکدیگر در محل‌های با $R_f = 0/72$ و $R_f = 0/76$ به ترتیب به رنگ‌های قرمز ارغوانی و سبز تیره دیده شد. این دو لکه باندی به‌عنوان دو ساپونین مهم موجود در برگ چغندر قند به نام‌های وولگاروساید‌های پنج و نه قبلاً مورد شناسایی واقع شده- اند (Yoshikawa *et al.* 1996).

در ریشه و برگ چغندر قند نیز مواد متابولیکی ثانویه‌ای از نوع ساپونین‌ها وجود دارند که قابلیت دفاعی و دارویی را به این گیاه داده‌اند. گلیکوساید اولتانولیک اسید، مهم‌ترین ساپونین چغندر قند، بیش از ۱۰۰ سال است که گزارش شده است (Ridout *et al.* 1994). نامبردگان، ساختمان یکی از فراوان‌ترین ساپونین‌های چغندر قند توأم با یک ترکیب دیگر مونو دسموسایدی سه‌قندی اولتانولیک اسید را نیز گزارش کردند، این ساپونین‌ها در ریشه تازه گیاه دیده نشدند اما از ملاس و قسمت‌های هوایی مثل برگ‌ها استخراج گشتند. یک بیس‌دسموساید تتراساکارییدی دیگری نیز از برگ‌ها استخراج و شناسایی گردیده است. وجود دو

شناسایی ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی ناشی از برگ‌های چغندر قند گزارش شده است با این حال، با تلاشی که به عمل آمد، محققین این گزارش موفق به یافتن تحقیقات مشابه زیادی در ارتباط با بررسی اثرات بیولوژیکی این ترکیبات در برگ چغندر قند نشدند. با این وجود، در سال ۱۳۸۳ در مرکز تحقیقات کشاورزی همدان آزمایشی مرتبط صورت گرفت که در نتیجه آن، اثرات بیولوژیکی ساپونین‌های برگ چغندر قند روی باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم، ساق سیاه، اسکب و پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در شرایط *In vitro* نیز به اثبات رسید (Bagheri and Mazahery-Laghab 2004).

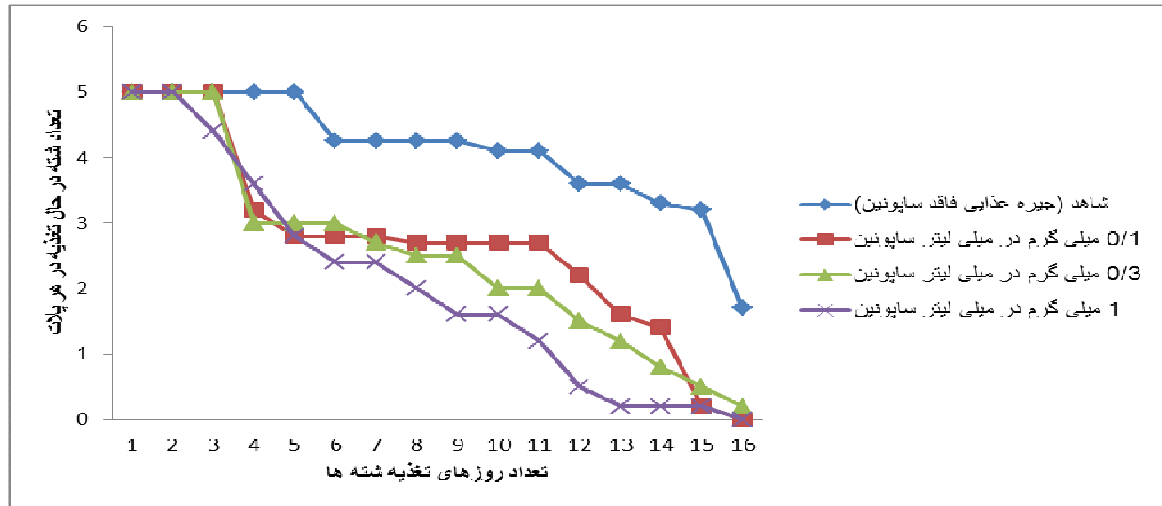
باروری شته‌ها

تأثیر ساپونین‌ها بر روی وضعیت باروری شته‌ها در شکل ۳ مشخص است. شته‌های تغذیه کننده از جیره غذایی شاهد و هر سه غلظت ساپونین‌های برگ تا نه روز اول ارزیابی هیچ پوره‌ای تولید نکردند. معمولاً این عدم باروری به دلیل نرسیدن به رشد مطلوب برای باروری در شته‌ها می‌باشد. باروری از روز نهم به بعد، با تولید پوره از شته‌های تغذیه شده با غذای فاقد ساپونین (شاهد) و تیمار ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ساپونین شروع گردید. شروع باروری در شته‌های تغذیه شده با تیمار غذایی واجد یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر ساپونین با یک روز تأخیر صورت گرفت. تعداد پوره‌های تولید شده حالت تصاعدی داشت. با افزایش غلظت ساپونین، سرعت تولید پوره به صورت معنی‌دار و به حالت تصاعدی کاهش داشت به طوری که، در روز ۱۶، تولید پوره به وسیله غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳ و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به ترتیب حدود ۱۵، ۷۲ و ۹۴ درصد نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد. با این حال، در ازای هر شته و در مقایسه با شاهد، کاهش تولید پوره،

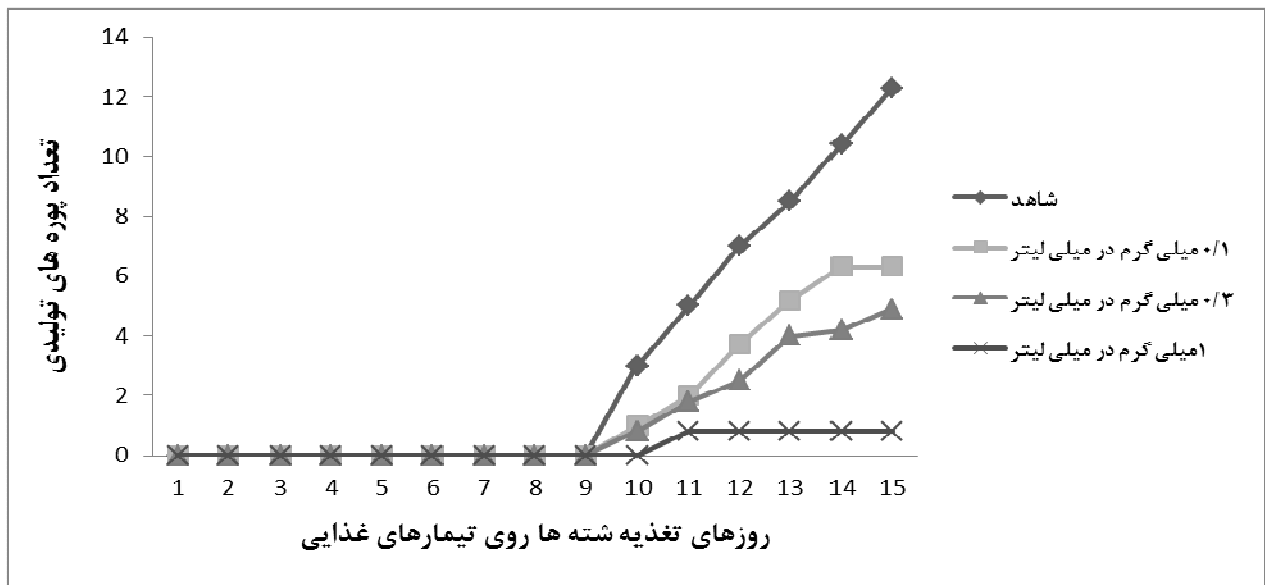
با تولید پوره از روز دهم، تعداد مرگ‌ومیر شته‌ها نیز افزایش یافت. در واقع، می‌توان چنین استنباط کرد که وقتی شته‌های بالغ با داشتن خاصیت بکرزایی توان و انرژی خود را در جهت تولید پوره مصرف می‌کنند، مسلماً می‌تواند از توان و انرژی نگهداری و حیاتی آن‌ها بکاهد و در نتیجه، مرگ‌ومیر بیشتر آن‌ها را سبب شود. با توجه به گرایش همسوی منحنی شاهد با منحنی‌های تیمارهای دیگر، شته خالدار یونجه نمی‌تواند سازگاری مطلوبی برای استفاده از برگ چغندر قند پیدا کند و در نهایت تحت تأثیر ساپونین‌ها، تلفات شته‌های تغذیه کننده به شدت افزایش می‌یابد. کاهش شدید اولیه تعداد شته‌های تغذیه کننده روی تیمارهای غذایی و شاهد، سازگاری نسبی شته‌ها و متعاقباً افزایش مرگ‌ومیر آن‌ها (شکل ۲) بیان‌گر تأثیر و نقش بیولوژیکی این ترکیبات ساپونینی موجود در برگ چغندر قند می‌باشد. شته‌های موجود در روی تیمارهای ساپونین تا وقتی که تولید پوره از شته‌های مادر صورت گرفت، ساپونین‌ها در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، مرگ‌ومیر قابل توجهی نداشتند در حالی که غلظت بالاتر ساپونین (یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر) سبب مرگ‌ومیر بیشتر شته شد تا زمانی که تعداد شته‌های زنده به حدود ۵ درصد جمعیت اولیه در روز سیزدهم رسید (حدود ۳۴٪ نسبت به شاهد). این در حالی بود که درصد شته‌های زنده در این روز در اثر تغذیه از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ساپونین، نسبت به تیمار شاهد در حدود ۵۰٪ بود. این نتیجه می‌تواند بیان‌گر این باشد که نقش و اثرات بیولوژیکی ساپونین‌های چغندر قند در این غلظت‌ها دارای اثرات متوسط بر میزان زنده‌مانی شته‌های در حال تغذیه است. در واقع، شدت نقش بیولوژیکی و اثرات کشندگی ساپونین‌های برگ چغندر قند با افزایش غلظت می‌تواند افزایش یابد. در مطالعه حاضر، هر چند وجود، استخراج و

جزء در حالت غلظت بالای ساپونین مشاهده شد. نتایج فوق نشان‌دهنده وجود نقش فعال بیولوژیکی ساپونین تریترپنویید در برگ چغندرقد می‌باشند به طوری که، غلظت‌های دوم و سوم ساپونین‌های برگ چغندرقد در جیره غذایی مصنوعی می‌توانند برای شته مورد مطالعه سمی باشند. هر چند با توجه به تنوع ساختمانی انواع ساپونین‌ها و نوع و بیوتیپ حشرات، امکان بروز اثرات بیولوژیکی متفاوتی وجود دارد. نمودار بیان‌گر این هم می‌باشد که، غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به دو تیمار ساپونین‌دار دیگر برای تولید پوره واجد اثرات زیستی روی شته‌ها بود و شته‌ها تقریباً تعداد پوره مساوی با شاهد تولید نمودند. با چنین وضعیتی می‌توان چنین ادعا نمود که وقتی ساپونین‌ها به عنوان یک ماده بیوشیمیایی قابل سنتز در گیاهان می‌توانند به عنوان عامل دفاعی گیاه و به عبارتی به‌عنوان عامل ایجادکننده مقاومت از نوع آنتی‌بیوز عمل نماید، غلظت کم این ترکیبات کف‌کننده نه تنها ممکن است که برای گیاه‌خواران اهلی مثل نشخوارکنندگان سمی نباشد و آن‌ها را به نفخ شکم مبتلا نکند. با این وجود، ارزیابی از ایفای نقش بیولوژیکی ساپونین‌ها در ایجاد مقاومت گونه‌های گیاهی مختلف به عوامل خارجی از جمله پاتوژن‌های گیاهی و حشرات، نمی‌تواند به تنهایی ساپونین‌های متفاوت را به عنوان مسئول ایجاد مقاومت معرفی نماید. معمولاً در یک بافت بخصوص که محل و منشأ تولید ساپونین(ها) می‌باشد، علاوه بر وجود تنوعی از ساپونین‌ها، کنش و واکنش‌های انواع دیگری از مواد متابولیکی ثانویه نیز بایستی مورد توجه قرار گیرد. دلیل این امر این است که مقاومت ممکن است ناشی از اثرات متقابل مکانیسم‌های مقاومت متفاوت باشد که گیاه می‌تواند

این مقاومت را حفظ و توسعه دهد. به‌طور کلی، اهمیت همکاری‌ها و تداخل‌های ایجاد شده به وسیله ساپونین‌ها از ساپونینی به ساپونین دیگر، از میکروبی به میکروب دیگر، از حشره‌ای به حشره دیگر، و همچنین از یک گونه گیاهی نسبت به گونه(های) دیگر فرق می‌کند. با این حال، ناپیوستگی اثرات همکاری و تداخل سایر ترکیبات بیوشیمیایی را با ترکیبات ساپونینی از نظر دور داشت. نهایتاً، با توجه به مشاهده اثرات زیستی ساپونین موجود در برگ چغندرقد می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این ترکیبات واجد اثرات بیولوژیکی (مثل بروز مقاومت ژنتیکی در گیاهان و بروز خواص دارویی در طب و درمان) هستند. لازمه استفاده بهینه از بافت این گیاه، توصیه به آزمایش(هایی) توسط داروسازان است تا از این منبع مولد یعنی برگ چغندرقد، این ترکیبات بیوشیمیایی را به‌عنوان یک ماده اولیه و مؤثر استفاده قرار دهند. تحریری ادبی و همکاران (Tahriri Adabi et al. 2009) در مطالعه‌ی با عنوان مقایسه پارامترهای رشد جمعیت زنبور پارازیتوئید نسبت به شته میزبان روی چهار رقم چغندرقد در شرایط آزمایشگاه نتیجه‌گیری نمودند که می‌توان اظهار نمود که ارقام مختلف چغندرقد بر پارامترهای رشد جمعیت دشمن طبیعی اثرگذار است. ون امدن (Van Emden 1972)، حساسیت ارقام مختلف کلم (*Brassica oleracea*) به شته سبز هلو بر اساس تعادل از آمینواسیدها مطلوب و نا مطلوب به رشد شته، و غلظت بازدارنده آلبل ایزوتیوسیانات، را مطالعه کردند که ایده ارزیابی بیوشیمیایی برای اولین بار توسط کلون و همکاران (Klun et al. 1970) بیان گردید.



شکل ۲ وضعیت زنده‌مانی شته‌های تغذیه کننده از تیمارهای غذایی مصنوعی واجد ساپونین و شاهد



شکل ۳ تأثیر ساپونین‌ها بر روی وضعیت باروری شته‌های زنده در تیمارهای مختلف غذایی و شاهد

زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا و

کارکنان محترم گلخانه‌ها ابراز می‌نمایم.

قدردانی

بدین وسیله مراتب سپاس خود را از زحمات همکاران

محترم، خصوصاً خانم مهندس رشیدی مسئول آزمایشگاه‌های

References:**منابع مورد استفاده:**

- Bagheri A, Mazahery-Laghab H. The study of biological effects of triterpenoids from sugar beet leaves on potato bacteria caused softrot, blackleg, scab and bacterial wilt in vitro. 16th Iranian plant medicine Congress. Article abstracts. Tabriz, Iran, 2004; Pp. 153. (In Persian, abstract in English)
- Behdad E. Major Pests field crops in Iran. Sepehr Publisher. Tehran. Iran. 1992; Pp. 618. (in Farsi)
- Bowyer P, Clarke BR, Lunness P, Daniels MJ, Osbourn AE. Host Range of a Plant Pathogenic Fungus Determined by a Saponin Detoxifying Enzyme. Science .1995; 267: 371-374.
- Cooke DA, Scott RK, (Editors). The sugar beet crop, Science into practice. Publishing of Agricultural Sciences. 1998. Translated by: (Members of Scientific Board in Sugar Beet Research Centre, Karaj, Iran. Pp.732.
- Febvay G, Delobel B, Rahbe Y. Influence of the Amino Acid Balance on the Improvement of an Artificial Diet for a biotype of *Acrythosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). Canadian Journal of Zoology. 1988; 66: 2449-2453.
- Feizi Z. Leaf and Colar silage in sugar beet. Extensional issue. Published by Jahade Keshavarzi of Esfehan Ostan. 2009; Pp.16.
- Fenwick GR, Price KR, Tsukamoto C, Okubo K. Saponins In Toxic Substances in Crop Plants (FelixD'Mello, J. P., Duffus C. M. and Duffus, J.H., eds.). 1999; 1285-327, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Jadidi T, Hejjam S, Kamali Gh, Fotuhi K, abdolahian Noghabi M. The effect of leaf deletion in different growth stages on the yield of root and the quality of sugar beet. Iranian Journal of Agronomic Sciences. 2011; 12: 252-264.
- Klun JA, Guthrie WD, Hallauer AR, Russell WA. Genetic natureof the concentration of 2, 4 dihydroxy-7-methoxy 2H-1, 4-benzoxazin-3(4H)-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of 11 maize inbreds. Crop Sci. 1970; 10: 87-90.
- Khanjani M. Field crop pests in Iran. Bu-Ali Sina University, 6th edition. Hamedan, Iran. 2012. Pp720.
- Kuzina V, Ekstrøm CT, Andersen SB, Nielsen JK, Olsen CE, Bak S. Identification of Defense Compounds in *Barbarea vulgaris* against the Herbivore *Phyllotreta nemorum* by an Ecometabolomic Approach. Plant Physiology 2009; 151: 1977-1990.
- Mazahery-Laghab H, Bagheri A. The study of extracted saponins from the seedlings of 4 cultivars of alfalfa and the effect of spotted alfalfa aphid feeding on these cultivars. Journal of biology in Iran. 2006; 11: 146- 156.
- Ridout CL, Price RK, Parkin G, Dijoux MG, Lavaud C. Saponins from sugar beet and the floc problem. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1994; 42: 279-282.
- VAN Der Plank JE. Plant diseases: epidemics and control. Academic Press,New York. 1968. 349 p.

- Tahriri Adabi S, Talebi AA, Fathipour Y. Comparison of Growth Population Parameters of *Aphidius matricariae* (Hym., Aphidiidae) on Host aphid, *Aphis fabae* Scopoli (Homoptera: Aphididae), on Four Varieties of Sugar beet in Laboratory Conditions. 2009
- Yoshikawa M, Murakami T, Kadoya M, Matsuda H, Muraoka OM, Yamahara J, Murakami N. medicinal foodstuff. III. Sugar beet. (1): Hypoglycemic Oleanolic acid Oligoglycosides, beta vulgarosides I, II, III, and IV, from the root of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae). Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1996; 44: 1212-1217.
- Yoshikawa M, Murakami T, Kadoya M, Yamahara J, Matsuda H. Medicinal foodstuffs. XV. Sugar beet. (2): Structures of beta vulgarosides V, VI, VII, VIII, IX, and X from the roots and leaves of sugar beet (*Beta vulgaris*) 1999; 47; 21: 1717-1724.
- Zhu S, Li Y, Yu B. Synthesis of Beta vulgaroside III, a representative triterpene seco-glycoside. JOC Article (The Journal of Organic chemistry). 2008; 73: 4978-4985.