DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jsb.2016.105779

بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات ساپونینی استخراجی از برگ چغندرقند (*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[1] و حجت‌اله مظاهری‌لقب[2]*

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

م. کاکایی و ح.ا. مظاهری لقب. ۱۳۹٤. بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات ساپونینی استخراجی از برگ چغندرقند (*Beta vulgaris* L.)، روی شته خالدار یونجه (*Therioaphis maculate* Buckten). **چغندرقند، ۳۱(۲): ۱۹۹- ۱۸۹**

چکیده

در آزمایش حاضر، نقش بیولوژیکی ساپونین‌های برگ چغندرقند 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 شته ها را در غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر ثابت کرد. برعکس، غلظت پایین ساپونین (۰/۱ 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. نتیجه‌کلی این‌که ترکیبات ساپونینی برگ چغندرقند واجد اثرات بیولوژیکی هستند. لذا، علاوه بر این که امکان استفاده از ساپونین برگ چغندرقند 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، چغندرقند، ساپونین برگ، شته خالدار یونجه، کروماتوگرافی لایه نازک

۱ - استادیار دانشگاه پیام‌نور، گروه مهندسی کشاورزی (اصلاح‌نباتات و ژنتیک)، تهران- ایران

۲ - دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا-همدان. . *نویسنده مسئول mazahery@yahoo.co.uk

مقدمه

چغندرقند (*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. وزن‌تر 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 چغندرقند در زراعت به عنوان یکی از اجزا بدون استفاده کشاورزی محسوب می‌گردد که هر ساله بعد از برداشت ریشه، در مزرعه چغندرقند 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 چغندرقند به صورت تازه و یا خشک، مشکلات تغذیه‌ای را در پی دارد، با این حال، برگ چغندرقند 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 چغندرقند 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 چغندرقند گزارش شده‌اند (Jadidi *et al.* 2011). تا کنون، اثرات بیولوژیکی ساپونین‌ها روی حلزون‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، حشرات، پروتوزوآها، سلول‌های غیرطبیعی کبد موش صحرایی، 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 چغندرقند 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 (Fenwick *et al.* 1991 و Bowyer *et al.* 1995). برخی از گیاهان زراعی واجد ساپونین مثل چغندرقند، جودوسر (*Avena sativa* L.) و حبوبات مصرف انسانی، برخی مثل یونجه (*Medicago sativa* L.) و گونه‌های لوپن (*Lupinus* sp.) مصرف حیوانی و برخی مثل *Panax* sp., *Gypsophila Yucca* sp., *Glycyrrhiza glabra* مصرف دارویی، عطری و بهداشتی دارند (Fenwick *et.al.* 1991). ارزیابی بیولوژیکی ترکیبات بیوشیمیایی موجود در تره تیزک‌های زمستانی. (*Lepidum 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 هدراژنین (Hederagenin cellobioside) و اولئانولیک اسید (Oleanolic acid) و دو ساپونین متفرقه دیگر بستگی دارد. وجود ساپونین‌های چغندرقند که مهم‌ترین آن‌ها با نام گلیکوساید اولئانولیک اسید خوانده می‌شود، بیش از ۱۰۰ سال است که توسط ریدوت و همکاران (Ridout *et al.* 1994) از ساختمان یکی از فراوان‌ترین ساپونین‌های چغندرقند توأم با یک ترکیب دیگر مونودسموسایدی سه‌قندی اولئانولیک اسید که قبلاً به عنوان ترکیبی غیرساپونینی گزارش شده بود، نیز گزارش دادند. این

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 چغندرقند به‌نام 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 چغندرقند به همراه بتاوولگاروسایدهای 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 رگ‌برگ نامیده می‌شود. بوته‌هائی که شدیداً به شته آلوده هستند طی یک تا دو هفته از بین می‌رود 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-ترپنوئیدی در برگ چغندرقند و بررسی نقش بیولوژیکی این ساپونین (ها) روی شته خالدار یونجه می‌باشد.

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 بوعلی‌سینا 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 چغندرقند

برگ‌های چیده شده چغندرقند 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 برگی) 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 g×۳۶۰۰ سانتریفوژ شد، دو لایه در داخل فلاسک مربوطه ایجاد شد. لایه متانول بالایی از لایه پایینی محتوی مواد جامد بافت برگی 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 نگه‌داری گردید.

خالص‌سازی ساپونین‌ها

۵۰ میلی‌لیتر ساپونین‌های خام به قیف جدا کننده ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. ۲۵ میلی‌لیتر 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. لایه‌های بوتانل با هم مخلوط و بوتانل آن در سیستم روتاری در حالت خلاء و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر و ساپونین‌های خالص باقی ماندند. ماده جامد ساپونین خالص کل با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰درصد 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 میلی‌لیتر آب مقطر حل و جهت استفاده در ارزیابی زیستی شته در یخچال نگه‌داری گردید.

کروماتوگرافی لایه نازک

این تکنیک با نمونه‌گذاری ۱۰ میکرولیتری برداشت شده از فاز بالایی ساپونین‌های استخراجی و خالص شده با بوتانول اشباع از آب و یا ۱۵ میکرولیتر از نمونه ساپونین‌های خام حل شده در متانول روی پلیت شیشه‌ای پوشیده شده با ژل سیلیکای از نوع 60F254 ساخت کمپانی مرک آلمان انجام شد. ابتدا نمونه‌های ساپونین‌دار مایع در لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری اپندروف به مدت دو الی سه دقیقه، در دور g×۳۶۰۰سانتریفوژ شدند. نمونه‌گذاری ساپونین‌ها با سمپلر صورت گرفت. نمونه‌ها با فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از یکدیگر در روی پلیت چکانیده شدند و سریعاً با یک مو خشک‌کن برقی خشک گردیدند تا از عمل پراکندگی زیاد آن‌ها جلوگیری شود. پلیت 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 پلیت‌ها خوب انجام شد.

بیان باندهای ساپونین روی پلیت TLC

پلیت TLC بعد از خشک شدن در زیر هود آزمایشگاه، با معرف اسیدی مرکب از متانول: استیک آن هیدریک: و اسید سولفوریک به نسبت ۱:۱:۱۰ اسپری گردید و در داخل آون در دمای ۱۰۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پلیت اسپری شده در زیر نور ماوراءبنفش با طول‌موج ۳۰۰ نانومتر در دستگاه ترانس لومیناتور مورد رؤیت واقع شد. به دلیل وجود خاصیت محو شدن سریع رنگ‌های مربوط به باندهای ساپونینی، فاصله نسبی برای هر باند ایجاد شده محاسبه گردید. ضمناً از TLCهای مناسبی که باند واضح‌تری داشتند، عکس تهیه گردید.

تغذیه آزمایشگاهی شته‌ها

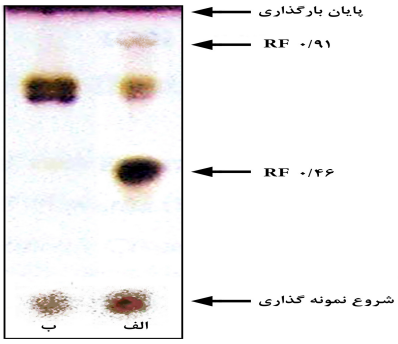
از پتری دیش‌های استریل با قطر دهانه ۲/۵ سانتی‌متر برای تغذیه حشرات استفاده گردید. جیره غذایی به صورت مایع و فرموله شده و بر اساس روش (Febvey *et. al.* 1988)، تهیه شد. ترکیبات تشکیل دهنده این جیره شامل ۱۰ نوع ویتامین، ۲۲ نوع اسیدآمینه، پنج نوع ترکیبات فلزدار، و ترکیبات دیگر محتوی سولفات و پتاس و هم‌چنین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

موجود در ته پتری دیش منتقل و مستقر شدند (واحد آزمایش). یک لایه پارافیلم بر روی دهانه پتری کشیده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غذای مصنوعی بوسیله سمپلر بر روی پارافیلم نمونه‌گذاری گردید. لایه دیگری از پارافیلم مجدداً روی پارافیلم اولی کشیده شد به‌طوری که غذای مصنوعی در بین دو لایه پارافیلم 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 بدون‌ساپونین 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 اطاقک رشد استریل و تنظیم شده در ۲۲/۵ درجه سلسیوس و نسبت روشنایی به تاریکی ۱۶ به هشت ساعت، نگه‌داری شدند. جیره غذایی بین پارافیلم‌ها یک روز در میان تعویض شد. زیست‌سنجی شته‌ها حدوداً دو هفته طول کشید، هر روز تعداد مرگ‌ومیر شته‌های در حال تغذیه و تعداد 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 t ی 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 شکل۱ آمده است.



شکل۱ کروماتوگرافی ساپونین‌های خام و خالص شده استخراجی از برگ چغندرقند
نوار الف- عصاره‌های خام ساپونین‌ها، نوار ب- مخلوط ساپونین‌های خالص شده با بوتانل

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

تری‌ترپنوئیدی در برگ چغندرقند مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه ترکیبات خام اولیه، لکه باندی با رنگ قهوه‌ای سوخته بسیار متراکم در Rf= ۰/۴۶ ایجاد کرد (شکل۱-الف). باند دیگری در بالاتر از باند قبلی و درRf= ۰/۷۴ لکه‌ای نسبتاً تاریک به رنگ زرد ایجاد شد. لکه سوم در این نوار، در Rf= ۰/۹۱ 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 Rf= ۰/۷۲ و Rf= ۰/۷۶ به‌ترتیب به رنگ‌های قرمز ارغوانی و سبز تیره دیده شد. این دو لکه باندی به‌عنوان دو ساپونین مهم موجود در برگ چغندرقند به نام‌های وولگاروسایدهای پنج و نه قبلاً مورد شناسایی واقع شده‌اند (Yoshikawa *et al.* 1996).

در ریشه و برگ چغندرقند نیز مواد متابولیکی ثانویه‌ای از نوع ساپونین‌ها وجود دارند که قابلیت دفاعی و دارویی را به این گیاه داده‌اند. گلیکوساید اولئانولیک اسید، مهم‌ترین ساپونین چغندرقند، بیش از ۱۰۰ سال است که گزارش شده است (Ridout *et al.* 1994). نامبردگان، ساختمان یکی از فراوان‌ترین ساپونین‌های چغندرقند توأم با یک ترکیب دیگر مونو دسموسایدی سه قندی اولئانولیک 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 تتراساکاریدی دیگری نیز از برگ‌ها استخراج و شناسایی گردیده است. وجود دو ترکیب ساپونینی بر اساس نتایج حاصل از کروماتوگرافی و پژوهش یوشیکاوا و همکاران (Yoshikawa *et al.* 1996) و 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

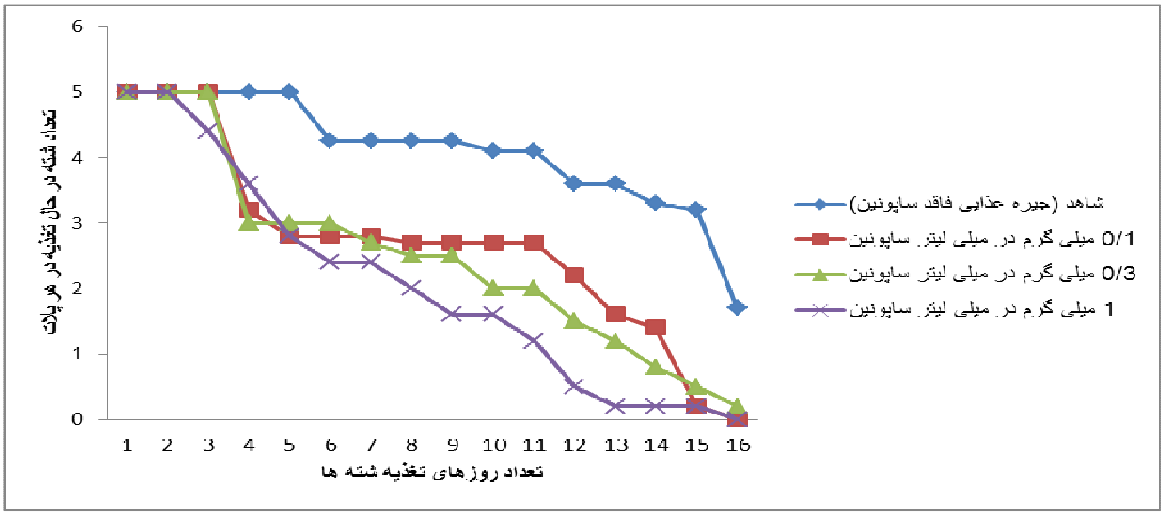
ارزیابی بیولوژیکی شته‌ها و تعیین نقش و فعالیت بیولوژیکی ساپونین‌های با غلظت‌های مختلف، در شکل‌های ۲ و ۳ که بیان‌گر نحوه تأثیر ساپونین‌ها بر روی بقا و زادوولد حشرات مورد مطالعه می‌باشند، به عمل آمد. هر سه غلظت ساپونین‌های برگ چغندرقند در ۶-۴ روز اول ارزیابی، اثراتی نسبتاً مشابه ولی متفاوت از شاهد روی تلفات و مرگ‌ومیر شته‌های تغذیه کننده در روی تیمارهای حاوی جیره غذایی داشتند (شکل۲). در این مدت، در تیمارهای با غلظت‌های متفاوت ساپونین، تعداد حشرات به ۶۰-۵۰درصد 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 شکل۳ پیداست،

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 چغندرقند 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 (شکل۲) بیان‌گر تأثیر و نقش بیولوژیکی این ترکیبات ساپونینی موجود در برگ چغندرقند 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 ۵درصد 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 چغندرقند در این غلظت‌ها دارای اثرات متوسط بر میزان زنده‌مانی شته‌های در حال تغذیه است. در واقع، شدت نقش بیولوژیکی و اثرات کشندگی ساپونین‌های برگ چغندرقند با افزایش غلظت می‌تواند افزایش یابد. در مطالعه حاضر، هر چند وجود، استخراج و شناسایی ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی ناشی از برگ‌های چغندرقند 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 چغندرقند نشدند. با این وجود، در سال ۱۳۸۳ در مرکز تحقیقات کشاورزی همدان آزمایشی مرتبط صورت گرفت که در نتیجه آن، اثرات بیولوژیکی ساپونین‌های برگ چغندرقند 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 عدم‌باروری 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 طوری‌که، در روز ۱۶، تولید پوره به وسیله غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳ و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به‌ترتیب حدود ۱۵، ۷۲ و ۹۴درصد نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد. با این حال، در ازای هر شته و در مقایسه با شاهد، کاهش‌تولید پوره،

جزء در حالت غلظت بالای ساپونین مشاهده شد. نتایج فوق نشان‌دهنده وجود نقش فعال بیولوژیکی ساپونین تریترپنوئید در برگ چغندرقند می‌باشند به‌طوری که، غلظت‌های دوم و سوم ساپونین‌های برگ چغندرقند 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 به‌عبارتی به‌عنوان عامل ایجاد کننده مقاومت از نوع آنتی‌بیوز عمل نماید، غلظت کم این ترکیبات کف کننده 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، علاوه‌بر 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، نبایستی 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 چغندرقند می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این ترکیبات واجد اثرات بیولوژکی (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 چغندرقند، 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 چغندرقند در شرایط آزمایشگاه نتیجه‌گیری نمودند که می‌توان اظهار نمود که ارقام مختلف چغندرقند 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 آلیل ایزوتیوسیانات، را مطالعه کردند که ایده ارزیابی بیوشیمیایی برای اولین بار توسط کلون و همکاران (Klun *et al.* 1970) بیان گردید.



شکل۲ وضعیت زنده‌مانی شته‌های تغذیه کننده از تیمارهای غذایی مصنوعی واجد ساپونین و شاهد

شکل۳ تأثیر ساپونین‌ها بر روی وضعیت باروری شته‌های زنده در تیمارهای مختلف غذایی و شاهد

قدردانی

بدین‌وسیله مراتب سپاس خود را از زحمات همکاران محترم، خصوصاً خانم مهندس رشیدی مسئول آزمایشگاه‌های زراعت و اصلاح‌نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا و کارکنان محترم گلخانه‌ها ابراز می‌نمایم.

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.