بررسی پروفــیل باندهای ساپونــین‌های برگ ۳ رقم یونــجه (*Medicago sativa* L.) با مقاومت‌های متفاوت نسبت به سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica* Gyll.) با به‌کارگیری TLC

The Study of Saponin Profile in 3 Cultivars of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Expressing Different Levels of Resistance to Alfalfa Weevil (*Hypera postica* Gyll.) Using TLC

سحر بختیاریان[۱] و حجت‌اله مظاهری لقب[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۶

چکیده

ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی یونجه متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که باعث تلخی گیاه، پایین آمدن خوش خوراکی، مقاوم شدن گیاه به حمله آفات و بسیاری از بیماری‌ها می‌شوند. ساپونین‌ها همانند گلیکوزیدها بخشی از گروه استروئید را تشکیل می‌دهند. در این پژوهش، تنوع ساپونین در ارقام مختلفی از گیاه یونجه که مقاومت‌های متفاوتی در ژرم‌پلاسم مزرعه نسبت به سرخرطومی برگ یونجه نشان داده بودند، از طریق کروماتوگرافی لایه نازک بررسی و مورد آنالیز واقع شد. ساپونین های برگی ارقام تبریز ۸ به‌عنوان رقم مقاوم، دیوپوی به‌عنوان رقم حساس و کالیورد ۳۲۱۵۸۸ به‌عنوان رقم نیمه‌مقاوم در مرحله آغاز غنچه‌دهی با حلال متانولی مورد عمل استخراج قرار گرفتند. آنالیز ساپونین‌ها روی پلیت‌های کروماتوگرافی نشان داد که در الگوهای نواری، تفاوت‌های کیفی وجود دارد. تعداد باند ساپونینی در رقم مقاوم به سرخرطومی برگ یونجه (تبریز۸) ۱۱باند، رقم کالیورد ۳۲۱۵۸۸ (نیمه مقاوم به آفت) ۸ باند و رقم دیوپوی(حساس به آفت) ۶ باند مشاهده گردید. از این پژوهش چنان نتیجه می‌شود که هر چه تعداد باندهای موجود ساپونینی ایجاد شده در ابتدای ژل بیشتر باشد، آن رقم نسبت به آفت مقاوم‌تر است.

واژه‌های کلیدی: مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه، ارقام یونجه، تنوع ساپونین‌ها، کروماتوگرافی لایه نازک

---

۱ و ۲. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

*: نویسنده مسوول Email: Hojat.mazahery@yahoo.co.uk

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد که در دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام شده است.

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L., 2n=4x=32) گیاه چندساله، یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای از خانواده لگومینه، به‌عنوان یک منبع غذایی با کیفیت تغذیه‌ای و عملکرد علوفه‌ای بالا می‌باشد. تحمل آن به تنش‌های محیطی و تثبیت ازت بسیار حائز اهمیت است. با توجه به دگرگشنی و تتراپلوئیدی بودن این گیاه، انتظار می‌رود که تنوع ژنتیکی زیادی در داخل جمعیت-های یونجه وجود داشته باشد *آباسوار* و *باکری* (Abusuwar and Bakri, 2009). یونجه سالانه بیش از ۲تن در هکتار علوفه تولید می‌نماید. به علت نقش زیاد علوفه در تغذیه‌ی غیرمستقیم انسان‌ها، تحقیقات در زمینه‌های مختلف اصلاحی یونجه گسترش فوق العاده‌ای داشته است *عبدمیشانی* و *شاه‌نجات بوشهری* (Abd-Mishani and Shah Nejat Bushehri, 1992). شناخت و استفاده از توانایی دفاعی گیاهان در مقابل تنش‌های زیستی از اهمیت خاصی برخوردار است. وجود پروتئین، مواد معدنی، حداقل ۱۰ نوع ویتامین، بخصوص ویتامین A و ویتامین C، کلسیم، درصد خیلی کم سلولز و دارا بودن سایر مواد متابولیکی ثانویه در یونجه، برتری خاصی را به آن بخشیده و وجود این ترکیبات عاملی برای حفاظت آن در مقابل بعضی حشرات و میکروب‌ها محسوب می‌شود (کریمی، ۱۳۶۹). مواد متابولیکی ثانویه شامل موادی هستند که روی حشرات گیاهخوار عمل می‌کنند. این مواد شامل فنول‌ها، هیدروکسامیک اسیدها، ایندول آلکالوئیدها، گلیکوزینولات‌ها، کاینوژنیک گلیکوسایدها و مواد مومی که عامل مقاومت طبیعی در مقابل بعضی گونه‌های حشرات می‌باشند *آگراندو* و همکاران؛ *لیزسکی* و همکاران؛ *کیپلا* و *چارزانوسکی*؛ *اسمیت* و همکاران؛ *اوربانسکا* و همکاران؛ *ووجسیکا* و همکاران (Argandona *et al.*, 1983; Leszczynski *et al.*, 1989; Ciepiela and Chrzanowski, 1999; Leszczynski *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Urbanska *et al.*, 2004; Wojcicka *et al.*, 2004).

در بین متابولیت‌های ثانوی تولید شده توسط گیاهان، ساپونین‌ها یکی از ترکیبات شیمیایی مهم هستند که تاکنون گزارش‌های متعددی در مورد استخراج آن‌ها از گونه‌های مختلف و اثراتشان منتشر شده است. از اثرات زیستی متنوع ساپونین‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: مسکن، ضدحساسیت، ضدترشح، ضدالتهاب، محرک سیستم ایمنی، ضدقارچ و باکتری، ضدپروتوزوآ، انگل و ویروس. ساپونین‌ها همچنین دارای خاصیت نرم‌تن‌کشی و دارای اثرات آنتی-اکسیدانی، ضدبیماری‌های پوستی، ضدتب، ضدانقباض عضلانی، جلوگیری از انعقاد خون، بهبوددهنده زخم، مهارکننده شیمیایی، ضدجهش‌زایی، ضدسرطان، مدر، ضدسرفه، افزایش‌دهنده نفوذپذیری سلول‌های موکوسی روده و جذب مواد معدنی و ویتامین‌ها، افزاینده جذب مواد فعال دارویی، مهار انتقال فعال مواد غذایی، کاهش جذب چربی و کلسترول، کاهنده غلظت آمونیاک و تسریع تخمیر در معده نشخوارکنندگان، مؤثر در رشد و تولیدمثل جانوران، محافظت از کبد و سیستم عصبی در برابر فراموشی القاء شده با الکل و بیش فعالی القا شده با مورفین و نیکوتین می‌باشند *گلکا* و *مازا* (Guclu and Mazza, 2007). ساپونین‌ها از جمله ترکیبات ثانویه طبیعی هستند که در گیاهان خصوصاً لگوم‌ها و مقدار کمی در حیوانات آبزی مثل ستاره دریایی و خیار دریایی یافت می‌شوند. ساپونین‌ها از جمله ترکیبات ثانویه طبیعی هستند که در گیاهان خصوصاً لگوم‌ها و مقدار کمی در حیوانات آبزی مثل ستاره دریایی و خیار دریایی یافت می‌شوند. مقدار آن‌ها در یک گونه گیاهی نیز متفاوت است *بویر* و همکاران؛ *فنویک* و همکاران (Bowyer *et al.*, 1995; Fenwick *et al.*, 1991). ساپونین‌ها، گلیکوسایدهای تری‌ترپنوئیدی متشکل از یک آگلی‌کن ۳۰ کربنه با یک یا چند شاخه قندی می‌باشند *کلیتا* و همکاران؛ *الزاک* (Klita *et al.*, 1996; Olszek, 1988). در یونجه بیش از ۳۳ نوع ساپونین با اثرات بیولوژیکی متفاوت شناخته شده است *گستتنر* و همکاران؛ *هاهمن* و همکاران؛ *پلاه* و همکاران؛ *سینگ* (Gestetner *et al.*, 1970; Huhman *et al.*, 2002; Pelah *et al.*, 2002; Singh, 1986). ساپونین‌ها در بعضی ژنوتیپ‌های یونجه عامل مقاومتی در مقابل آفات گیاه‌خوار معرفی شد *هاربر* (Horber, 1972). *پدرسون* و همکاران (Pederson *et al.*, 1976) در سال ۱۹۷۶ بیان داشتند مقدار بالای ساپونین‌ها در بعضی کولتیوارهای یونجه به مقدار مقاومت گیاه در مقابل شته سبز نخود و دیگر آفات گیاهخوار بستگی دارد. ساپونین‌های یونجه شامل گروه سویا ساپوژنین A-F و آگلی‌کن‌ها مثل مدیکاژنیک اسید، هیدراژنین و لوسرنیک اسید هستند *شای* و همکاران (Shay *et al.*, 1972). *اولسزک* و همکاران (1992) زنهیک اسید تریدسموساید (Zanhic acid tridesmoside) را به‌عنوان سنگین‌ترین گروه معرفی کردند. در طبیعت مقدار بالای ساپونین‌ها در یونجه مربوط به زنهیک اسید گلیکوساید و در بعضی واریته‌ها به‌عنوان ساپونین‌های اصلی می‌باشند. بیشترین قطبیت مربوط به مدیکاژنیک اسید (شامل دو گروه کربوکسیلیک اسید) که نتیجه‌ی آن در عملکرد بالای بیولوژیکی و ضد تغذیه‌ای می‌گردد. ساپونین‌های خام شامل ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی و استروئیدی، تانن‌ها و فلاونوئیدها می‌باشند *اسپرگ* و همکاران؛ *وانگ* و همکاران؛ *گپیدزیمن* و همکاران (Sparg *et al.*, 2004; Wang *et al.*,

2008; Gepdiremen *et al.*, 2004). هدف آزمایش بررسی وضعیت تنوع ساپونین‌ها در ارقام مختلف یونجه بود. *گلوواسکا* و همکاران (2012) طی تحقیقی عنوان داشتند ساپونین‌های استخراجی از بافت گیاه یونجه، توسط TLC از هم مجزا گردیدند. روش کروماتوگرافی لایه نازک برای ساپونین‌های خام استخراجی جهت تایید ساپونین‌های حاضر در محلول استفاده می‌شود *واگنر* و همکاران (Wagner *et al.*, 1996).

مواد و روش‌ها

ارقام گیاهی

سه رقم یونجه، رقم تبریز ۸، رقم دیوپوی و رقم کالیورد ۳۲۱۵۸۸ که حاصل یک‌سری آزمایشات مزرعه‌ای بر اساس مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه تعیین شده بود، استفاده گردید. نمونه‌های گیاهی از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان واقع در منطقه‌ی دستجرد، با طول جغرافیایی °۴۸ و ´۲۸ و عرض‌جغرافیایی °۳۴ و ´۵۴ با ارتفاع ۱۸۱۰ متر از سطح دریا، از سال زراعی ۹۰-۹۱ به‌دست آمد. مرحله فنولوژیکی گیاهان آغاز غنچه‌دهی و از قسمت هوایی برداشت، در داخل ازت مایع منجمد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

عصاره‌گیری ساپونین

نیم گرم از بافت قسمت‌های هوایی جدا شده با استفاده از ازت مایع مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. محلول حاصل با یک فیلتر در هاون چینی پودر و بافت پودر شده را با متانول ۷۰٪ داخل ارلن به شیشه‌ای در خلاء صاف گردید. الکل موجود به‌وسیله دستگاه تبخیرکننده چرخشی (روتاری) در خلاء و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید. مواد جامد باقی مانده ته فلاسک با متانول ۸۰٪ شسته شد و سپس الکل به‌وسیله‌ی دستگاه طبق دستور بالا تبخیر گردید. مواد جامد حاصل از روتاری دوم با آب مقطر شسته و حل گردید. محلول غلیظ حاصل به لوله اپندروف منتقل و تا زمان انجام کروماتوگرافی لایه نازک در فریزر نگهداری شد (*گلواسکا* و همکاران، 2012).

آنالیز کیفی ساپونین‌ها از طریق کروماتوگرافی لایه نازک

در بسیاری از تحقیقات، برای آنالیز کمی وکیفی ساپونین‌ها از رنگ سنجی کروماتوگرافی لایه نازک (TLC= Thin Layer Chromatography) استفاده می‌شود. محلول استحصالی ساپونین خام از بافت برگی بود. برای کروماتوگرافی لایه نازک ساپونین از پلیت‌های سیلیکاژل ۶۰ (Kieselgel 60 f25 Merck) استفاده شد *السزک* و همکاران (Olszek *et al.*, 1992). مقدار ۷ میکرولیتر از محلول استخراجی را بر روی پلیت نمونه‌گذاری شد. پلیت‌های آماده شده در داخل تانک TLC حاوی حلال مخصوص آنالیز ساپونینی گذاشته شد تا عمل حرکت ترکیبات مختلف بر روی پلیت‌ها انجام شود. این حلال ترکیبی از بوتانول: آب مقطر: اسید استیک به‌ترتیب به نسبت ۸۴: ۱۴: ۷ بود. بعد از حرکت حلال به طرف بالا و پخش شدن مایع در روی پلیت مزبور از داخل تانک خارج و در زیر هود خشک و سپس با معرف متانول: انیدریداستیک: اسیدسولفوریک به نسبت ۱۰: ۱: ۱ اسپری گردید و در داخل آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد *شارما* و همکاران (Sharma *et al.*, 2012). لکه‌های باندی روی پلیت اسپری شده در زیر نور ماوراء بنفش (UV) با طول موج‌های ۲۵۴ و ۳۶۶ نانومتر ناشی از دستگاه ترانس لومیناتور رؤیت شد. محاسبه Rf برای هر باند ایجاد شده به‌صورت زیر، انجام گرفت.

$$Rf = \frac{\text{ارتفاع محل لکه‌گذاری تا باند ایجاد شده}}{\text{ارتفاع محل لکه‌گذاری تا انتهای حرکت حلال روی پلیت}}$$

نتایج و بحث

میزان مقاومت در ارقام مورد مطالعه در آزمایشات مزرعه‌ای تعیین شده بودند (نتایج در این مقاله نیامده است). براساس میزان خسارت وارده، تعداد لارو آلوده‌کننده بر روی ارقام متفاوت، درصد کلروفیل (به‌وسیله‌ی دستگاه اسپدمتر به‌دست آمد)، ارتفاع زمان خسارت، میزان علوفه‌تر، میزان علوفه‌خشک، درصد ماده خشک و ارتفاع زمان برداشت نتیجه به‌دست آمد که رقم تبریز ۸ مقاوم به سرخرطومی برگ یونجه، رقم کالیورد ۳۲۱۵۸۸ نیمه‌مقاوم و رقم دیوپوی حساس به آفت ذکر شده بودند. با کروماتوگرافی لایه نازک ترکیبات خام ساپونین‌های استخراجی از گیاهان یونجه الگوهای متفاوت باندی روی سیلیکاژل ظاهر کردند. باندهای ساپونین خام حاصل از رقم تبریز ۸ تعداد باند بیشتری نسبت به دیوپوی داشتند. رقم کالیورد ۳۲۱۵۸۸ تعداد محدودتری باند نسبت به دیگر ارقام دارا بود. باندهای ایجاد شده در ژل دارای رنگ‌های مختلفی بود. یکی از مشکلات بررسی حالت پرش و محو شدن سریع باندها بعد از حرارت در آون بود. این مشکل می‌تواند به کیفیت مواد شیمیایی مورد استفاده نیز مربوط باشد. به هر حال، علامت‌گذاری روی پلیت‌های TLC این امکان را میسر ساخت تا اندازه‌گیری Rf برای باندهای مختلف فراهم شود. پدیده محو و نامرئی شدن باندها با تعویض و جابجایی بعضی مواد شیمیایی بر طرف نشد. در آزمایشات قبلی توسط نویسنده اهر ۳ به‌عنوان

رقم مقاوم و افغانی رقم حساس به سرخرطومی شناخته شد. از لحاظ تعداد باند و رنگ باندها در این آزمایش تفاوت نشان دادند. شکل ۱، رقم تبریز ۸ (مقاوم به سرخرطومی) شکل ۲، رقم کالیورد ۳۲۱۵۸۸ (نیمه‌مقاوم به سرخرطومی) در شکل ۳، رقم دیوپوی (حساس به سرخرطومی) نمایش داده شده است. مقدار Rf و رنگ باندها در جدول ۱ قابل مشاهده است. طبق تحقیقات انجام شده توسط *گلوواسکا* و همکاران (2006) نزدیک‌ترین ساپونین به محل نمونه‌گذاری زنهیک اسید، در وسط مدیکاژنیک اسید و در انتهاترین محل حرکت سویا ساپونین می‌باشد. این نظر بر اساس میزان وزن مولکولی این ساپونین‌های اصلی داده شده است.

جدول۱: اندازه‌های RF برای الگوهای باندی ساپونین‌های خام قسمت هوایی سه رقم یونجه‌های مورد مطالعه

Table 1: RF measure for crude saponins banding pattern three alfalfa cultivar under study

شماره Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rf رقم تبریز ۸ Rf Tabriz 8	0.189	0.234	0.270	0.324	0.378	0.459	0.486	0.703	0.729	0.784	0.945
رنگ فلورسنتی رقم تبریز ۸ Fluorescent Tabriz 8	بنفش کم‌رنگ Light purpule	سبز-فسفری Green yellow	سبز-فسفری Green yellow	قهوه‌ای Brown	بنفش پررنگ Dark purple	سبزفسفری پررنگ Dark Green yellow	قهوه‌ای کم‌رنگ Light brown	خاکستری Gray	قهوه‌ای Brown	سبزفسفری کم‌رنگ Light Green yellow	بنفش Purple
Rf رقم کالیورد ۳۲۱۵۸۸ Rf Caliverd321588	0.162	0.218	0.486	0.531	0.592	0.718	0.906	0.945	–	–	–
رنگ فلورسنتی رقم کالیورد ۳۲۱۵۸۸ Fluorescent Caliverd 321588	سبز-فسفری Green yellow	قهوه‌ای Brown	بنفش پررنگ Dark purple	سبز-فسفری Green yellow	بنفش Purple	خاکستری Gray	قهوه‌ای کم‌رنگ Light brown	سبزفسفری کم‌رنگ Green yellow	–	–	–
Rf رقم دیوپوی Rf Deiopoy	0.269	0.370	0.442	0.556	0.740	0.925	–	–	–	–	–
رنگ فلوئورسنتی رقم دیوپوی Fluorescent Deiopoy	بنفش Purple	قهوه‌ای کم‌رنگ Light brown	سبز فسفری Green yellow	بنفش کم-رنگ Light purpule	سبز-فسفری Green yellow	قهوه‌ای کم-رنگ Light brown	–	–	–	–	–

Rf=فاصله حرکت ترکیبات منحصر به فرد ساپونینی از نقطه شروع نمونه‌گذاری تا نقطه باند تشکیل شده به کل فاصله حرکت حلال در روی پلیت TLC

RF= Distance of starting point mark of saponin to the bond formed per the total distance of the solution on the TLC plate

شکل ۱: تبریز ۸

Fig. 1: Tabriz 8

شکل ۲: رقم کالیورد ۳۲۱۵۸۸

Fig. 2: Caliverd321588

شکل ۳: رقم دیوپوی

Fig. 3: Deiopoy

کولتیوارهای مختلف یونجه از لحاظ تولید ساپونین‌ها متنوع هستند *تاوا؛ تاوا و اودواردی* (Tava *et al.*, 1999; Tava and Odoardi, 1996). آشکارسازی ساپونین‌ها در سه گروه در گونه-های *مدیکاگو*[۳]، زنهیک اسید، مدیکاژنیک اسید و سویا ساپوژنین گلیکوساید انجام می‌شود *ناواکا و السزک*؛ *کاپوستا* و همکاران (Nowacka and Oleszek, 1994; Kapusta *et al.*, 2005a, b). ابراهیم‌زاده و نیک نام در سال ۱۳۷۴ عنوان داشتند با به‌کارگیری TLC برای ساپونین‌ها و ساپوژنین‌های استخراج شده از بافت گیاه شنبلیله، ظهور رنگ‌های متفاوت در باندها را گزارش کردند. ضمن اینکه از شاخص RF برای بررسی ساپونین‌های متنوع نیز استفاده شده است. در نتیجه آن‌ها تفاوت در نوع ساپونین‌های گیاه شنبلیله را گزارش کردند. مسلماً تفاوت‌هایی که در باندهای ساپونینی وجود دارد، می‌تواند از وجود تفاوت در بخش "آگلی‌کن" و همچنین از الیگوساکاریدهای متصل به آن‌ها ناشی شود (مظاهری‌لقب و باقری، ۱۳۸۵). ساپونین‌ها در گروه‌های متفاوتی قرار می‌گیرند. علت این تفاوت، تنوع در مقدار ساپوژنین، مقدار قندها، پیوستگی و جابه‌جایی گروه‌های قندی می‌باشد *هاستمن* و *مارستون* (Hostettmann and Marston, 1995). *السزک و بیلی* (Oleszek and Bialy, 2006) بیان داشتند انتخاب حلال مناسب برای TLC بستگی به مقدار مواد پیچیده دارد و یک سیستم از حلال را برای مواد ساپونینی عنوان کردند. تفاوت ساپونین‌ها بستگی به ساختار قندها و آگلی‌کن‌ها دارد *چاوالک* و همکاران؛ *وانگ* و همکاران، 2007 (Chwalek *et al.*, 2004). نتیجه‌گیری این آزمایش نشان داد رقم تبریز ۸ بیشترین و رقم دیوپوی کمترین تعداد باند ساپونین را داشتند. دیگر ژنوتیپ تقریباً حد وسط دو ژنوتیپ قبل بود. تعداد ساپونین‌ها رابطه مستقیم با حمله آفت به گیاه دارد. تعدادی ساپونین بعد از حمله آفت و القا شدن تنش به گیاه تولید می‌شوند. چون ساپونین‌ها عامل مقاومتی در برابر تغذیه آفات از گیاه عمل می-کنند.

محققینی هم چون *آگرل* و همکاران؛ *آسبورن*؛ *نوزولیلا* و همکاران؛ *السزک* و همکاران (Agrell *et al.*, 2004; Osbourn, 2003; Nozzolillo *et al.*, 1997; Oleszek *et al.*, 1990) چنین نتیجه گرفتند. براساس نتایج به‌دست آمده از آزمایشات مزرعه‌ای قبلی مبنی بر مقاومت ژنوتیپ‌ها به سرخرطومی برگ یونجه و مشاهده تعداد باند ساپونین در این آزمایش می‌توان این طور عنوان کرد که هر ژنوتیپی که تعداد ساپونین بیشتری داشته باشد به آفت مقاوم‌تر است. این نتیجه‌گیری توسط محققان *آدل* و همکاران؛ *آگراوال* و همکاران؛ *گلاوسکا* و همکاران؛ *آگرل* و همکاران، 2003 (Adel *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 1991; Golawska *et al.*, 2012; نیز چنین به‌دست آمده است. *گلوواسکا* و همکاران در سال (2006) عنوان داشتند که تعداد ساپونین‌های که کمترین قطبیت را دارند مثل زنهیک اسید تریدسموساید باعث مقاومت در یونجه را ایجاد می‌کنند.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۷-۵ متن انگلیسی مراجعه شود.