جمهوری اسلامی ایران
وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

فصلنامهٔ پژوهشی
تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

شماره پیاپی ۳۰ **جلد ۲۱ شمارهٔ ٤ سال ۱۳۸٤**

فهرست مطالب

بررسی برخی خصوصیات رویشگاهی گونه دارویی *Gontscharovia popovii* ٤٢٥
محمدامین سلطانی پور و رحمان اسدپور

اندازه‌گیری تانن در چهار ژنوتیپ بلوط *Quercus infectoria Olive.* و مصرف ٤٣٣
عباس صیامی، رضا حیدری، رسول پاکباز و محمد آقازاده

بررسی و تعیین ترکیبهای شیمیایی اسانس برگ *Eucalyptus stricklandii* Maiden و ٤٤٣
کامکار جایمند، محمد حسن عصاره، محمد باقر رضایی و محمد مهدی برازنده

بررسی ترکیبهای شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس گیاهان *Nepeta fissa* و ٤٥٣
فاطمه علیشاهی نورانی، فاطمه سفیدکن، مرتضی یوسف زادی، سمیه نعمتی و مریم خواجه پیری

اثر تاریخ کاشت بر عملکردهای کمی و کیفی گیاه *Foeniculum vulgare* ٤٦٥
رضا امیدبیگی، کریم صدرایی منجیلی و فاطمه سفید کن

شناسایی و بررسی ترکیبهای شیمیایی اسانس گیاه *Lepidium sativum* L. ٤٨١
مهدی میرزا و مهردخت نجف پور نوایی

همزیستی میکوریز وزیکولار آربوسکولار در گیاهان دارویی پارک ملی تندوره ٤٨٩
صدیقه اسماعیل زاده، دکتر حسن زارع مایوان و دکتر فائزه قناتی

اثرات حفاظتی فلاونوئیدها در مقابل همولیز گلبولی ناشی از رادیکال‌های آزاد ٥٠٥
صدیقه عسگری، غلامعلی نادری و نازیلا عسکری

تعیین مناسبترین مدت سرمادهی و عمق کاشت بذر وشا *Dorema*... ..... ٥١٧
بهناز علیجان پور ، پرویز باباخانلو، فرهاد آژیر و رضا حبیبی

اثرتنش آبی ناشی از پلی‌اتیلن گلایکول بر خصوصیات جوانه‌زنی بذر گیاه ریحان... .. ٥٣٥
عباس حسنی

اثر ضد قارچی عصاره هیدرو الکلی گیاه *Echinophora Platyloba* DC. بر کاندیدا... ..... ٥٤٥
مجید آویژگان، مسعود حفیظی و مهدی سعادت

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر میزان برخی از متابولیت‌های ثانویه ٥٥٣
رمضانعلی خاوری نژاد و اکرم اسدی

ISSN: 1735-0905

بسم‌الله الرحمن الرحیم

فصلنامهٔ پژوهشی **تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران**

- صاحب امتیاز: مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع
- مدیر مسئول: عادل جلیلی (دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع)
- سردبیر: فاطمه سفیدکن (دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع)

- هیأت تحریریه (به ترتیب حروف الفبا)

پرویز اولیاء
دانشیار، دانشگاه شاهد

پرویز باباخانلو
استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

کامکار جایمند
استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

نادر حسن‌زاده
دانشیار، مرکز علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی

محمدجواد رسایی
استاد، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

ایرج رسولی
دانشیار، دانشگاه شاهد

محمدباقر رضایی
دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

فاطمه سفیدکن
دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

محمدرضا شمس اردکانی
دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

پیمان صالحی
استاد پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی

عباس صیامی
استادیار، دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه

ابوالقاسم متین
استاد، سازمان تحقیقات و آموزش وزارت جهاد کشاورزی

فریبرز معطر
استاد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان

مه‌لقا قربانلی
استاد، دانشگاه تربیت معلم

محبت علی نادری شهاب
دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

غلامرضا نبی
دانشیار، دانشکده محیط زیست دانشگاه تهران

مدیر اجرایی و داخلی: کامکار جایمند استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع
دبیر کمیته انتشارات مؤسسه: شاهرخ کریمی
شمارگان: ۱۰۰۰ جلد
ویراستار ادبی: هوشنگ فرخجسته
صفحه‌آرا: فاطمه عباسپور
ناظر فنی: شاهرخ کریمی
چاپ: معاصر

هیأت تحریریه، در رد، مختصر کردن و ویرایش مقالات مجاز است. همچنین مقالات ارسالی عودت داده نمی‌شود.

*** نقل مطالب و تصاویر نشریه با ذکر ماخذ بلامانع است.**

نحوهٔ اشتراک: تکمیل فرم اشتراک و ارسال آن به آدرس فصلنامه از طریق پست.

نشانی: تهران، کیلومتر ۵ آزاد راه تهران – کرج، خروجی پیکان‌شهر، انتهای ۲۰ متری دوم، بلوار مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، **فصلنامهٔ پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران**
صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵، تلفن:۵-۴۴۱۹۵۹۰۱ نمابر: ۴۴۱۹۵۹۰۷
پست الکترونیکی: ijmapr@rifr-ac.ir

بهاء: ۱۸۰۰۰ ریال

خلاصه انگلیسی مقاله‌های این مجله در سایت اینترنتی CABI Publishing به آدرس زیر قرار گرفته است:

www. Cabi - Publishing. org

بسمه تعالی

راهنمای نگارش مقاله

رعایت دستورالعمل زیر در نگارش مقاله‌های ارسالی ضروری است.

– مقاله‌های اصیل (Original) پژوهشی در یکی از زمینه‌های تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران که برای نخستین بار منتشر می‌شود جهت چاپ در مجله مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

– عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، سمت و آدرس کامل نویسنده (گان) در یک صفحهٔ جداگانه درج گردد.

– مقاله در کاغذ A٤ تحت نرم‌افزار WORD، فونت لوتوس، سایز۱۲، با حاشیهٔ ۳ سانتیمتر از چهار طرف تایپ و در ۳ نسخه همراه با دیسکت یا از طریق پست الکترونیک ارسال شود.

– فاصلهٔ بین خطوط دو برابر در نظر گرفته شود.

– تا حد امکان از بکاربردن کلمات و اصطلاحات خارجی خودداری و در صورت نیاز با قید شماره به‌صورت پاورقی ارائه شود.

– جداول و اشکال باید دارای عنوان گویا بوده و هرگز به‌صورت دیگری در مقاله تکرار نشوند. ذکر منبع، واحد و مقیاس برای آنها ضروری است، عنوان جداول در بالا و عنوان اشکال در پایین ارائه می‌شوند. جداول و اشکال در صفحات مستقل و در انتهای مقاله ارائه شوند.

– نامهای علمی لاتینی به‌صورت ایتالیک تایپ شوند.

روش تدوین

– **عنوان مقاله:** باید مختصر، گویا و بیانگر محتوی مقاله باشد.

– **چکیده**: مجموعهٔ فشرده‌ای (حداکثر ۲۵۰ کلمه) از مقاله شامل تشریح مسئله، روش کار و نتایج بدست آمده است. از بکاربردن نامهای خلاصه شده و ارائه منبع، جدول و شکل در چکیده پرهیز شود.

– **واژه‌های کلیدی:** حداکثر ٦ واژه درباره موضوع مقاله ارائه شود.

– **مقدمه:** شرحی بر موضوع مورد بررسی شامل اهمیت، فرضیه، هدف و پیشینه تحقیق است.

– **مواد و روشها:** شامل مواد و وسایل بکاررفته، مشخصات منطقهٔ مورد مطالعه، شیوه اجرای پژوهش، طرح آماری، روشهای شناسایی و تجزیه داده‌هاست.

– **نتایج:** در این بخش تمامی یافته‌های کمی و کیفی با استفاده از جدول و شکل ارائه می‌گردند. از بحث و مقایسه با یافته‌های سایر تحقیقات اکیداً خودداری شود.

– **بحث:** شامل تحلیل و تفسیر یافته‌ها و مقایسه با نتایج سایر تحقیقات است. نقصها و پیشنهادها می‌توانند در صورت نیاز در این بخش ارائه شوند.

– **سپاسگزاری:** در صورت نیاز از کلیهٔ افراد و سازمانهای حمایت کنندهٔ تحقیق، تشکر گردد.

– **منابع مورد استفاده:**

فقط منابع استفاده شده در متن قید شوند. ابتدا منابع فارسی و سپس منابع خارجی ارائه شوند.

منابع به‌ترتیب حروف الفبای نام خانوادگی نویسنده مرتب و به‌صورت پیوسته شماره‌گذاری شوند.

- ارائه منبع در متن تنها با ذکر نام خانوادگی نویسنده و سال انتشار منبع صورت می‌گیرد. در منابع با بیشتر از دو نویسنده، نام نویسنده اول و کلمه ((همکاران)) یا ((et al.)) نوشته شود.

در صورتی که مقاله‌های منفرد و مشترک از یک نگارنده ارائه شوند، ابتدا مقاله‌های منفرد و سپس مقاله‌های مشترک به‌ترتیب حروف الفبای نام سایر نویسندگان مرتب شوند.

چنانچه نویسنده (گان) چند مقاله مشابه باشند، منابع برحسب سال انتشار از قدیم به جدید تنظیم شوند.

- از ذکر واژه‌های ((و همکاران)) یا ((et al.)) در فهرست منابع خودداری شود.

روش ارایهٔ منبع

۱- مقاله: نام خانوادگی، حرف اول نام نویسنده اول.، ... و نام خانوادگی، حرف اول نام نویسنده آخر.، سال انتشار. عنوان مقاله. نام کامل مجله، شمارهٔ جلد (شماره سری): شمارهٔ صفحات اول و آخر

مثال: سلاجقه، ع.، جعفری، م. و سرمدیان، ف.، ۱۳۸۱. مطالعه خاکشناسی منطقهٔ طالقان با روش ژئومرفولوژی. مجلهٔ منابع طبیعی ایران، ۵۵(۲): ۱۴۳ – ۱۲۳.

Wayne, P.M., Waering, P. and Bazzaz, F.A., 1993. Birch seedling responses to daily time courses of light in enyperimental forest gaps and shadehouses. *Journal of Ecology*, 74(5): 1500 – 1515.

۲- کتاب: نام خانوادگی، حرف اول نام.، ... نام خانوادگی، حرف اول نام نویسنده آخر.، سال انتشار. عنوان کامل کتاب. ناشر، محل انتشار، تعداد کامل صفحات.

مثال: طبایی عقدایی، س.ر. و جعفری مفیدآبادی، ع.، ۱۳۷۹. مقدمه‌ای بر اصلاح درختان جنگلی. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، ۱۴۹ صفحه.

Jalili, A. and Jamzad, Z., 1999. Red Data Book of Iran. A Preliminary Survey of Endemic, Rare and Enudaugered Plants species in Iran. *Researech Institute of Forests and Rangelands (RIFR) Publication*, Tehran, 750 p.

۳- کتاب یا مجموعه مقاله‌ای که هر فصل یا مقاله آن توسط یک یا چند نویسنده نوشته شده باشد: ارائه نام نویسنده (گان) فصل یا مقاله مطابق دستورالعمل بند ۲ (کتاب)، سال. عنوان فصل یا مقاله، صفحات اول و آخر. در (*In*): نام خانوادگی، حرف اول نام مؤلف اصلی کتاب.، (*eds.* یا *ed.*). عنوان کتاب. ناشر، محل انتشار، تعداد کامل صفحات.

مثال:

Agestam, E., 1995. Natural regeneration of beech in Sweden – Some results from a field trial. 117 – 124. In: Madsen. F., (ed.). Genetics and Silviculture of Beech. *Forskingscentret for Skov & Landskab.* 272 p.

خلاصه انگلیسی (*Abstract*): می‌تواند معادل چکیده فارسی و یا بیشتر از آن و شامل عنوان مقاله، نام خانوادگی، حرف اول نام، سمت و آدرس نویسنده (گان) و واژه‌های کلیدی حداکثر ٦ کلمه (*Key words*) بوده و در یک صفحهٔ جداگانه ارائه شود.

* جزئیات کاملتر روش نگارش در سایت اینترنتی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع *www.rifr–ac.ir* قابل دسترس است.

فصلنامهٔ پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۱ شمارهٔ ٤ ، صفحهٔ ۵۵۳ - ۵۸٦ ، (۱۳۸٤)

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر میزان برخی از متابولیت های ثانویه (ساپونین ها و آنتوسیانین ها) و القاء مقاومت ضد میکروبی در گیاه دارویی *Bellis perennis* L.

رمضانعلی خاوری نژاد[۱] و اکرم اسدی[۱]

چکیده

گیاهان ترکیبهای ثانویه گوناگونی تولید می‌کنند، تعدادی از آنها می توانند رشد میکروبها را در شرایط invitro مهار کنند. این ترکیبهای مهار کننده ممکن است در طی رشد و نمو طبیعی گیاه تولید شوند و یا تنها در پاسخ به حملهٔ عوامل بیماریزا یا استرس تولید شوند. اهمیت این ترکیبات ناشی از خصوصیات دارویی، فعالیت ضد میکروبی و احتمالا نقش آنها به عنوان تعیین کننده های مقاومت گیاه در برابر بیماری می باشد. از این رو اگر شرایطی فراهم گردد که تولید ترکیبهای ثانویه موجود در گیاهان دارویی افزایش یابد، هم از لحاظ ویژگیهای دارویی و هم از لحاظ ویژگیهای اقتصادی مقرون به صرفه خواهد بود. در پژوهش حاضر واکنش گیاه دارویی *Bellis perennis* L. از تیرهٔ کمپوزیته در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید (SA) و میزان تجمع دو متابولیت ثانویه ساپونین و آنتوسیانین به ترتیب در ریشه ها و برگهای گیاه مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاکی از آن است که مقدار ترکیبهای ثانویه ساپونین و آنتوسیانین در گیاهان تیمار شده با غلظت های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار SA نسبت به گیاهان تیمار نشده با SA و بدون آلودگی (گیاهان کنترل) افزایش پیدا می‌کند. همچنین مقدار این ترکیبها در گیاهان آلوده و بدون تیمار SA بیشتر از گیاهان کنترل بود و در زمانی که گیاهان آلوده، با SA تیمار شدند، افزایش قابل ملاحظه ای در مقدار این ترکیبات نسبت به گیاهان کنترل مشاهده شد. همچنین قله‌های بدست آمده از نمونه ها به روش HPLC و مقایسهٔ آن با ترکیبهای استاندارد، نتایج فوق را تأیید کرد. نتایج نشان داد، طول عمر گیاهان آلودهٔ تیمار شده با SA، بیشتر از گیاهان آلوده شده و تیمار نشده با SA می‌باشد. همچنین بین افزایش طول عمر در این گیاهان که در اثر تیمار SA ایجاد شد، با افزایش میزان این ترکیبها رابطهٔ معنی داری مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از تیمار SA به گیاه مینای چمنی به‌طور معنی‌داری در کاهش شدت بیماری و افزایش میزان ترکیبهای ثانویه در گیاهان آلوده و بدون آلودگی، نسبت به گیاهان کنترل مؤثر باشد.

واژه های کلیدی: *Bellis perennis* L., سالسیلیک اسید, ساپونین, آنتوسیانین, قارچ, باکتری

۱- بخش بیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

مقدمه

گیاهان به عنوان یکی از منابع داروهای طبیعی، قادر به سازشهای فیزیولوژیکی متفاوتی در پاسخ به دامنهٔ وسیعی از محرکها در محیط پیرامونی خود می باشند. عوامل بیماریزایی که موجب زخمهای بافت مردگی می‌گردند، اغلب سبب حفاظت گیاه در برابر هجوم همان عامل بیماریزا یا موجود زندهٔ دیگر می‌شوند. این پدیده در مورد آلودگی های قارچی و باکتریایی گزارش شده است. این مقاومت به شکل مقاومت اکتسابی موضعی[1] و مقاومت اکتسابی همگانی[2] می‌باشد. تا به حال دو نظریه در رابطه با عامل محرک در گیاه و القا کنندهٔ SAR معرفی شده است: اولین نظریهٔ ارائه شده، ایجاد توان عمل در سطح غشای یاخته ای است، بدین منظور یک موج واقطبیده (دپلیمریزاسیون) در سطح غشای یاخته‌ای، در واکنش به رها کننده‌ها[3] یا آسیب ها، در سراسر گیاه منتشر می‌گردد (Thain *et al*، ۱۹۹۰). دومین نظریه، تولید سالیسیلیک اسید[4] می‌باشد. سالیسیلیک اسید به عنوان یک گروه از ترکیبهای فنلی متعدد، دارای یک حلقهٔ آروماتیک با یک گروه هیدروکسیل، به عنوان یک القا کنندهٔ مؤثر در بیان ژنهای مقاومت شناخته شده است که پس از افزودن به سطح بیرونی تعدادی از گیاهان، پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR) را به رمز درمی‌آورد (White *et al*، ۱۹۸۷؛ White، ۱۹۷۹). گزارشهای موجود بیان می‌کنند که بعد از تلقیح گیاهان با عوامل بیماریزا، سالیسیلیک اسید تولید شده به سرعت به گلوکز متصل شده و به سالیسیلیک اسید ß- گلوکوزید (SAG) تبدیل می‌شود. آنزیمی که SA را به SAG تبدیل می‌کند، سالیسیلیک اسید گلوکوزیل ترانسفراز می‌باشد که در چندین گیاه، شناسایی شده است. یک الگو نقش SAG را در گسترش مقاومت اکتسابی چنین نشان می‌دهد (Malamy &

1 - Local acquired resistance(LAR)
2 - Systemic acquired resistance (SAR)
3 - Elicitors
4 - Salicylic acid (SA)

Klessing، ۱۹۹۲؛ Maleck & Lawton، ۱۹۹۸؛ Cameron، ۲۰۰۰) کـه یـک آلـودگی اولیه به وسیلهٔ عامل بیماریزا، موجب تشکیل آسیب های بافت مردگی و واکنش سـریع و تولید سالیسیلیک اسید در سراسر گیاه می شود. همین طور مازاد SA بهSAG تبـدیل می گردد. اگر گیاه دوباره با همان عامل بیماریزا آلوده شود، مهار بعدی منجر به خرابـی یاخته و تغییر در نفوذپذیری غشا در محل آلودگی می شود که این امر به انتشار SAG به درون فضاهای برون یاخته‌ای و هیدرولیز آن منجر می‌گردد. این عمل غلظـت SA را در محل آلودگی افزایش داده و SA تولید شده می تواند به یاخته های مجاور وارد شود و پاسخهای دفاعی را القا کند. این فرآیند دفاعی در طی آلودگی ثانویه نسبت بـه دفـاع اولیه بیشتر مؤثر خواهد بود، و تبدیل سریع SA به SAG به سرعت پاسخهای دفاعی را در زمان و مکانی که به آن نیاز است، القا خواهد کرد. این القای سریع و مؤثر در محـل آلودگی، آسیب کمتری را ایجاد می کند. آلودگی گیاهان با عوامل بیماریزا اغلب باعـث مکانیسمهای دفاعی چند جزیی و وسیع می شود که ممکن اسـت شـامل فعـال سـازی مسیر زیست ساخت (بیوسنتز) فنیـل پروپانوئیـد هـا (Dixon & Paiva، ۱۹۹۵)، تغییـر ساختار دیوارهٔ یاخته ای از طریق ساختن و تشکیل پروتئین هـای غنـی از هیدروکـسی پـرولین (Brisson *et al*، ۱۹۹٤)، لیگنـین ((Bruce & West، ۱۹۸۸)، تولیـد آنزیمهـای هیدرولیتیک مانند کیتیناز و گلوکانازها (Kombrink *et al*، ۱۹۹۱) و ساختن مهارکننـده های آنزیمهای تجزیه کنندهٔ دیوارهٔ یاخته ای (Degra، ۱۹۸۸) باشد. این موارد در واقـع شرایطی در گیاه فراهم می کند تا تعادل سوخت وسازی در یاخته ها در طی پاسـخ بـه عوامل بیماریزا حفظ شود (Kombrink & Hahlbrock، ۱۹۹۰). به نظـر مـی رسـد کـه سالیسیلیک اسید نیز می تواند توانایی گیاه را برای بسیج دفاع یاخته ای از طریق همـان مکانیسمهای دفاعی چند جزیی و وسیع که عوامل بیماریزا فراهم می کنند، افزایش دهد و تعـادل سـوخت و سـازی یاختـه هـا را حفـظ کنـد (Malamy & Klessing، ۱۹۹۲؛ Maleck & Lawton، ۱۹۹۸). با توجه به مطالب بیان شـده، پـژوهش حاضـر در صـدد

فراهم آوردن شرایطی است که بتوان تولید ترکیبهای فنلی، از جمله آنتوسیانین ها را در گیاه دارویی مینای چمنی در موقع حملهٔ عوامل بیماریزا به حداکثر رساند. گیاه دارویی مینای چمنی کوچک و علفی از خانوادهٔ مرکبیان (کاسنی)، بومی اروپا و همچنین در نقاطی از آسیا است. قسمتهای مورد استفاده این گیاه که خواص درمانی نیز دارند، ریشه و برگ می باشند. این گیاه شهرت زیادی در درمان زخمها دارد و همچنین در درمان امراض داخلی مانند اختلالات کبدی از عصاره آن استفاده می شود، خواص دیگر این گیاه تصفیه کنندهٔ خون، ملین ملایم، از بین برندهٔ التهاب، آرام کننده، دفع سنگ کلیه، دردهای روماتیسمی و .... است (زرگری، ۱۳۷۱). بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر روی مقدار آنتوسیانین ها در طی آلودگی گیاه به عنوان هدف پژوهش در نظر گرفته شده است، زیرا این ترکیبها نقش مهمی را در بهبود پاسخهای ایمنی در گیاهان ایفا می کنند .

مواد و روشها

کشت گیاهان

بعد از تهیه بذرها از بخش گیاهان دارویی مؤسسهٔ تحقیقات جنگلها و مراتع، و ضد عفونی کردن آنها، بستر مورد نیاز برای انتقال بذرها شامل ۲/۳ ماسه و ۱/۳ رس الک شده تهیه و سپس بذرها به این سطح انتقال یافتند. گلدانها در مقابل پنجره قرار داده شدند و بعد از جوانه زنی گلدانهای حاوی دانه رست به اتاق کشت منتقل گردیدند. میزان نور در طول روز نوسان داشت، به طوری که در صبح مقدار نور ۲۵۸۵ لوکس بود و تا میانه روز به ۳۰۰۰ لوکس افزایش می یافت و این مقدار در عصر به همان مقدار نور در صبح می رسید. بنابراین برای به حداقل رساندن اثرات میکروکلیمایی در محوطهٔ رشد گیاه، گردش وضعی و جابجایی تصادفی گلدانها به طور روزانه در دورهٔ رشد صورت گرفت. حرارت محیط پیرامونی در نقاط اتاق کشت در ساعات مختلف روز

اندازه گیری شد و دمای روزانه در حدود ۳± ۲۱ درجه سانتیگراد و دمای شبانه ۳± ۱۵درجه سانتیگراد ثبت گردید. دانه رستها تا روز دهم با آب مقطر افشانه شدند. از روز دهم تا روز پانزدهم یک روز در میان حجم معینی از محلول غذایی هوگلند ۱/۱۰ به گلدانها اضافه شد. از روز پانزدهم تا روز بیستم دو روز در میان محلول غذایی هوگلند ۱/۵ و از روز بیستم تا بیست و پنجم سه روز در میان محلول غذایی هوگلند ۱/۲ و از روز بیست و پنجم سه روز در میان حجم معینی از محلول غذایی هوگلند کامل به گلدانها اضافه شد. هر روز به میزان کاهش آب از دست رفته آب مقطر اضافه گردید. از روز بیست و نهم که گیاهان در آستانهٔ تشکیل برگ سوم بودند، تیماردهی با غلظتهای ۳،۷و۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید آغاز شد. بدین منظور محلول ۰/۰۰۱ مولار سالیسیلیک اسید به عنوان محلول مادر تهیه شد. و از این محلول غلظت های متفاوت سالیسیلیک اسید (۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار) تهیه گردید. لازم به ذکر است که تیماردهی هر سه روز یکبار تا پایان روز برداشت (هفتادمین روز) ادامه داشت.

نام تیمار	ترکیب محلول غذایی در تیمارهای اعمال شده
نمونه کنترل	محلول غذایی هوگلند کامل
SA_3	محلول غذایی هوگلند کامل + غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید
SA_7	محلول غذایی هوگلند کامل + غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید
SA_{11}	محلول غذایی هوگلند کامل + غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید

زمان و روش تلقیح

میکروارگانیسمهای مورد پژوهش بـه طـور خـالص از مؤسـسهٔ تحقیقـات آفـات و بیماریهای گیاهی، بخش باکتریولوژی تهیه شد. نمونه هـای باکتریـایی و قـارچی مـورد مطالعه عبارتند از *پسودوموناس مارجینالیس*[1] ، *اروینیا کاروتوورا*[2]، *فوزاریوم سامباسینوم*[3] و *آلترناریا*[4] بودند. میکروارگانیسمهای مورد آزمایش از لحاظ خالص بودن مورد بررسی قرار گرفتند. و جهت حفظ باکتریها و قارچها هر پانزده روز یکبار بر روی محیط کشت جدید از نمونه های فوق کشت جدید تهیه می شد. باکتریهای مـورد مطالعـه از عوامـل بیماریزای عادی در گیاه هستند، به طـوری کـه هـر دو بـاکتری مـورد آزمـایش عامـل دگرگونیهای پارانشیمی در گیاهان می باشند. از علائم بیماری باکتری از *پسودوموناس مارجینالیس*، ظهور لکه های تیره به اندازه های مختلف در حاشیه برگها است. آلـودگی از طریق روزنه های حاشیه برگها رخ می دهد و آثار بیماری در اثر انتشار سـریع انگـل در فضای بین یاخته ای بروز می کند. اهمیت اقتصادی بیماری در درجه اول بـه لحـاظ آلودگی بعضی از گیاهان خانواده مرکبان می باشد. دگرگونیهای ایجاد شـده بـه وسـیله *اروینیا کاروتوورا* به صورت زخمهایی از بافت مرده است که به سـرعت گـسترش مـی یابند. و همچنین پوسیدگی نرم و نرم شدن آنزیمی تیغه بافتها است. مشخصات عمومی این بیماری به صورت از هم پاشیدگی بافتها ظاهر می شـود و بافتهـای آلـوده، سـیاه و پلاسیده شده و در نهایت به توده غیر متشکل تبدیل می گردند. از علائم بیماری ایجـاد شده توسط قارچ *فوزاریوم سامباسینوم* پژمردگی و پوسیدگی آوندی مـی باشـد، سـم این قارچ تری ترپنوئیدی و بازدارندهٔ مرگبارسنتزپروتئین در موجودات یوکـاریوت مـی

1 - *Pseudomonas marginalis*
2 - *Erwinia carotovora*
3 - *Fusarium sambacinum*
4 – *Alternaria spp*

باشد. همچنین از علائم ایجاد شده توسط قارچ *آلترناریا* لکه‌های قارچی بر روی برگها و پژمردگی می‌باشد. سم این قارچ تنتوکسین از سموم منشا گرفته ازاسید آمینه می باشد، این سم میزان بازشدن روزنه ها را از طریق منع فسفوریله شدن نوری کاهش می دهد (استریت، ۱۳۷۳). بر این اساس عمل تلقیح بر طبق روش انیدی (Enyedi *et al*، ۱۹۹۲) شصت روز پس از جوانه زنی انجام شد. در هر گیاه سطح تحتانی دو برگ (از چهار ردیف برگ موجود ، برگهای ردیف سوم به دلیل اینکه نه پیر و نه زیاد جوان بودند انتخاب شدند) با سرنگ بدون سوزن استریل زخمی شد. سپس مادهٔ تلقیحی تهیه شده (در ۱۵ میلی لیتر آب مقطر استریل یک میلی لیتر سوسپانسیون قارچی(10^5spore ml^{-1}) ، همچنین در ۱۵ میلی لیتر دیگر آب مقطر استریل یک میلی لیتر سوسپانسیون باکتری (10^8 CFU ml^{-1}) اضافه گردید) بر روی گیاه مربوطه پاشیده شد و مادهٔ تلقیحی بر روی محل زخم با دست به آرامی مالش داده شد تا از نفوذ باکتری و قارچ اطمینان حاصل گردد، سپس گلدانها به مدت ٤٨ ساعت در اتاق تاریک قرار گرفتند و بعد از این مدت به اتاق کشت جداگانه منتقل شدند. از روز اول تا روز دهم بعد از تلقیح که معادل روز هفتادم و زمان برداشت بود شدت بیماری در طی روز گزارش گردید (Enyedi *et al*، ۱۹۹۲) .

روش استخراج آنتوسیانین ها

مقدار معینی از بافت تازه برگ (۲ دیسک برگی ۲۰ میلی متری) در ۳ میلی لیتر متانول اسیدی شده (HCl 1%, v/v) برای ٢٤ ساعت در دمای $4\ ^0C$ با کمک دستگاه تکان دهندهٔ مداوم (اوربیتال شیکر) به آرامی تکان داده شد. برای حذف کلروفیل و رنگیزه های دیگر از ۱ میلی لیتر استن : آب (v:v ، ٤:۱) استفاده شد. برای ۲ میلی لیتر از عصارهٔ آنتوسیانینی ۱/۵ میلی لیتر آب و ۲/۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه شد و بعد از

سانتریفوژ کردن در۱٦۰۰g برای ۲۰ دقیقه در دمای $4\ ^0C$ محلولهـای روشـناور محتـوی آنتوسیانین به لوله ها منتقل شدند (Adamse، ۱۹۸۸) .

شناسایی آنتوسیانین با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

نمونه های بدست آمده از فرآیند اسـتخراج، توسـط کرومـاتوگرافی سـتونی (پـیش ستون) جداسازی شد، بدین منظور یک ستون شیشه ای به طول ۵۰ سانتیمتر و قطر ۱۲ میلیمتر محتوی سیلیکاژل کروماتوگرافی به عنوان مرحله ثابت در نظر گرفته شـد. ایـن فاز درسیستم حلال شامل تری کلرومتان: متانول: آب(۱۵:۱۰:۲) به تعادل رسید. مرحلـه متحرک به همراه نمونه در فضای داخل مرحله ثابت با سرعت ۳۰ میلی لیتر در سـاعت به حرکت در آمد. تغییرات جذب توسط آشکارساز مدلUV- UniCom 4225 ارزیابی و نقاط دارای جذب به هم ارتباط یافت و توسط ثبات به صورت منحنی رسـم گردیـد. محلول خروجی از آشکارساز در فاصله ای که جذب قابل توجـه بـود (در طـول مـوج ۵۳۰ نانومتر) برای مرحلهٔ بعد با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جمع آوری شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتـر از نمونـه هـا بـه دسـتگاه HPLC مـدل Crystal-200- uniCom 4225 (رکورد دستگاه Philips-PM 8261) تزریق گردیـد و از سـتون C_{18} بـا ابعاد٦/٤×۲۵۰ میلیمتر استفاده شد. تحت شرایط گرادیان عمل شستشو توسط متانول بـا غلظت های ٤۰ تا ۱۰۰ درصد و اسید فسفریک ۰/۰۰۵ درصد (v/v) و سـرعت جریـان یک میلی لیتر در دقیقه با فاصلهٔ زمانی ۲٤ دقیقه از پمپ ها وارد ستون شد. مدت زمانی که طول می کشد تا اولین قله مشاهده شود، با زمان بـازداری ۱۵ دقیقـه اسـت. جـذب توسط آشکارساز در ۵۳۰ نانومتر برای وجود آنتوسیانین ها تعیین گردیـد. بـرای تعیـین غلظت آنتوسیانین نمونه ها، از نمونه استاندارد Cyanidin 3-O-ß-D-glucopyranoside ۱۰ درصد با غلظت های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ..۰/۱ میلی گرم در میلـی لیتـر اسـتفاده و بـه

ترتیب به دستگاه تزریق شد (به دلیل محدودیت در تهیه استانداردهای دیگر از انواع آنتوسیانین ها، تنها امکان تشخیص و جداسازی مشتق سیانیدین آنتوسیانین، به دلیل شاخص تر بودن مشتق سیانیدین در مینای چمنی برای پژوهشگران ممکن بود).استانداردها کروماتوگرافی شدند و زمان بازداری[1] و نواحی قله هایشان با یک هماهنگ کنندهٔ مدل 3396A, Hewlett-Padcard تعیین شد. زمان بازداری جهت شناسایی و تعیین مقدار آنتوسیانین ها در یک نمونه و مقایسهٔ آنها با غلظت شناخته شده در یک نمونه استاندارد است.

روش استخراج ساپونین ها

مقدار معینی از پودر ریشه همراه با متانول ۸۰ درصد، در یک بالون ریخته (به ازای هر گرم ماده گیاهی ۱۰ میلی لیتر متانول بکار برده شد) و با کمک مبرد و دستگاه بن ماری به مدت یک ساعت نمونه ها در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از سرد شدن، عصاره حاصل صاف گردید و از دستگاه تبخیرکننده گردان [2] به منظور تبخیر حلال استفاده شد. سپس عصاره حاصل، در مقدار کمی آب مقطر حل شد و به منظور چربی زدایی از مخلوط کلروفرم و آب (1:1) استفاده شد. لایه چربی زدایی شده با n–بوتانول اشباع شده با آب، به منظور ورود ساپونین به این مرحله، مخلوط و پس از گذشت زمان معینی دو لایه تشکیل گردید. لایه فوقانی که دارای n–بوتانول می باشد با دستگاه تبخیر کننده گردان تبخیر گردید. عصاره باقی مانده در مقدار کمی متانول حل و برای رسوب ساپونین، عصاره متانولی بر روی دی اتیل اتر (Et_2O) قطره قطره ریخته

1 -Retention time
2 - Rotary evaporator

شد. از عصاره متانولی حل شده در دی اتیل اتر به منظور سنجش ساپونین به وسیله کروماتوگرافی ستونی استفاده گردید (Schopke *et al.*، ۱۹۹۱).

شناسایی ساپونین با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

در سنجش ساپونین، نمونه های بدست آمده از فرآیند استخراج، توسط کروماتوگرافی ستونی (پیش ستون) وارد فرآیند جداسازی شد، بدین منظور یک ستون شیشه ای به طول ۵۰ سانتیمتر و قطر ۱۲ میلیمتر محتوی سیلیکاژل کروماتوگرافی به عنوان مرحله ثابت در نظر گرفته شد. این مرحله درسیستم حلال شامل تری کلرومتان: متانول: آب(۱۵:۱۰:۲) به تعادل رسید. مرحله متحرک به همراه نمونه در فضای داخل مرحله ثابت با سرعت ۳۰ میلی لیتر در ساعت به حرکت در آمد و از برم فنل بلو به عنوان اندیکاتور برای نشانه گذاری مرحله متحرک استفاده شد. تغییرات جذب توسط آشکارساز ذکر شده در قسمت قبل، ارزیابی و نقاط دارای جذب به هم ارتباط یافت و توسط ثبات به صورت منحنی رسم گردید. محلول خروجی از آشکارساز در فاصله ای که جذب قابل توجه بود (در طول موج ۲۲۵ نانومتر) برای مرحلهٔ بعد با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جمع آوری شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از نمونه ها به دستگاه HPLC ذکر شده در قسمت قبل تزریق گردید و از ستون $C_{۱۸}$ با ابعاد ۲۵۰×۴/۶ میلیمتر استفاده شد. تحت شرایط ایزو کراتیک عمل شستشو توسط متانول ۷۵ درصد و سرعت جریان یک میلی لیتر در دقیقه از پمپ ها وارد ستون شد. مدت زمانی که طول می‌کشد تا اولین قله مشاهده شود با زمان بازداری ۱۵ دقیقه است. جذب توسط آشکار ساز در ۲۲۵ نانومتر برای وجود ساپونین‌های تری ترپنوئیدی، تعیین گردید. برای تعیین غلظت ساپونین نمونه ها، از نمونه استاندارد Quillage source (Terpenoid) Merck ۵۰ درصد با غلظت های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۲.....۰/۱ میلی

گرم در میلی لیتر استفاده و به ترتیب به دستگاه تزریق شد. استانداردها کروماتوگرافی شدند و زمان بازداری و نواحی قله هایشان با یک هماهنگ کننده مدل 3396A, Hewlett-Padcard تعیین شد. زمان بازداری، جهت شناسایی و تعیین مقدار ساپونین ها در یک نمونه و مقایسه آنها با غلظت شناخته شده در یک نمونه استاندارد است.

روش آماری: پس از تعیین نتایج خام اولیه، جهت تفسیر نتایج از محاسبات آماری استفاده شد. برای تجزیهٔ داده ها از نرم افزار آماری SPSS جهت تعیین میانگین، انحراف معیار و تحلیل واریانس دو عاملی استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی ظاهری گیاهان تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید و آلوده به باکتری و قارچ

در گیاهان آلوده به باکتری *پسودوموناس مارجینالیس* از روز اول آثار بیماری (زردی، بافت مردگی(سوختگی) و پژمردگی) در نمونه های کنترل مشاهده نشد و در روز دوم بعد از تلقیح آثار بیماری در برگهای زخمی شده ظاهر گردید، یعنی برگها حالت پژمردگی و مردگی داشتند. از روز سوم، آثار بیماری به طور خفیف در برگهای دیگر هم ظاهر شد، به طوری که ٤ تا ٥ روز بعد از تلقیح بعضی از برگها در نمونه های کنترل پژمرده شده و از بین رفتند. اما در نمونه های آلوده به باکتری فوق، اما تیمار شده با سالیسیلیک اسید آثار بیماری حتی بعد از ۱۰ روز مانند نمونه های کنترل نمایان نشد و بیماری در گیاه به کندی گسترش پیداکرد.

در گیاهان آلوده به باکتری *اروینیا کاروتوورا* از روز اول بعد از تلقیح، در نمونه های کنترل آثار بیماری (پوسیدگی نرم باکتریایی، بافت مردگی و پژمردگی) مشاهده شد، به طوری که برگهای زخمی شده حالت پلاسیده، نرم (حالت لجنی) و سیاه داشتند و از روز دوم آثار بیماری بافت مردگی به تدریج در برگهای دیگر ظاهر شد، به طوری که

تا روز دهم بعد از تلقیح بیشتر برگها پژمرده شدند، ولی در نمونه های آلوده به باکتری فوق، اما تیمار شده آثار بیماری حتی بعد از ۱۰ روز مانند نمونه های کنترل نمایان نشد، یعنی در روز اول، برگهای زخمی شده هیچگونه آثار بیماری را ظاهر نکردند، بلکه در روز دوم کم کم آثار بیماری (حالت بافت مردگی (سوختگی)، نه حالت پوسیدگی نرم باکتریایی) مشاهده شد و تا روز دهم، بیماری در بعضی از برگها به طور خفیف گسترش پیدا کرد.

در گیاهان آلوده با قارچهای *فوزاریوم و آلترناریا* از روز اول آثار بیماری در برگهای زخمی (لکه‌های قارچی بر روی برگها و پژمردگی) به طور خفیف ظاهر شد و بعد از ۳ روز بیماری در همان برگها به طور کامل قابل تشخیص بود و در برگهای دیگر نیز پیشرفت بیماری مشاهده گردید. اما در نمونه های آلوده ولی تیمار شده با غلظت های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید از روز اول آثار بیماری آشکار نشد و بعد از ۳ روز در برگهای زخمی شده، بیماری به صورت لکه های قارچی ظاهر شد و در روز دهم بعد از تلقیح گسترش بیماری در بعضی از برگها به کندی صورت گرفته بود.

بدین ترتیب نشان داده شد که تیمار سالیسیلیک اسید در کاهش ظهور علائم بیماری در گیاه مؤثر بوده و مرگ گیاه را به تعویق انداخته است.

نتایج بررسی زیست شیمیایی آنتوسیانین ها در گیاه مینای چمنی

سنجش مقدار آنتوسیانین با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و کرو ماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد به طوری که نتایج حاصل از هر دو روش با هم همخوانی داشتند.

این سنجش با محاسبه سطح زیر منحنی و مقایسهٔ زمان بازداری هر کدام از نمونه‌ها و مقایسه آنها با آنتوسیانین استاندارد انجام شد (جدول شماره ۱).

چنانچه از جدول شماره ۱ استنباط می شود، مقدار آنتوسیانین در گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و فاقد آلودگی (گیاهان کنترل)، ۷/۲ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر می‌باشد. زمانی که گیاهان با غلظت های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می شوند و بدون هر گونه آلودگی هستند افزایش قابل توجهی در مقدار آنتوسیانین مشاهده می‌گردد به طوری که مقدار آنتوسیانین از ۷/۲ میکروگرم در گیاهان کنترل به ۲۳/۵ میکروگرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۳۰/۷ میکروگرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱٦/۹ میکروگرم برای گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و تیمار شده با غلظت‌های ۳(P<۰/۰۰۱)، ۷ (P<۰/۰۰۱) و ۱۱ (P<۰/۰۱) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی مقدار آنتوسیانین مشاهده گردید.

زمانی که گیاهان با باکتری *پسودوموناس مارجینالیس* آلوده می‌شوند، مقدار آنتوسیانین در برگها از ۷/۲ میکروگرم در گیاهان کنترل به ۱۵/۷ میکروگرم افزایش می‌یابد و تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به باکتری پسودوموناس در P<۰/۰۰۱ برروی تجمع آنتوسیانین نشان می‌دهد. اما زمانی که گیاهان آلوده به این باکتری با غلظت های ۳، ۷ و۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می شوند، تغییرات قابل ملاحظه ای در مقدار آنتوسیانین مشاهده می‌گردد، به طوری که مقدار آنتوسیانین از ۱۵/۷ میکروگرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۲٦/۸ میکروگرم برای نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۱۸/۸ میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۲۳/٦ میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی

داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت های ۳ (P<۰/۰۰۱) و ۱۱ (P<۰/۰۰۱) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی مقدار آنتوسیانین مشاهده شد. در غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید تفاوت معنی داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار بر روی تجمع آنتوسیانین مشاهده نشد.

در گیاهان آلوده به باکتری *اروینیا کاروتوورا* مقدار آنتوسیانین در برگها از ۷/۲ میکروگرم در گیاهان کنترل به ۲۹/۱ میکروگرم افزایش یافت. و تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به باکتری فوق در P<۰/۰۰۱ بر روی مقدار آنتوسیانین نشان داد. در زمانی که گیاهان آلوده به باکتری اروینیا با غلظت های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می شوند، مقدار آنتوسیانین افزایش می‌یابد. به طوری که مقدار آنتوسیانین از ۷/۲ میکروگرم در نمونه کنترل به ۱۷/۱ میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار، ٤١/٢ میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار و ۳۱/٦ میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی، تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید در P<۰/۰۰۱ بر روی مقدار آنتوسیانین مشاهده گردید.

زمانی که گیاهان با قارچ *فوزاریوم سامباسینوم* آلوده می شوند، مقدار آنتوسیانین در برگها از ۷/۲ میکروگرم در گیاهان کنترل به ۱۱/۸ میکروگرم افزایش می یابد و آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به قارچ فوزاریوم در P< ۰/۰۵ بر روی تجمع آنتوسیانین نشان می‌دهد. اما زمانی که گیاهان آلوده با این قارچ با غلظتهای ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می شوند تغییرات قابل ملاحظه‌ای در مقدار آنتوسیانین مشاهده می گردد، به طوری که مقدار آنتوسیانین از ۱۱/۸ میکروگرم در نمونهٔ آلوده و تیمار نشده به ١٤ میکروگرم برای نمونهٔ

آلودهٔ تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ١٦/٦ میکروگرم در نمونهٔ آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۹/۳ میکروگرم در نمونهٔ آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دوعاملی تفاوت معنی داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلودهٔ تیمار شده با غلظت های ۳ (P<۰/۰۵)، ۷ (P<۰/۰۱)و ۱۱ (P<۰/۰۰۱) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی مقدار آنتوسیانین مشاهده شد.

در گیاهان آلوده با قارچ *آلترناریا* مقدار آنتوسیانین در برگها از ۷/۲ میکروگرم در گیاهان کنترل به ۲۱ میکروگرم افزایش یافت. تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به قارچ آلترناریا در P<۰/۰۰۱ بر روی مقدار آنتوسیانین نشان داد. در زمانی که گیاهان آلوده با قارچ آلترناریا با غلظتهای ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، مقدار آنتوسیانین افزایش می یابد. به طوری که مقدار آنتوسیانین از ۲۱ میکروگرم در نمونهٔ آلوده و تیمار نشده به ۳۵ میکروگرم در نمونهٔ آلوده تیمارشده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ٢٤ میکروگرم در نمونهٔ آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۳۳ میکروگرم در نمونهٔ آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی، تفاوت معنی داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظتهای ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید در P<۰/۰۰۱ بر روی مقدار آنتوسیانین مشاهده گردید.

همان طور که ملاحظه می گردد میزان پایین سالیسیلیک اسید می توانند توانایی گیاه را برای بسیج دفاع یاخته ای به منظور افزایش القا ترکیبهای دفاعی ویژه (مانند ساپونین‌ها، ترکیبهای فنلی، ایزو فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای سیانوژنیک....) بالا ببرد و میزان های بالا نیز می توانند به طور مستقیم برای القای بیشتر همان ترکیبهای دفاعی و یا ترکیبهای دفاعی دیگر مؤثر باشند (Malamy & Klessing، ۱۹۹۲).

کروماتوگرام HPLC آنتوسیانین های استخراج شده از گیاهان کنترل یک قلهٔ اصلی با زمان بازداری ۵۸/۵ دقیقه را نشان می دهد (شکل شماره ۱). هیدرولیز اسیدی عصاره (جوشاندن عصاره در اسیدکلریدریک ۲ درصد برای ۲ ساعت) سبب تشکیل یک قلهٔ منفرد شده است که با آنتوسیانین استاندارد (با زمان بازداری ٦۰ دقیقه) در زمانی که به وسیلهٔ HPLC جداسازی می شود کروماتوگرافی می گردد. بنابراین آنتوسیانینی که تجمع یافته یک مشتق سیانیدین است (شکل شماره ۲).

همچنین نمودار HPLC آنتوسیانین های استخراج شده از برگهای آلوده شده با قارچ و باکتری و تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید، یک قلهٔ اصلی با زمان بازداری ۵۸/۵ دقیقه را نشان می دهد(شکل شماره ۳).

نتایج بررسی زیست شیمیایی ساپونین ها در گیاه مینای چمنی

سنجش مقدار ساپونین های کل[1] با استفاده از HPLC انجام شد. با محاسبه سطح زیر منحنی و مقایسه زمان بازداری هر کدام از نمونه‌ها و مقایسه آنها با نمونه استاندارد، مقادیر ساپونین تعیین شد (جدول شماره ۲).

چنانچه از جدول شماره ۲ استنباط می شود، مقدار ساپونین در گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و فاقد آلودگی (گیاهان کنترل)، ٤۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک است. زمانی که گیاهان با غلظتهای ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند و بدون هر گونه آلودگی هستند، افزایش قابل توجهی در مقدار ساپونین مشاهده می‌گردد، به طوری که مقدار ساپونین از ٤۲ میلی گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۷۳ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۵۹ میلی گرم بر گرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و

[1] - Total saponins

۱۲۲ میلی‌گرم بر گرم برای گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تیمار نشده و تمیار شده با غلظتهای ۷ (P<۰/۰۵) و ۱۱ (P<۰/۰۰۱) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر مقدار ساپونین مشاهده گردید. و در غلظت ۳ میکرومولار تفاوت معنی داری بین گیاهان کنترل و گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار بر تجمع ساپونین مشاهده نشد.

زمانی که گیاهان به بکتری *پسودوموناس مارجینالیس* آلوده می شوند، مقدار ساپونین ها در ریشه از ٤۲ میلی گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ٥٦ میلی گرم بر گرم افزایش می یابد و تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به باکتری فوق در P<۰/۰۵ بر روی تجمع ساپونین نشان می‌دهد. اما زمانی که گیاهان آلوده به این باکتری با غلظتهای ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در مقدار ساپونین مشاهده می‌گردد، به‌طوری که مقدار ساپونین از ٥٦ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۹۲ میلی‌گرم بر گرم برای نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۷۹ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۱٦ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظتهای ۳ (P<۰/۰۰۱)، ۷ (P<۰/۰۰۱) و ۱۱ (P<۰/۰۰۱) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی تجمع ساپونین مشاهده شد.

زمانی که گیاهان به باکتری *اروینیا کاروتوورا* آلوده می شوند، مقدار ساپونین در ریشه ها از ٤۲ میلی گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ٦۳ میلی گرم بر گرم افزایش می یابد و تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده

به باکتری *اروینیا* در P<۰/۰۱ بر روی تجمع ساپونین نشان می دهد. اما زمانی که گیاهان آلوده به این باکتری با غلظتهای متفاوت سالیسیلیک اسید تمار می شوند، تغییرات قابل ملاحظه ای در مقدار ساپونین مشاهده می گردد، به طوری که مقدار ساپونین از ٦٣ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۱۰٦ میلی گرم بر گرم برای نمونه آلوده تیمارشده با غلظت ۳ میکرومولار، ۱۷۱ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار و ۱۳۵ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار افزایش نشان می دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظتهای ۳ (P<۰/۰۰۱)، ۷ (P<۰/۰۰۱) و ۱۱ (P<۰/۰۰۱) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی تجمع ساپونین مشاهده شد.

در گیاهان آلوده به قارچ *فوزاریوم سامباسینوم* مقدار ساپونین در ریشه ها از ٤٢ میلی گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ٤٨ میلی گرم بر گرم افزایش می یابد. و تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به قارچ *فوزاریوم* بر مقدار ساپونین نشان نمی‌دهد. در زمانی که گیاهان آلوده به قارچ فوق با سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، مقدار ساپونین افزایش می یابد، به طوری که مقدار ساپونین از ٤٨ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ٦٠ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۷۱ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار و ۹۵ میلی گرم بر گرم در نمومنه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظتهای ۳ (P<۰/۰۵)، ۷ (P<۰/۰۱) و ۱۱ (P<۰/۰۰۱) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی تجمع ساپونین مشاهده گردید.

در گیاهان آلوده به قارچ *آلترناریا* مقدار ساپونین در ریشه ها از ٤۲ میلی گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۹٦ میلی گرم بر گرم افزایش می یابد. و تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به قارچ *آلترناریا* در P<۰/۰۰۱ بر مقدار ساپونین نشان می دهد. در زمانی که گیاهان آلوده به قارچ فوق با سالیسیلیک اسید تیمار می شوند، مقدار ساپونین افزایش می یابد، به طوری که مقدار ساپونین از ۹٦ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۱۵۳ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۱٤٤ میلی گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می دهد. اما مقدار ساپونین در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار (۸۲ میلی گرم بر گرم) نسبت به نمونه آلوده تیمار نشده (۹٦ میلی گرم بر گرم) افزایش نشان نداد. اما با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظتهای ۳ (P<۰/۰۰۱)، ۷ (P<۰/۰۰۱) و ۱۱ (P<۰/۰۰۱) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی تجمع ساپونین مشاهده گردید.

نمودار HPLC از ساپونین های تری ترپنی، استخراج شده از گیاهان کنترل، یک قله اصلی با زمان بازداری ۱۳٤/۵ دقیقه هماهنگ با نمونه استاندارد (۱۳۵ دقیقه) نشان می‌دهد (شکل شماره ٤ و ۵). همچنین نمودار HPLC ساپونین های تری ترپنی استخراج شده از گیاهان آلوده و تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید یک قله اصلی با زمان بازداری ۱۳٤/۵ دقیقه را نشان می دهد (شکل شماره ٦).

بحث

بررسی تیمار سالیسیلیک اسید و عوامل بیماریزا و تأثیر آنها بر مقدار آنتوسیانین ها

آنتوسیانین ها به عنوان یک گروه از فلاونوئیدهای محلول در آب در یک نقطه پایانی در مسیر زیست ساخت (بیوسنتز) فلاونوئیدها در سیتوپلاسم ساخته شده و به شکل فعال و جداگانه به داخل واکوئل یاخته ها به وسیلهٔ پمپ گلوتاتیون وارد می شوند (Mars *et al*، ۱۹۹۵) .

برای حضور آنتوسیانین ها در برگها توضیح قابل قبولی وجود دارد. با این وجود تولید آنتوسیانین ها درنتیجهٔ تنشهای محیطی (Chalker-Scott، ۱۹۹۹)، وجود برگهای سرخ رنگ در زمانهای پیش بینی شدهٔ سال و در مراحل ویژهٔ رشد و نمو برگها و همچنین درشرایط محیطی ویژه، تعدادی از پژوهشگران را بر آن داشته است که به منظور تعیین نقشهای آنتوسیانین برگها، بررسیهای لازم را انجام دهند. نظریه هایی دربارهٔ عمل آنتوسیانین برگها در سالهای اخیر ارائه شده است که می توان به: ۱- تعدیل کمی و کیفی نور گرفته شده (Lee، ۱۹۸٦)، ۲- حفاظت از اثرات مخرب UV-B (Klaper *et al*، ۱۹۹٦) ،۳- حفاظت گیاه از جانوران علف خوار (Coley and Kusar، ۱۹۹٦)، ٤- حفاظت از مهار نوری (Gould *et al.*، ۱۹۹۵) و ۵- جارو کنندهٔ رادیکالهای فعال اکسیژنی تحت شرایط تنش محیطی (Yamasaki، ۱۹۹۷) اشاره کرد . البته هیچ یک از عملکردهای پیشنهاد شده منحصر به آنتوسیانین ها نیستند. ترکیبهای دیگری در برگها می‌توانند این عملکردها را به طور مؤثری انجام دهند. برای مثال حضور کاروتنوئیدها و توزیع کلروفیل ها می توانند به طور چشمگیری گرفتن نور را تعدیل کنند. و یا ترپن‌ها و متابولیتهای ثانویه دیگر به عنوان ترکیبهای دفاعی ضد علف خوارها در تعدادی از گیاهان عمل می کنند (Gershenzon & Croteau، ۱۹۹۱). بنابراین ممکن است آنتوسیانین ها عمل خاصی در برگها نداشته باشند. اما تحقیقات نشان می

دهد که آنتوسیانین ها می توانند در هماهنگی با مولکولهای حفاظتی در یاخته های گیاهی عمل خود را انجام دهند و برای جبران نقص در غلظت مولکولها در طی دورهٔ تنش وارد عمل شوند. البته نظریه هایی وجود دارند که بیانگر آن هستند که آنتوسیانین ها در مکانهای ویژه ای درون برگها برای کارایی بهینهٔ گیاه وارد عمل می شوند(Yamasaki، ۱۹۹۷). انباشتگی آنتوسیانین ها به وسیلهٔ محرکهای محیطی گوناگون مانند UV (Reddy، ۱۹۹٤)، دمای پایین (Christie، ۱۹۹٤)، حملهٔ عوامل بیماریزا (Harrison *et al*، ۱۹۸۰؛ Hipskind *et al*، ۱۹۹٦؛ Heim *et al*، ۱۹۸۳) و چندین تنظیم کننده های رشد مانند سیتوکینین (Deikman & Hammer، ۱۹۹۵) ، ژیبرلین ها (Mealem-Beno، ۱۹۹۷) ، اتیلن (Woltering & Somhorst، ۱۹۹۰) و سالیسیلیک اسید (Akinwunmi، ۲۰۰۱) القا می شود. آلوده کردن گیاهان با قارچ ها و باکتری های مورد مطالعه مقدار آنتوسیانین را افزایش می دهد و این افزایش زمانی که گیاهان با غلظتهای ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسلیک اسید تیمار می شوند بیشتر می گردد. به طوری که نتایج حاصل از تجزیهٔ عصاره های تهیه شده از برگهای تازه نشان می‌دهد، تیمار سالیسیلیک اسید باعث افزایش معنی داری در مقدار آنتوسیانین در آنها می شود. در گیاهان آلوده نشده بیشترین مقدار آنتوسیانین مربوط به تیمار با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید است. همچنین در گیاهان آلوده به باکتری *پسودوموناس* و *اروینیا* بیشترین مقدار آنتوسیانین تولید شده به ترتیب مربوط به تیمار با غلظت های ۳و۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و در گیاهان آلوده به قارچ *فوزاریوم* و *آلترناریا* بیشترین مقدار آنتوسیانین تولید شده به ترتیب مربوط به تیمار با غلظتهای ۱۱و۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید می باشد. با این وجود تنها دو گزارش بر اساس اثر سالیسیلیک اسید بر انباشتگی آنتوسیانین بدست آمده است که تا حدودی در راستای نتایج بدست آمده از این پژوهش می‌باشد (باتوجه به جستجوهای زیادی که پژوهشگران در منابع مختلف انجام داده اند تنها این دو گزارش را که به اثر سالیسیلیک

اسید بر انباشتگی آنتوسیانین می پردازد، مشاهده کـرده انـد). ایـن گزارشـها بـر اسـاس مطالعات در مورد جعفری و همچنین دانه رستهای لوبیای چشم بلبلـی تیمـار شـده بـا اسید سالیسیلیک و بنزوتیادیازول(BTH) بدست آمده است(Akinwunmi، ۲۰۰۱) ، بـه طوری که افزایش مقاومت در برابر بیماری در لوبیای چشم بلبلـی وابـسته بـه افـزایش سریع و گذرا در فعالیت آنزیم فنیل آلانـین آمونیالیـاز(PAL) و کـالکون ایزومـراز(CI) است. آنزیم PAL به عنوان اولین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئیـد موجـب تبـدیل فنیـل آلانین به ٤-کوماریل کوآنزیمA می گردد که ایـن ترکیـب پـیش سـاز فعـال ترکیبهـای فلاونوئیدی می باشد (Clive *et al.*، ۱۹۹۸). فعالیت یا بیان این آنزیم توسط سالیسیلیک اسید و حملهٔ عوامل بیماریزا تحریک می شود. به عبارت دیگـر آنزیمهـای PAL، CI و CS یک جریان کربنی مستقیم از مسیر فنیل پروپانوئید تا متابولیسم فلاونوئیـدها برقـرار می کنند، زیرا آنزیمهای PAL و CS هر دو در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین ها و ۳-داکسی آنتوسیانیدین (یک نوع فیتوآکسین) درگیرند می باشند، به طوری که آلودگی قـارچی و باکتریایی و تیمار سالیسیلیک اسید موجب القای شـدید ژن آنزیمهـای PAL و CS مـی شود. این پژوهشگران پیشنهاد کردند که تیمار دانه رستهای لوبیای چشم بلبلی به وسیلهٔ سالیـسیلیک اسـید و BTH مـی توانـد سـازوکارهای دفـاعی اولیـه را افـزایش دهـد و پاسخهای دفاعی را تعدیل کند. همچنین بیان کردند، تحریک تجمع آنتوسـیانین کـه در اثر تیمار سالیسیلیک اسید ایجاد می شود هماهنگ با فعال سـازی ژن آنزیمهـای درگیـر در مسیر زیست ساخت آنتوسیانین است. این اثرات توأم آلودگی قـارچی، باکتریـایی و سالیسیلیک اسید، حضور خانواده های چند ژنی را پیـشنهاد مـی کنـد، گروههـایی کـه ممکن است به وسیلهٔ محرکهای متفاوت نقشهای ویژه ای را در دفاع گیاهی ایفـا کننـد (Deikman & Hammer، ۱۹۹۵). با توجه به نتایج بدست آمده از پـژوهش حاضـر در گیاه مینای چمنی به نظر می رسد که گیاه در پاسـخ بـه عوامـل بیمـاریزا مـی توانـد بـا استفاده از یک عامل جبرانی (برای مثال ساختن آنتوسیانین به عنوان یکـی از ترکیبهـای

فنلی ساخته شده) نیازهای فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی خود را برطرف کند (Dixon & Paiva، ۱۹۹۵) . به نظر می رسد که استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید می تواند شرایط مناسبی برای ایجاد یک حالت دفاعی مناسب فراهم کند .

بررسی تیمار سالیسیلیک اسید و عوامل بیماریزا و تأثیر آنها بر مقدار ساپونین ها

گیاهان متابولیت های ثانوی گوناگونی تولید می کنند، تعدادی از آنها می توانند رشد میکروبها را در شرایط in vitro مهار کنند. این ترکیبهای مهار کننده، ممکن است در طی رشد و نمو طبیعی گیاه تولید شوند (ترکیبهای ضدمیکروبی عمل کننده یا فیتوآنتی سیپین ها) (VanEtten *et al*، ۱۹۹٤؛ Schonbeck & Schlosser، ۱۹۷٦؛ Osbourn، ۱۹۹٦). و یا این که، ممکن است در گیاهان سالم حضور نداشته باشند، بلکه تنها در پاسخ به حمله عوامل بیماریزا یا تنش (فیتوآلکسین ها) و همچنین ترکیبهای دیگر مانند ترکیبهای فنلی (سالیسیلیک اسید) تولید شوند(Paxton، ۱۹۸۱). به طور کلی ترکیبهای ضد میکروبی گیاهان شامل، مجموعه متنوعی از ترکیبها از جمله: ساپونین ها، فنل ها، هیدروکسامیک اسیدهای حلقوی، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، ایزو فلاونوئیدها، سزکوئی ترپنوئیدها، مشتقات ایندولی در بردارنده سولفور و تعدادی دیگر از ترکیبها می باشند. ساپونین ها به عنوان یکی از متابولیت های ثانوی مهم، به ۳ رده اصلی تقسیم می شوند: ۱- گلیکوزیدهای تری ترپنی ۲- گلیکوزیدهای استروئیدی ۳- گلیکوزیدهای آلکالوئیدی استروئیدی. این ترکیبها با یکی از ساختارها و یا هر ۳ ساختار در تعدادی از گونه های گیاهی یافت می شوند(Price *et al*، ۱۹۸۷؛ Hostettman & Marston، ۱۹۹۱؛ Osbourn، ۱۹۹٦؛ Schonbeck & Schlosser، ۱۹۷٦). اهمیت این ترکیبها به این دلیل است که تعدادی از آنها دارای فعالیت ضدمیکروبی مؤثری هستند و اغلب در مقادیر بالایی در گیاهان سالم یافت می شوند،

این مولکولها به عنوان حفاظت کننده های گیاهی[1] ضدمیکروبی شناخته شده اند. برای مثال در عصاره ریشه های گیاه مینای چمنی، مخلوطی از چها ر ساپونین تری ترپنوئیدی، بلیس ساپونین های ۱، ۲، ۳ و ٤ (BA1, BA2, BA3, BA4) شناسایی شده است. و ساپونین های موجود به عنوان عوامل تعیین کننده، در مقاومت مینای چمنی در برابر عوامل بیماریزا مورد توجه قرار گرفته اند(Schopke *et al*، ۱۹۹۱؛ Pinarosa & Aldo، ۱۹۹۵).

پژوهشهای موجود نشان می دهد که زمانی که کشت های سوسپانسیون سلولی توتون با رهاکننده های قارچی[2] مجاور می شوند، میزان سنتز استرول ها و القا کننده های سنتز ساپونین افزایش می یابد. به طوری که بیشتر ساختار ساپونین های تولید شده سزکوئی ترپنوئیدی می باشند(Chappell & Nable، ۱۹۸۷؛ Nugroho *et al*)، ۲۰۰۲). اخیرا توتون تولید کننده سالیسیلیک اسید نهادی[3] به وسیله ورود ژن entC– از باکتری *اشریشیا کلی*[4] و ژن pms– از باکتری *پسودوموناس فلوئورسنس*[5] در گیاه توتون[6]، تولید شده است. این ژنها به ترتیب کد کننده آنزیم های ایزوکوریسمات سنتاز(ICS) و ایزوکوریسمات پیرووات لیاز(IPL) می باشند. هر دو آنزیم در تولید سالیسیلیک اسید در میکروارگانیسم ها نقش دارند(Nugroho *et al*، ۲۰۰۱؛ Nugroho *et al*، ۲۰۰۲) . تولید نهادی سالیسیلیک اسید، بیان ژنهای درگیر در مقاومت اکتسابی همگانی (SAR) را افزایش داده و موجب می گردد که پروتئین های مرتبط با بیماریزایی (PR) به طور نهادی در گیاهان تولید شوند(Verberne *et al*، ۲۰۰۰). از طرف دیگر مشاهده شد که همزمان با افزایش SAR و تولید پروتئین های PR، تولید ساپونین تنها در محل آلودگی

1 - Phytoprotectants
2 - Fungal elicitor
3 - Constitutive salicylic acid producing (CSA)
4 - *Escherichia coli*
5 - *Pseudomonas fluorescens*
6 - *Nicotiana tabacum*

القا می شود، به طوری که این القای سریع و مؤثر در محل آلودگی موجب آسیب کمتری به گیاه می گردد و درنتیجه طول عمر گیاه افزایش می یابد (Hammerschmidt، ۱۹۹۹). برای مثال تولید پروتئینهای PR توسط فیتوفوتورا کپسیسی[1] در کشت سوسپانسیون سلولی فلفل، تجمع فیتوآلکسین سزکوئی ترپنوئیدکپسیدیول را تنها در محل آلودگی القا می کند(Nugroho *et al*، ۲۰۰۲؛ Garcia-Perez، ۱۹۹۸). همین طور تولید گیاهان تولید کننده سالیسیلیک اسید، که در نهایت به تولید ترکیبهای ضدمیکروبی مفید از جمله ساپونین ها و افزایش مقاومت گیاه در برابر آلودگی منجر می گردد، از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه خواهد بود.

به طوری که نتایج نشان داد، زمانی که گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید، آلوده می شوند، در میزان تجمع ساپونین نسبت به گیاهانی که تنها با سالیسیلیک اسید تیمار شده‌اند و بدون هر گونه آلودگی هستند، افزایش قابل توجهی مشاهده می شود. همچنین طول عمر گیاهان آلوده و تیمار شده، بیشتر از گیاهان آلوده و تیمار نشده می باشد. هامرزچمید (Hammerschmidt، ۱۹۹۹) در پژوهشی که در مورد چگونگی عمل برخی از ترکیبها از جمله سالیسیلیک اسید در القای مقاومت و توقف رشد عوامل بیماریزا در گیاهان انجام داد، به نتایج مشابهی با پژوهش حاضر دست یافت. او بیان کرد همزمان با افزایش SAR و تولید پروتئینهای PR، که در اثر تیمار سالیسیلیک اسید ایجاد می شود، افزایش تولید ساپونین به عنوان یکی از ترکیبها ضدمیکروبی، تنها در محل آلودگی القا می شود. همزمان با القا سریع و مؤثر ساپونین در محل آلودگی، آسیب کمتری به گیاه وارد شده و از گسترش آلودگی به گیاه جلوگیری می گردد و درنتیجه طول عمر گیاه افزایش می یابد. زیرا Tschesche *et al*، ۱۹۷۲ گزارش کردند، فعالیت ضدمیکروبی در هر دو گروه ساپونین های تری ترپنی و استروئیدی وجود دارد.

---

[1] - *Phytophthora capsici*

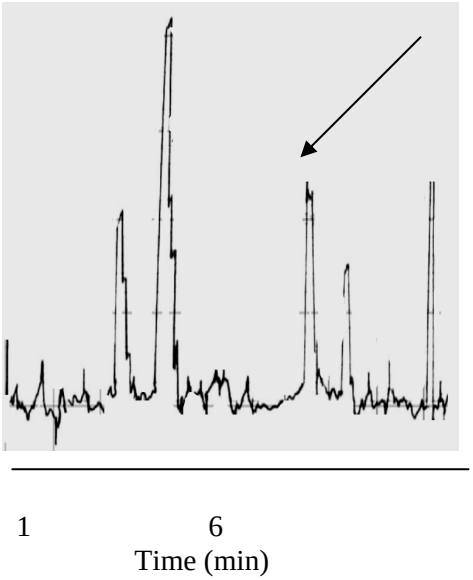
زیرا به محض آلودگی گیاه و خرابی بافت، آنـزیم هـایی رهـا مـی شـوند کـه بـر روی ساپونین‌های با ساختار بـی دسـموزیدیک اثـر گذاشـته و آنهـا را تبـدیل بـه مـشتقات مونودسموزیدشان می‌کنند، درنتیجه ساپونین‌ها می‌توانند، یک حالت دفاعی علیه حملـه میکروبی ایجاد کننـد و از گـسترش بیمـاری جلـوگیری نماینـد. همچنـین پاپـادوپلو و همکاران (Papadopoulou *et al*، ۱۹۹۹)، مـالامی و کلزینـگ (Malamy & Klessing، ۱۹۹۲)، مالک و لوتـون (Maleck and Lawton، ۱۹۹۸) و راسـکینز(Raskins، ۱۹۹۲)، به نتایجی در راستای این پژوهش دست یافتند. آنها اظهار داشتند کـه گیاهـان بـه دلیـل ساختار غشاهایشان سازوکارهای دفاعی قابل القا مجزایی را به منظور حفاظت خـود در برابر عوامل بیماریزا بروز می‌دهند. برای مثال به محض تلقیح گیاهان با عوامل بیمـاریزا و استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید و یـا هـر ترکیـب سـنتتیک طبیعـی دیگـر، ظرفیـت پاسخهای دفاعی گیاه افزایش می‌یابد و موجب می‌گردد، محتوی ترکیبهای ضدمیکروبی آنها از جمله ساپونین‌ها، فنل‌ها، سزکوئی ترپنوئیدها، ایزوفلاونوئیدها و تعدادی دیگر از ترکیبها افزایش یابد.

بنابراین به نظر می‌رسد که اسـتفاده از تیمـار سالیـسیلیک اسـید مـی توانـد شـرایط مناسبی در جهت افزایش تولید ساپونین در گیاه مینای چمنی در زمانی که گیاهان آلوده نمی‌باشند و همچنین زمانی که آلوده می شوند، فراهم کند.

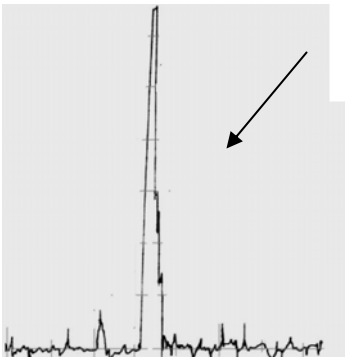
جدول شماره ۱- مقادیرآنتوسیانین(X±SE) برحسب($\mu g mg^{-1} fw$) سنجش شده به روش HPLC

تیمارسالیسیلیک اسید (SA) بر حسب(µM)	**control**	**SA_3**	**SA_7**	**SA_{11}**
control	۷/۲ ±۲/۲	۲۳/۵ ± ٤/۲	۳۰/۷ ± ٤/۵	۱٦/۹ ± ۳/۷
Pseudomonas marginalis	۱۵/۷ ±۳/۳	۲٦/۸ ±٤/٤	۱۸/۸ ±۳/۸	۲۳/٦ ±۳/۸
Erwinia carotovora	۲۹/۱ ±٤/۳	۱۷/۱ ±۳/۸	٤۱/۲ ±٦/۳	۳۱/٦ ±۵/٤
Fusarium sambacinum	۱۱/۸ ± ۲/۸	۱٤ ± ۳/۵	۱٦/٦ ± ۳/٦	۱۹/۳ ± ۳/۷
Alternaria spp	۲۱/۵ ± ۳/٦	۳۵/۲ ± ۵/۳	۲٤/۸ ± ٤/۱	۳۳/۵ ± ۵/٦

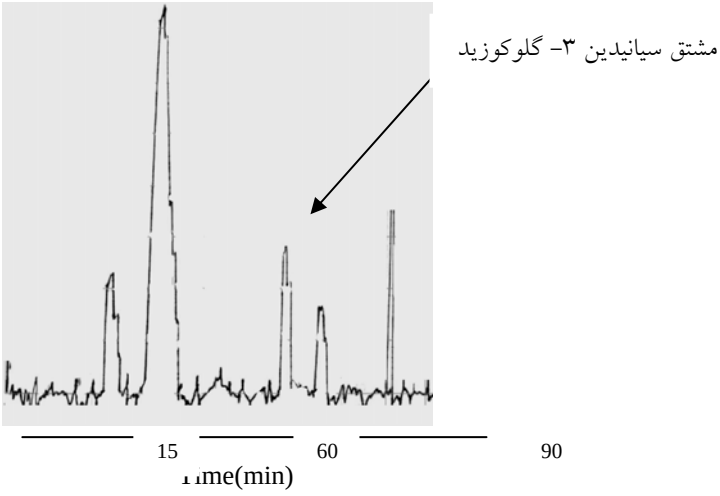
مشتق سیانیدین ۳- گلوکوزید



شکل شماره ۱- کروماتوگرام مربوط به آنتوسیانین در نمونه کنترل



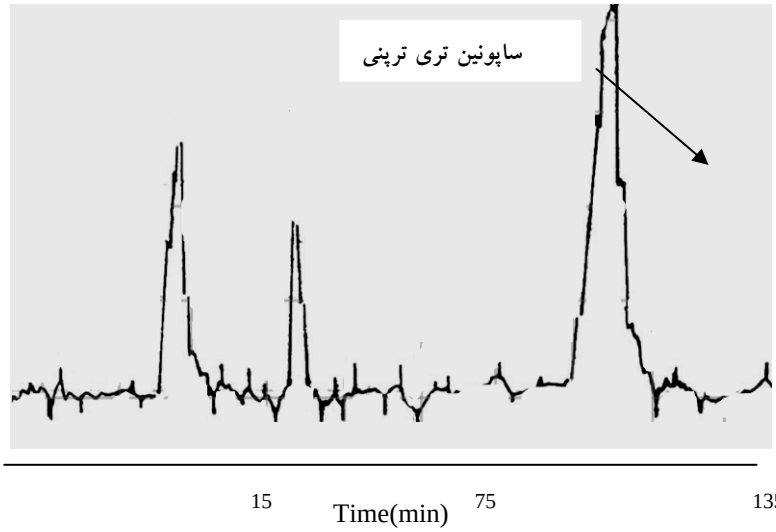
شکل شماره ۲- کروماتوگرام مربوط به آنتوسیانین استاندارد



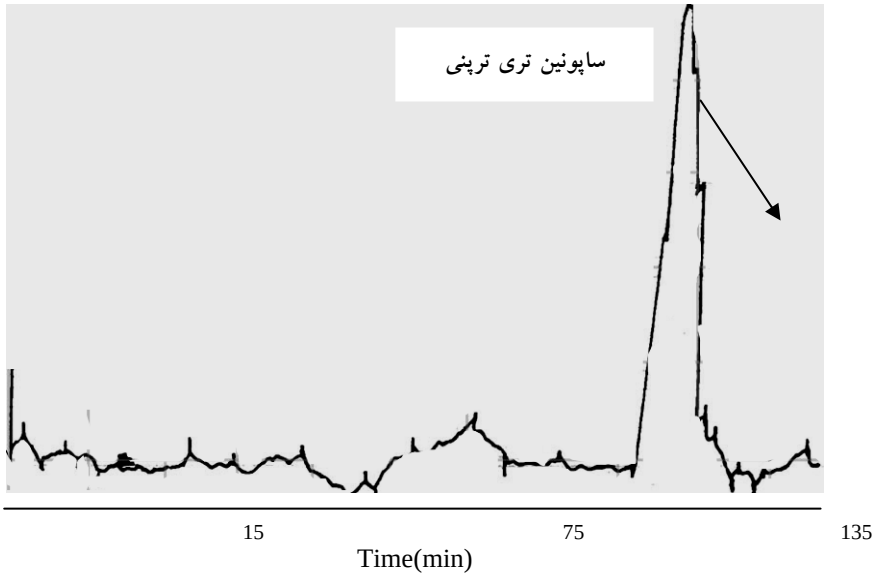
شکل شماره ۳- کروماتوگرام مربوط به آنتوسیانبن در نمونهٔ تیمار شده با سالیسیلیک اسید

جدول شماره ۲ – مقادیرساپونین‌ها (X±SE) برحسب ($mgg^{-1}dw$) سنجش شده به روش HPLC

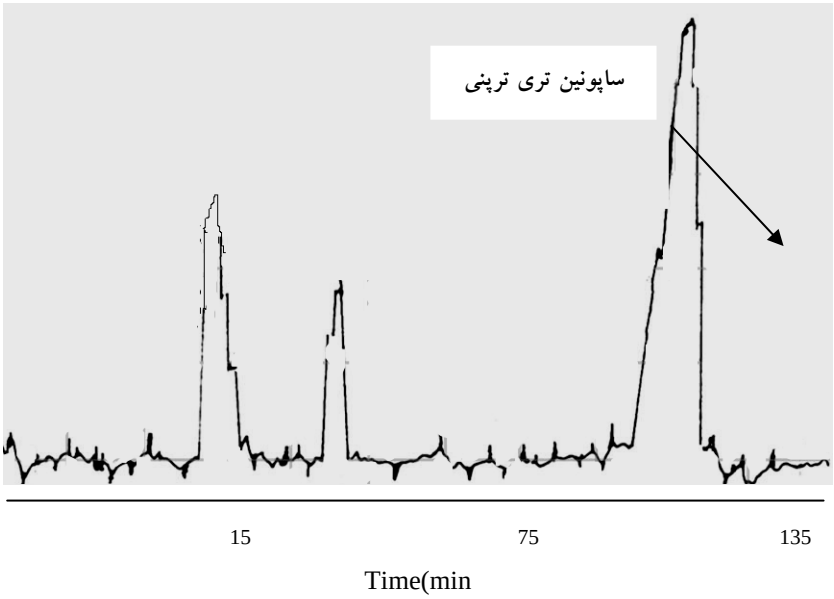
تیمارسالیسیلیک اسید (SA) بر حسب(µM)	***control***	***SA_3***	**SA_7**	***SA_{11}***
control	٤٢ ±٦/٥	٧٣ ± ٩/٤	٥٩ ± ٧/٥	١٢٢ ± ١٢/٥
Pseudomonas marginalis	٥٦ ±٧/١	٩٢ ±١١/٢	٧٩ ±٩/٨	١١٦ ±١٢/٣
Erwinia carotovora	٦٣ ±٨/٧	١٠٦ ±١١/٥	١٧١ ±١٧/٨	١٣٥ ±١٤/٧
Fusarium sambacinum	٤٨ ± ٦/٦	٦٠ ± ٧/٥	٧١ ± ٩/٣	٩٥ ± ١١/٣
Alternaria spp	٩٦±١١/٤	١٥٣ ± ١٧/٧	٨٢ ± ١٠/٦	١٤٤ ± ١٦/٧



شکل شماره ٤- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه کنترل



شکل شماره ۵- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه استاندارد



شکل شماره ٦- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه تیمار شده با سالیسیلیک اسید

منابع

- استریت، ر.، ۱۳۷۳. تشخیص بیماریهای گیاهی. ترجمه بهروز جعفر پور، ماهرخ فلاحتی رستگار. مشهد، انتشارات جهاد دانشگاه.

- زرگری، ع.، ۱۳۷۱. گیاهان دارویی. تهران، دانشگاه تهران، ج. ۳.
- Adamse, P., 1988. Mutants as an aid to the study of higher plant photomorphogenesis, PhD Thesis, Agriculture University, Wageningen, The Netherlands.
- Akinwunmi, O., 2001. The plant defense activator acibenzolar-s-methyl primes cowpea [Vigna unguiculata (L.) Walp] seedlings for rapid induction of resistance, Physiol. Mol. Plant Pathol, 58: 199-208.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R. and Lamb, C., 1994. Functions of oxidative cross-linking of cell wall structural protein in plant disease resistance, Plant Cell, 6: 1703-1712.
- Bruce, R. J. and West, C. A., 1988. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castorbean. Plant Physiol, 91: 889-897.
- Cameron, Robin k., 2000. Salicylic acid and its role in plant defense responses: what do we really know?. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56: 91-93.
- Chalker-Scott, L., 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress response, Photochemistry and Photobiology, 70: 1-9.
- Chappell, J. and Nable, R., 1987. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor, Plant Physiol, 85: 469-473
- Christie, P.J., Alfenito M.R. and Walbot, V., 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings, Planta, 194: 541-549.
- Clive, L., Sze-Chung and Nicholson, R., 1998. Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls implication for a compensatory role in the defense response, Plant Physiol, 116 : 979-989.
- Coley, P.D. and Kusar, T. A., 1996. Anti-Herbivore defences of young tropical leaves: physiological constraints and ecological tradeffs, In: SS. Mulkey, RL. Chazdon and Al. Smith eds. Tropical Forest Plant Ecophysiology. New York: Chapman and Hall, 305-335.

- Cooper-Drive, G. and Bhattacharya, M., 1998. Role of phenolics in plant evolution, Phytochemistry, 49: 1165-1174.
- Deikman J. and Hammer, P.E., 1995. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinin in Arabidopsis thaliana, Plant Physiology, 108 (1): 47-57.
- Degra, L., Salvi, G., Marrioti, D., De Lorenzo, D. and Cervone, F., 1988. A poly-galacturonase-inhibiting protein in alfalfa callus cultures, J. Plant Physiol, 133: 364-371.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L., 1995. Stress-Induced phenylpropanoid metabolism, Plant Cell, 7: 1085-1097.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman P. and Raskin, I., 1992. Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2480-2484.
- Garcia-Perez, M. D., Egea, C. and Candela, M. E., 1998. Defense response of pepper (Capsicum annuum) suspension cells to Phytophthora capsici. Physiol. Plant, 103: 527-533.
- Gershenzon, J. and Croteau, R., 1991. Terpenoids. In. GA. Rosenthal and MR. Berebaum, eds. Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites, Vol. I. The Chemical Participants, 2nd edn. San Diego: Academic Press, 165-219.
- Gould, K. S., Kuhn, D. N., Lee, D.W. and Oberbauer, S. F., 1995. Why leaves are sometimes red?. Nature, 378: 241-242.
- Hammerschmidt, 1999. Induced disease resistance how to induced stop pathogens, Physiol. Mol. Plant Pathol, 55: 77-84.
- Harrison, B.J. and Strickland, R.G., 1980. Precursors and genetic control of pigmentation V. Initiation of anthocyanin synthesis in Antirrhinum majus by Botrytis cinerea, Heredity, 44: 103-109.
- Heim, D., Nicholson, R.L., Pascholati, S.F., Hagerman A.E. and Billet, W., 1983. Etiolated maize mesocotyls: A tool for investigating disease intractions, Phytopathology, 73: 424-428 .
- Hipskind, J., Woodand, K. and Nicholson, R.L., 1996. Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to Bipolaris maydis Race O. Physiol Mol Plant Pathol, 49 : 247-256.
- Hostettman, K. A. and Marston, A., 1991. Saponins (Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK).
- Klaper, R., Frankel, S. and Berenbaum, M. R., 1996. Anthocyanin content and UV-B sensitivity in Brassica rapa, Photochemistry and photobiology, 63: 811-813.

- Kombrink, E. and Hahlbrock, K., 1990. Rapid, Systemic repression of the synthesis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small-subunit mRNA in fungus-infected or elicitor-treated potato leaves, Planta, 181: 216-219.
- Kombrink, E., Hahlbrock, K., Hinze, K. and Schroder, M., 1991. Molecular responses of potato to infection by Phytophthora infestans .In C.J. Smith. Ed, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions. Oxford University Press, Oxford, UK, 237-254
- Lee, D. W., 1986. Unusual Strategies of Light Absorption in Rain Forest Herbs. In: TJ. Givnish, ed. On the Economy of Plant Form and Function. Cambridge University Press, 105-131.
- Malamy, J. and Klessing, D.F., 1992. Salicylic acid and plant disease resistance, Plant J., 2 : 643-654.
- Maleck, K. and Lawton, K., 1998. Plant Strategies for Resistance to Pathogens. Current Opinion in Biotechnology, 9 : 208-213.
- Mars, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M. and Walbot, V. A., 1995. Glutathione S- Transferase Involved in Vacuolar Transfer Encoded by the Maize gene Bronze-2. Nature, 375: 397-400.
- Mealem- Beno, D., Tamari, G., Leitner- Dagan, Y.L., Borochov, A. and Weiss, D., 1997. Suger-dependent gibberellin- induced chalcone synthase gene expression in Petunia corollas. Plant Physiol, 113: 419-424.
- Nugroho, L. H., Verberne, M. C. and Verpoorte, R., 2001. Salicylic acid produced by isochorismate synthase and isochorismate pyruvate lyase in various parts of constitutive salicylic acid producing tobacco plants, Plant Sci, 161: 911-915.
- Nugroho, L. H., Peltenburg-Looman, A. M. G., Verberne, M. C. and Verpoorte, R., 2002. Is accumulation of sesquiterpenoid phytoalexins induced in tobacco plants constitutively producing salicylic acid?. Plant Science, 162: 989-993.
- Osbourn, A. E., 1996. Saponins and plant defence- a soap story. Trends in Plant Sci, 1:4-9.
- Osbourn, A. E., 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack, Plant Cell, 8: 1821-1831.
- Papadopoulou, K., Melton, R. E., Leggett, M., Daniels, M. J. and Osbourn, A. E., 1999. - Compromised Disease Resistance in Saponin-Deficient Plants. PNAS, 96: 12923-12928.
- Paxton, J. D., 1981. Phytopathol Z, 101: 106-109.
- Pinarosa, A. and Aldo, T., 1995. Acetylenes and terpenoids of Bellis perennis, Phytochemistry, 40: 141-147.

- Price, K. R., Johnson, I. T. and Fenwick, G. R., 1987. CRC Crit. Rev. Food. Nutr, 26: 27-133.
- Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 43: 439-463.
- Reddy, V.S., Gould, K.V., Sharma, R. and Reddy, A.R., 1994. Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in rice is associated with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis, Plant Physiol, 105: 1059-1066.
- Schonbeck, F. and Schlosser, E., 1976. In Physiological plant pathology, eds. Heitefuss, R. and Williams, P. H. (Springer, Berlin), 653-678.
- Schopke, T., Wray, V., Rzazewska, B. and Hiller, K., 1991. Bellis saponins BA1 and BA2 acylated saponins from Bellis perennis, Phytochemistry, 30: 627-631.
- Thain, J. F., Doherty, H. M., Bowles, D. J. and Wildon, D. C., 1990. Oligosaccharides that induce proteinase inhibitor activity in tomato plants cause depolarization of tomato leaf cells, Plant Cell and Enviroment, 13: 569-574.
- Tschesche, R. and Wulff, G., 1972. Chemie und biologie der saponine, Prog. Chem. Org. Nat. Prods, 30: 462-606.
- VanEtten, H. D., Manfield, J. W., Bailey, J. A. and Farmer, E. E., 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”, Plant Cell, 6: 1101-1122.
- Verberne, M. C., Verpoorte, R., Bol, J. F., Mercado-Blanco, J. and Linthorst, J. M., 2000. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes results in enhanced resistance to pathogens, Nat. Biotechnol, 18: 779-783.
- White, R. F., 1979. Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Induces Resistance to Tomato Mosaic Virus in Tobacco. Virology, 99: 410-412.
- White, R. F., Rybicki, E. P., Vonwechman, M. B., 1987. Detection of PR1-type Proteins in amaranthcaceae, chenopodiaceae, graminae and solanaceae by immunoelectrobloting, Journal of General Virology, 68: 2043-2048.
- Woltering, E.J. and Somhorst, D., 1990. Regulation of anthocyanin synthesis in cymbidium flowers: effects of emasculation and ethylene, J. Plant Physiol., 136: 295-299.
-Yamasaki, H., 1997. A function of color, Trends in Plant Science, 2: 7-8.

Vol. 21 No. (4), 553-586 (2006)

The Effect of Salicylic Acid on Some of the Secondary Metabolites (Saponins and Anthocynins) and Induction of Antimicrobial Resistance in the Medicinal Plant *Bellis perennis* L.

R. Khavari-nejad[1] and A. Asadi[1]

Abstract

Plants produce a diverse array of secondary metabolites. These compounds may be synthesized during normal growth and development and accumulating only in response to pathogen attack or stress. Interest in these molecules stems from their medicinal properties, antimicrobial activity and their likely role as determinats of plant disease resistance. Daisy *(Bellis perennis* L.*)* accumulates secondary compounds (triterpenoid saponins and anthocyanins) in response to SA and pathogens. The results of the research indicates that the amount of secondary compounds (saponins and anthocyanins) in treated plants with SA were more than in the control plants. The amount of compounds in infected plants and without SA was more than in the control plants. When infected plants were treated with SA, an increase of compounds was shown in plants. The peaks observed in HPLC and their comparision with compounds standard confirms the results mentioned above. It is concluded that SA have significantly reduced disease severity and increase the amount of secondary compounds in infected and non-infected Daisy plants.

Key words: *Bellis perennis* L., saponins, anthocyanins, salicylic acid, bactery, fungi

[1] Biology Department, Teachers Education University, Tehran, Iran

In the Name of God

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research

Director in chief: Adel Jalili
(Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands)

Chief editor: Fatemeh Sefidkon
(Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands)

Editorial Board:

Parviz Babakhanloo
MS.c., Research Institute of Forests and Rangelands

Nader Hassanzadeh
Ph.D., Research Institute and Disease

Abolghassem Matin
Ph.D., Agricultural Research Education and Extension Organization

Mohabat – Ali Naderi – Shahab
Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands

Iraj Rasooli
Ph.D., Shahed University

Parviz Owlia
Ph.D., Shahed University

Peyman Salehi
Ph.D., Shahid Beheshti University

Mohammad Reza Shams Ardecani
Ph.D., Faculty of Pharmacy, University of Medical Science, Tehran

Mahlagha Ghorbanli
Ph.D., Tarbiat Moallem University

Kamkar Jaimand
Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands

Fariborz Moatar
Ph.D., Faculty of Pharmacy, University of Medical Science, Isfahan

Mohammad Javad Rasaee
Ph.D., Tarbiat Moddares University

Gholam Reza Nabi
Ph.D., University of Tehran

Mohammad Bagher Rezaee
Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands

Fatemeh Sefidkon
Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands

Abbas Siami
Ph.D., University of Uromieh

Technical editor: Kamkar Jaimand
(Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands)

Editorial office:

Research Institute of Forests and Rangelands
P.O. Box 13185-116,Tehran, Iran.
Tel: +98 21 44195901-5 Fax: +98 21 44195907
Email: ijmapr@rifr-ac.ir

Abstracts are avilable on CABI Publishing:

www. Cabi - Publishing. org

فـــرم اشتـراک فصلنامهٔ پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

جهت اشتراک کافی است فرم اشتراک زیر را تکمیل و به همراه اصل فیش بانکی حق اشتراک قابل واریز در کلیه شعب (همنام) در ایران، به شماره حساب جاری ۱۴۳۴/۲۱ نزد بانک مرکزی وجوه درآمد مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع شعبه خزانه واریز نمایید و به نشانی دفتر مجله در تهران ارسال دارید.

نام و نام خانوادگی:

مدت اشتراک: **تاریخ شروع اشتراک:**

تلفن: **شغل:** **میزان تحصیلات:**

نشانی:

کد پستی: **صندوق پستی:**

توضیحات:.....

امضاء

حق اشتراک یکساله ۷۲۰۰۰ ریال

تهران، کیلومتر ۵ آزاد راه تهران - کرج، خروجی پیکانشهر، انتهای خیابان ۲۰ متری دوم،

بلوار مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

تهران، صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵ پست الکترونیکی: ijmapr@rifr-ac.ir

تلفن: ۵-۴۴۱۹۵۹۰۱ نمابر: ۴۴۱۹۵۹۰۷

Islamic Republic of Iran
Ministry of Jihad-e-Agriculture
Agricultural Research and Education Organization
Research Institute of Forests and Rangelands

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants

Vol. 21 No.(4), 2006

Contents

Study of Some Ecological characteristics of *Gontscharovia popovii* (B. fedtsch. & Gontsch.) Boriss. in Hormozgan Province 598
M. Soltanipoor and R. Asadpoor
Determination of Tannin contents of four Genotype of *Quercus infectoria* Olive. and use of the Gall Powder in Wound Healing 597
A. Siami, R. Heidari, R. Pakbaz and M. Aghazade
Volatile Oil Constituents of *Eucalyptus stricklandii* Maiden and *Eucalyptus erythrocory* F. Muell 596
K. Jaimand, M.H. Assareh, M.B. Rezaee and M.M. Brazandeh
Investigation of Chemical Compositions and Anti-Microbial Effects of Essential Oils of *Salvia chloroleuca* Rech. f. & Aell. and *Nepeta fissa* C. A. Mey. 595
F. Alishahi-Noorani, F. Sefidkon, M. Yoosefzadi, S. Neamati and M.Khajeh-piri
Effect of Sowing Dates in the Productivity of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) CV. soroksari 594
R. Omidbaigi, K. Sadrai Menjili and F. Sefidkon
Essential Oil Composition of *Lepidium sativum* L. 593
M. Mirza and M. Najafpour Navaei
Study of Mycorrhizal Distribution of Medicinal Plants in Tandoureh National Park 592
S. Esmaeilzadeh, H. Zare-maivan and F. Ghanati
Protective Effect of Flavonoids, Against Red Blood Cell Hemolysis *591*
S. Asgary, Gh. Naderi and N. Askari
Determination of the Best Prechilling Treatment Period and Sowing Depth for Seeds of *Dorema Ammoniacum* D. Don. in Natural Condition *590*
B. Alijanpoor, P. Babakhanlu, F. Azhir and R. Habibi
Effect of PEG Induced Water Stress on Seed Germination Characteristics of Basil (*Ocimum basilicum* L.) 589
A. Hassani
Anti-Fungal Effect of Hydroalcoholic Extract of *Echinophora playloba* DC. on *Candida albicans* 588
M. Avijgan, M. Saadat and I. karimi
The Effect of Salicylic Acid on Some of the Secondary Metabolites (Saponins and Anthocynins) and Induction of Antimicrobial Resistance in the Medicinal Plant *Bellis perennis* L. 587
R. Khavari-nejad and A. Asadi

ISSN: 1735-0905