

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر میزان ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی گیاه دارویی مینای چمنی (*Bellis perennis* L.) آلوده به قارچ و باکتری

رمضانعلی خاوری نژاد، صدیقه مهرابیان، اکرم اسدی:
دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

تعدادی از گونه‌های گیاهی ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی را به عنوان قسمتی از فرآیند طبیعی رشد و نمو شان سنتز می‌کنند. نمونه‌هایی از این گیاهان به عنوان منابع دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اهمیت این ترکیبات ناشی از خصوصیات دارویی، فعالیت ضد میکروبی و احتمالاً نقش آن‌ها به عنوان تعیین کننده‌های مقاومت گیاه در برابر بیماری است. در این پژوهش، گیاه دارویی مینای چمنی از تیره کمپوزیته، ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی خود را عمدتاً در ریشه، در پاسخ به سالیسیلیک اسید و عامل بیماری‌زا افزایش می‌دهد. نتایج حاکی از آن است که مقدار ساپونین‌ها در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید نسبت به گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و بدون آلودگی (گیاهان کنترل) افزایش پیدا کرد. همچنین مقدار ساپونین‌ها در گیاهان آلوده و بدون تیمار سالیسیلیک اسید بیش‌تر از گیاهان کنترل بود. در زمانی که گیاهان آلوده، با سالیسیلیک اسید تیمار شدند، افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار ساپونین‌ها نسبت به گیاهان کنترل مشاهده شد. همچنین قله‌های به دست آمده از نمونه‌ها به روش HPLC و مقایسه آن‌ها با ساپونین استاندارد، نتایج فوق را تأیید کرد.

مقدمه

گیاهان متابولیت‌های ثانوی گوناگونی تولید می‌کنند، تعدادی از آن‌ها می‌توانند رشد میکروب‌ها را در شرایط *in vitro* مهار کنند. این ترکیبات مهار کننده، ممکن است در طی رشد و نمو طبیعی گیاه تولید شوند (ترکیبات ضد میکروبی عمل کننده یا فیتوانتی‌سیپین‌ها) [۲۱]، [۱۸]، [۱۲]. و یا این‌که، ممکن است در گیاهان سالم حضور نداشته باشند، بلکه تنها در پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا یا تنش (فیتوآکسین‌ها) و همچنین ترکیبات دیگر مانند ترکیبات فنلی (سالیسیلیک اسید) تولید شوند [۱۴]، [۸]. به طور کلی ترکیبات ضد میکروبی گیاهان شامل، مجموعه متنوعی از ترکیبات از جمله: ساپونین‌ها، فنل‌ها، هیدروکسامیک اسیدهای حلقوی، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، ایزوفلانوئیدها، سزکونی‌ترپنوییدها، مشتقات ایندولی در بردارنده سولفور و تعدادی دیگر از ترکیبات هستند. ساپونین‌ها به عنوان یکی از متابولیت‌های ثانوی مهم، به ۳ رده اصلی تقسیم می‌شوند: ۱- گلیکوزیدهای تری‌ترپنی،

کلمات کلیدی: سالیسیلیک اسید- ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی- مینای چمنی- باکتری و قارچ

۲- گلیکوزیدهای استروئیدی^۳- گلیکوزیدهای آلکالوئیدی استروئیدی. این ترکیبات با یکی از این ساختارها و با هر ۳ ساختار در تعدادی از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند [۱۸]، [۱۶]، [۱۱]، [۵]. اهمیت این ترکیبات به این دلیل است که تعدادی از آن‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی مؤثری هستند و اغلب در مقادیر بالایی در گیاهان سالم یافت می‌شوند، این مولکول‌ها به عنوان حفاظت کننده‌های گیاهی^۱ ضد میکروبی شناخته شده‌اند [۱۸]، [۱۶]، [۱۲]، [۱۱]، [۵]. برای مثال در عصاره ریشه‌های گیاه مینای چمنی، مخلوطی از چهار ساپونین تری‌ترپنوییدی، بلیس ساپونین‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ (BA1, BA2, BA3, BA4) شناسایی شده است. و ساپونین‌های موجود به عنوان عوامل تعیین کننده، در مقاومت مینای چمنی در برابر عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۹]، [۱۵]. بنا بر این، پژوهش حاضر درصدد فراهم آوردن شرایطی است که بتوان تولید ساپونین‌های موجود در گیاه دارویی مینای چمنی را، که از ساپونین‌های تری‌ترپنوییدی است، در مواقعی که گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرد با استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید به حداکثر رساند. زیرا پژوهش‌های موجود نشان می‌دهد، زمانی که کشت‌های سوسپانسیون سلولی توتون با رها کننده‌های قارچی^۲ مجاور می‌شوند، میزان سنتز استرول‌ها و الفاکننده‌های سنتز ساپونین افزایش می‌یابد. به طوری که غالب ساختار ساپونین‌های تولید شده سزکوئی‌ترپنوییدی است [۱۰]، [۱]. اخیراً توتون تولید کننده سالیسیلیک اسید نهادی^۳ به وسیله ورود ژن-entC از باکتری اشریشیاکلی^۴ و ژن-pms از باکتری *Pseudomonas fluorescens*^۵ در گیاه توتون^۶، تولید شده است. این ژن‌ها به ترتیب کد کننده آنزیم‌های ایزوکوريسمات سنتاز (ICS) و ایزوکوريسمات پیرووات لیاز (IPL) هستند. هر دو آنزیم در تولید سالیسیلیک اسید در میکروارگانیسم‌ها نقش دارند [۱۰]، [۹]. تولید نهادی سالیسیلیک اسید، بیان ژن‌های درگیر در مقاومت اکتسابی همگانی (SAR) را افزایش داده و موجب می‌گردد، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) بطور نهادی در گیاهان تولید شوند [۲۲]. از طرف دیگر مشاهده شده، هم‌زمان با افزایش SAR و تولید پروتئین‌های PR، تولید ساپونین تنها در محل آلودگی القا می‌شود، بطوریکه این القای سریع و مؤثر در محل آلودگی موجب آسیب کمتری به گیاه می‌گردد، و در نتیجه طول عمر گیاه افزایش می‌یابد [۴]. برای مثال تولید پروتئین‌های PR توسط فیتوفوتور/کپسیسی^۷ در کشت سوسپانسیون سلولی فلفل، تجمع فیتوالکسین سزکوئی‌ترپنویید کپسیدیول را تنها در محل آلودگی القا می‌کند [۱۰]، [۳]. همین‌طور گیاهان توتون-CSA ای یافت شده‌اند، که مقاومت بیش‌تری در مقابل آلودگی‌های قارچی نشان دادند [۲۲]. بنا بر این تولید گیاهان تولید کننده سالیسیلیک اسید، که در نهایت منجر به تولید ترکیبات ضد میکروبی مفید از جمله ساپونین‌ها و افزایش مقاومت گیاه در برابر آلودگی می‌گردد، از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه خواهد بود. البته در این پژوهش شرایطی فراهم شده تا سالیسیلیک اسید، به شکل یک تیمار خارجی به گیاه داده شود، تا بتوان اثر این ترکیب را در میزان تولید

^۱ Phytoprotectants ^۲ Fungal elicitor ^۳ Constitutive salicylic acid producing (CSA)

^۴ *Escherichia coli* ^۵ *Pseudomonas fluorescens* ^۶ *Nicotiana tabacum*

^۷ *Phytophthora capsici*

سایونین‌های تری‌ترینوئیدی گیاه مینای چمنی در زمان آلودگی مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان

بعد از تهیه بذرها از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، بخش گیاهان دارویی، و ضد عفونی آن‌ها، بستر مورد نیاز برای انتقال بذرها شامل $\frac{2}{3}$ ماسه و $\frac{1}{3}$ رس تهیه شده و سپس بذرها به این سطح انتقال یافت. گلدان‌ها در مقابل پنجره قرار داده شدند و بعد از جوانه‌زنی، گلدان‌های حاوی دانمرست به اتاق کشت (بانک نوری) منتقل گردیدند. مقدار نور در طول روز نوسان داشت. در صبح مقدار نور ۲۵۸۵ لوکس بود و این مقدار افزایش می‌یافت تا اینکه به ۳۰۰۰ لوکس در میانه روز می‌رسید و این مقدار در عصر به همان مقدار نور در صبح می‌رسید. بنا براین برای به حداقل رساندن آثار میکروکلیمایی در محوطه رشد گیاه، گردش وضعی و جابجایی تصادفی گلدان‌ها به طور روزانه در دوره رشد انجام پذیرفت. از روز دهم تا بیست و پنجم حجم معینی از محلول غذایی هوگلند به ترتیب با غلظت‌های $\frac{1}{2}$ ، $\frac{1}{3}$ ، $\frac{1}{4}$ و کامل به نسبت وزن معینی از خاک به گلدان‌ها اضافه شد. از روز بیست و نهم که گیاهان در آستانه تشکیل برگ سوم بودند، تیماردهی با غلظت‌های ۷، ۳ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید آغاز شد.

زمان و روش تلقیح

میکروارگانسیم‌های مورد پژوهش به طور خالص از مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، بخش باکتریولوژی تهیه شد. سرده جنس باکتری و قارچ مورد مطالعه به ترتیب عبارتند از: *اروینیا کاروتوورا*^۱ و *آلترناریا اسپی پی*^۲. میکروارگانسیم‌های مورد آزمایش از لحاظ خالص بودن مورد بررسی قرار گرفتند. و جهت حفظ باکتری‌ها و قارچ‌ها هر پانزده روز یک بار بر روی محیط کشت جدید از سویه‌های فوق، کشت جدید تهیه می‌شد. عمل تلقیح بر طبق روش انیدی [۲] شصت روز پس از جوانه‌زنی انجام شد. در هر گیاه سطح تحتانی دو برگ با سرنگ بدون سوزن استریل زخمی شد. سپس ماده تلقیحی تهیه شده (در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری (10^8 بر میلی‌لیتر CFU) همچنین در ۱۵ میلی‌لیتر دی‌گر آب مقطر استریل یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی (10^6 بر میلی‌لیتر spore) اضافه شد و بر روی گیاه مربوطه پاشیده شد و ماده تلقیحی بر روی محل زخم با دست به آرامی مالش داده شد تا از نفوذ میکروارگانسیم مربوطه اطمینان حاصل گردد، سپس گیاهان تلقیح شده به وسیله قارچ یا باکتری به مدت ۴۸ ساعت به طور جداگانه در اتاق‌های تاریک قرار گرفتند، و بعد از این مدت به اتاق کشت جداگانه (بانک نوری) منتقل شدند. از روز اول تا روز دهم بعد از

۱-Erwinia carotovora ۲-Alternaria spp.

میلی‌گرم در میلی‌لیتر) استفاده و به ترتیب به دستگاه تزریق شد استاندارد‌ها کروماتوگرافی شدند و زمان بازداری^۱ و قله‌هایشان با یک هماهنگ کننده مدل^۲ تعیین شد. زمان بازداری، جهت شناسایی و تعیین مقدار ساپونین‌ها در یک نمونه و مقایسه آن‌ها با غلظت شناخته شده در یک نمونه استاندارد می‌باشد.

محاسبات آماری

پس از تعیین نتایج خام اولیه جهت تفسیر نتایج از محاسبات آماری استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS جهت تعیین میانگین، انحراف معیار و آنالیز واریانس دو عاملی استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی بیوشیمیایی ساپونین‌ها

سنجش مقدار ساپونین‌های کل^۳ 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 ۱).

جدول ۱- مقادیر ساپونین (X±SE) بر حسب میلی‌گرم بر گرم dw سنجش شده به روش HPLC

SA= ۱۱	SA= ۷	SA= ۳	Control	سالیسیلیک اسید پاتوژن (µM)
***۱۲۲ ± ۱۲/۵	*۵۹ ± ۷/۵	۷۳ ± ۹/۴	۴۲ ± ۶/۵	Control
***۱۳۵ ± ۱۴/۷	***۱۷۱ ± ۱۷/۸	***۱۰۶ ± ۱۱/۵	**۶۳ ± ۸/۷	<i>E.carotovora</i>
***۱۴۴ ± ۱۶/۷	***۸۲ ± ۱۰/۶	***۱۵۳ ± ۱۷/۷	***۹۶ ± ۱۱/۴	<i>Alternaria spp</i>

*=P < ۰/۰۵, **= P < ۰/۰۱, ***= P < ۰/۰۰۱

چنانچه از جدول ۱ استنباط می‌گردد، مقدار ساپونین در گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و فاقد آلودگی (گیاهان کنترل) ۴۲ میلی‌گرم 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 ۴۲ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۷۳ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۵۹ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۲۲ میلی‌گرم بر گرم برای گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری

۱-Retation time

۲-model 3396, Hewlett-Pad card

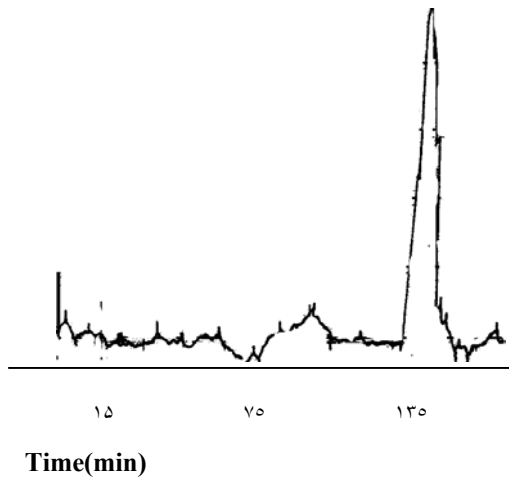
۳-Total saponins

بین گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و تیمار شده با غلظت‌های ۷ ($P < 0/05$) و ۱۱ ($P < 0/001$) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر مقدار ساپونین مشاهده گردید. و در غلظت ۳ میکرومولار تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید بر تجمع ساپونین مشاهده نشد. زمانی که گیاهان با باکتری *اروینیا کاروتوورا* آلوده می‌شوند، مقدار ساپونین در ریشه‌ها از ۴۲ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۶۳ میلی‌گرم بر گرم افزایش نشان می‌دهد. و آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده با باکتری *اروینیا* در $P < 0/01$ بر تجمع ساپونین نشان داد. اما زمانی که گیاهان آلوده با این باکتری با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در مقدار ساپونین مشاهده می‌گردد، به طوری که مقدار ساپونین از ۶۳ میلی‌گرم بر گرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۱۰۶ میلی‌گرم بر گرم برای نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۱۷۱ میلی‌گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۳۵ میلی‌گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. و با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳ ($P < 0/001$)، ۷ ($P < 0/001$) و ۱۱ ($P < 0/001$) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر تجمع ساپونین مشاهده شد.

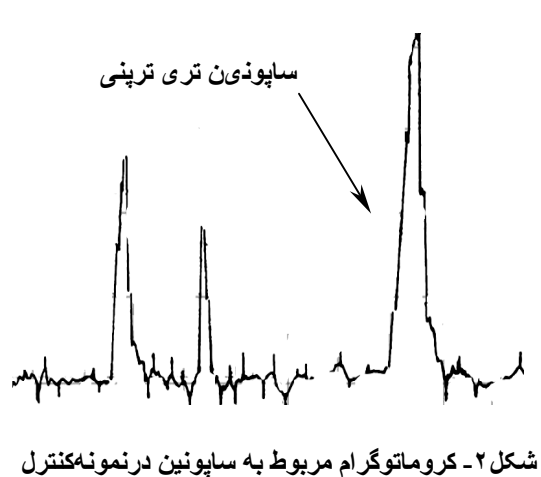
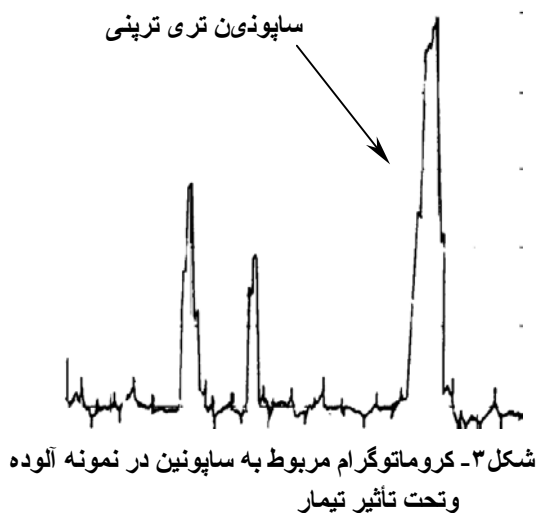
در گیاهان آلوده با قارچ *آلترناریا* پی‌پی مقدار ساپونین در ریشه‌ها از ۴۲ میلی‌گرم بر گرم در گیاهان کنترل به ۹۶ میلی‌گرم بر گرم افزایش نشان می‌دهد. و آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده با قارچ *آلترناریا* در $P < 0/001$ بر مقدار ساپونین نشان داد. در زمانی که گیاهان آلوده با قارچ *آلترناریا* با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، افزایشی در مقدار ساپونین مشاهده گردید. به طوری که مقدار ساپونین از ۹۶ میلی‌گرم بر گرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۱۵۳ میلی‌گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۱۴۴ میلی‌گرم بر گرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. اما مقدار ساپونین در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید نسبت به نمونه آلوده، تیمار نشده (۹۶ میلی‌گرم بر گرم) افزایش نشان نداد. ولی با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید در $P < 0/001$ بر تجمع ساپونین مشاهده گردید.

نمودار HPLC از ساپونین‌های تری‌ترینی، استخراج شده از گیاهان کنترل، یک قله اصلی با زمان بازداری ۱۳۴/۵ دقیقه هماهنگ با نمونه استاندارد (۱۳۵ دقیقه) نشان می‌دهد (شکل ۲). همچنین نمودار HPLC

ساپونین‌های تری‌ترینوئیدی استخراج شده از گیاهان آلوده و تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید یک قله اصلی با زمان بازداری ۱۳۴/۵ دقیقه را نشان می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۱- کروماتوگرام مربوط به ساپونین در نمونه استاندارد



بحث

نتایج حاکی از آن است که زمانی که گیاهان تیمار شده با غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید، آلوده می‌شوند، افزایش قابل توجهی در میزان تجمع ساپونین نسبت به گیاهانی که تنها با سالیسیلیک اسید تیمار شده‌اند و بدون هر گونه آلودگی هستند، نشان می‌دهند. همچنین طول عمر گیاهان آلوده تیمار شده، بیش‌تر از گیاهان آلوده تیمار نشده است. همچنین مشاهده شد بین افزایش طول عمر در این گیاهان که در اثر تیمار سالیسیلیک اسید ایجاد شد، با افزایش میزان ساپونین رابطه معنی‌داری مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده). هامرزچمید^۱ [۴] در پژوهشی که

^۱-Hammerschmidt

در مورد چگونگی عمل برخی از ترکیبات 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 می‌شود، افزایش تولید ساپونین به عنوان یکی از ترکیبات ضد میکروبی، تنها در محل آلودگی القا می‌شود، هم‌زمان با القای سریع و مؤثر ساپونین در محل آلودگی، آسیب کمتری به گیاه وارد شده و از گسترش آلودگی به گیاه جلوگیری می‌گردد، و در نتیجه طول عمر گیاه افزایش می‌یابد. زیرا تسسوکی^۱ و همکاران [۲۰] گزارش کردند فعالیت ضد میکروبی در هر دو گروه ساپونین‌های تری‌ترینوئیدی و استروئیدی وجود دارد، زیرا به محض آلودگی گیاه و خرابی بافت، آنزیم‌هایی را می‌شوند که بر روی ساپونین‌های با ساختار بی‌دسموزیدیک اثر گذاشته و آن‌ها را تبدیل به مشتقات مونودسموزیدشان می‌کنند، در نتیجه ساپونین‌ها می‌توانند، یک حالت دفاعی علیه حمله میکروبی ایجاد کنند و از گسترش بیماری جلوگیری کنند. همچنین «پاپادوپولو^۲، مالامی^۳، مالک^۴ و راسکین^۵» [۱۷]، [۱۳] [۷]، [۶]، نتایجی هم‌سو با این پژوهش گزارش کردند. آن‌ها اظهار داشتند گیاهان به دلیل ساختار غشاهایشان، مکانیسم‌های دفاعی قابل‌القای مجزایی را به منظور حفاظت خود در برابر عوامل بیماری‌زا بروز می‌دهند. برای مثال به محض تلقیح گیاهان با عوامل بیماری‌زا و استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید و یا هر ترکیب سنتتیک طبیعی دیگر، ظرفیت پاسخهای دفاعی گیاه افزایش می‌یابد و موجب می‌گردد محتوی ترکیبات ضد میکروبی آن‌ها از جمله: ساپونین‌ها، فنل‌ها، سزکوئی‌ترینوئیدها، ایزوفلانوئیدها و تعدادی دیگر از ترکیبات افزایش یابد. بنا براین به نظر می‌رسد استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید می‌تواند شرایط مناسبی در جهت افزایش تولید ساپونین در گیاه مینای چمنی در زمانی که گیاهان آلوده نیستند و همچنین زمانی که آلوده می‌شوند، فراهم کند.

منابع

1. J. Chappell and R. Nable, Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor, *Plant Physiol*, 85 (1987) 469-473.
2. A.J. Enyedi, N. Yalpani, P. Silverman and I. Raskin, Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests, *Cell*, 70 (1992) 879-886.
3. M.D. Garcia-Perez, C. Egea and M.E. Candela, Defense response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *phytophthora capsici*, *Physiol. Plant*, 103 (1998) 527-533.

۱-Tschesche
 ۴-Maleck

۲-Papadopoulou
 ۵-Raskin

۳-Malamy

4. R. Hammerschmidt, Induced disease resistance how to induced plants stop pathogens, *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 55 (1999) 77-84.
5. K.A. Hostettman and A. Marston, *Saponins* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K), (1991).
6. J. Malamy and D.F. Klessig, Salicylic acid and plant disease resistance, *Plant J*, 2 (1992) 643-654.
7. K. Maleck and K. Lawton, Plant strategies for resistance to pathogens, *Current Opinion in Biotechnology*, 9 (1998) 208-213.
8. K.O. Muller and H. Borger, Experimentelle untersuchungen uber die phytophthora-resistenz der kartoffel, *Arb. Biol. Reichsanstalt. Landw. Forstw. Berlin*, 23 (1940) 189-223.
9. L.H. Nugroho, M.C. Verberne and R. Verpoorte, Salicylic acid produced by isochorismate synthase and isochorismate pyruvate lyase in various parts of constitutive salicylic acid producing tobacco plants, *Plant Sci*, 161 (2001) 911-915.
10. L.H. Nugroho, Anja M. G. Peltenburg-Looman, M. C. Verberne and R. Verpoorte, Is accumulation of sesquiterpenoid phytoalexins induced in tobacco plants constitutively producing salicylic acid?, *Plant Science*, 162 (2002) 989-993.
11. A.E. Osbourn, Saponins and plant defence- a soap story, *Trends in Plant Sci*, 1 (1996) 4-9.
12. A.E. Osbourn, Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack, *Plant Cell*, 8 (1996) 1821-1831.
13. K. Papadopoulou, R. E. Melton, M. Leggett, M. J. Daniels and A. E. Osbourn, Compromised disease resistance in saponin-deficient plants, *PNAS*, 96 (1999) 12923-12928.
14. J.D. Paxton, *Phytopathol Z*, 101 (1981) 106-109.
15. Avato Pinarosa and Tava Aldo, Acetylenes and terpenoids of *Bellis perennis*, *Phytochemistry*, 40 (1995) 141-147.
16. K.R. Price, I.T. Johnson and G. R. Fenwick, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 26 (1987) 27-133.
17. I. Raskin, Role of salicylic acid in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 43 (1992) 439-463.

18. F. Schonbeck and E. Schlosser, In *Physiological Plant Pathology*, eds. Heitefuss, R. and Williams, P.H. (Springer, Berlin), (1976) 653-678.
19. T. Schopke, V. Wray, B. Rzażewska and K. Hiller, Bellis saponins BA1 and BA2 acylated saponins from *Bellis perennis*, *Phytochemistry*, 30 (1991) 627-631.
20. R. Tschesche and G. Wulff, *Chemie und biologie der saponine*, *Prog. Chem. Org. Nat. Prods*, 30 (1972) 462-606.
21. H.D. VanEtten, J.W. Manfield, J.A. Bailey and E.E. Farmer, Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins", *Plant Cell*, 6 (1994) 1101-1122
22. M.C. Verberne, R. Verpoorte, J.F. Bol, J. Mercado-Blanco and H.J.M. Linthorst, Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes results in enhanced resistance to pathogens, *Nat. Biotechnol*, 18 (2000) 779-783.