

بررسی خواص ضد جهش‌زایی عصاره‌های آبی - الکی گلببرگ‌های گلرنگ با استفاده از آزمون ایمز

علی خیری^{۱*}، هانیه محجل شجا^۱ و منصور سراجوقی^۲

^۱ ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی گیاهی

^۲ ایران، کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۵

چکیده

امروزه سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در جهان است و مواد جهش‌زا عامل مرگ میلیون‌ها بیمار سرطانی هستند. با توجه به عوارض جانبی داروها در درمان سرطان، پژوهش‌های بسیاری برای دست‌یابی به داروهایی با عوارض کمتر در حال گسترش است. این مطالعه، با هدف ارزیابی اثر ضد جهشی عصاره‌های مختلف آبی و الکی گلببرگ‌های گلرنگ در شرایط تنش خشکی و طبیعی در برابر ماده‌ی جهش‌زای آزیدس‌دیم، با استفاده از آزمون ایمز در غیاب و حضور میکروزوم‌های کبدی موش (S9) انجام گرفت. علت استفاده از میکروزوم کبدی در این آزمایش فعال کردن برخی مواد جهش‌زاو سرطان‌زاست چرا که بسیاری از این ترکیبات برای بروز ویژگی‌های جهش‌زایی یا سرطان‌زایی باید از نظر متابولیسمی (اکسیداتیو یا احیایی) فعال شوند و از آن‌جا که باکتری سالمونلا قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا یک عصاره استریل میکروزمی از بافت پستانداران را می‌توان به تست جهش‌زایی اضافه کرد. اختلاف بین متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در ارتباط با ماده‌ی جهش‌زا، توسط نرم‌افزار SPSS و با آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه (ANOVA) تجزیه و تحلیل گردید. نتایج نشان داد که عصاره‌های اتانولی گلببرگ‌ها در شرایط تنش و عصاره آبی در شرایط طبیعی به ترتیب با درصد بازدارندگی ۹۰٪ و ۴۸٪ بیشترین و کمترین اثر ضد جهشی را دارند. نتایج حاصل از بکارگیری مخلوط میکروزمی و یافته‌های مطالعات پیشین نشان می‌دهد که گیاه برای مقابله با آثار تنش تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان خود را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آزمون ایمز، آنتی‌اکسیدان، تنش خشکی، سالمونلا تیفی‌موریوم، گلرنگ

*نویسنده مسئول: علی خیری، تلفن: ۰۹۳۶۴۰۱۳۴۹۹ پست الکترونیکی: alikhairi61@gmail.com

مقدمه

جمله‌گونه‌های اکسیژن واکنشگر (ROS: Reactive Oxygen Species) اثر تخریبی خود را نشان می‌دهند. به عنوان مثال پراکسید شدن زنجیره‌های جانبی در غشاهای بیولوژیک که تحت تاثیر اکسیژن‌های واکنشگر روی می‌دهد اثر مخربی بر عملکرد نفوذپذیری آن دارد و با تولید ترکیباتی سمی نظیر استال‌دئید سبب آسیب به مولکول‌های بیولوژیک مثل DNA و RNA می‌شود (۳). موادی که بعنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند، می‌توانند آثار زیان‌بار

از زمان‌های گذشته تا به امروز گیاهان به عنوان یکی از مهمترین منابع غذایی و دارویی به شمار می‌رفته‌اند تا جایی که امروز حتی امروزه بیش از ۸۰٪ افراد غالباً به درمان‌های سنتی اعتقاد دارند. در واقع بسیاری از درمان‌های رایج امروزی کاملاً یا به طور جزئی درون مایه‌ی طبیعی دارند (۱). سرطان پس از بیماری‌های قلبی، دومین عامل مرگ و میر در جهان محسوب می‌شود. بسیاری از مواد جهش‌زا و سرطان‌زا از طریق رادیکال‌های آزاد از

دارند و به این دلیل ما از عصاره های برگ این گیاه برای بررسی اثر ضدجھشی استفاده می کنیم (۱۳). مشخص شده است که اسید گالیک مهم ترین جزئی ترکیبات فنولی گل های گلرنگ می باشد (۲۳). سایر ترکیبات اصلی شامل اسید کلروژنیک، اسید سیرینجیک، تری هیدرات روتین و نفتوروزوسینول نیز می شوند. با بررسی روند تغییرات ترکیبات فنولی در طول دوره رشد گلرنگ نشان داده شده است که گل های این گیاه می توانند به عنوان منبع مناسبی از ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار گیرند (۲۳). به دلیل وجود مقادیر بسیار بالای ترکیبات آنتی اکسیدان و ضدالتهابی در روغن گلرنگ میتوان این روغن را جایگزین روغن هایی چون آفتابگردان نمود که در شرایط گرم و خشک و کم آبی آسیب می بینند (۲۷). از آنجا که متداول ترین روش در بررسی اثرات ضدجھشی و ضدسرطانی آزمون ایمز با بکارگیری باکتری های دارای جھش خاص و تاثیر مواد مورد نظر همراه با مواد جھش زا بر باکتری های ذکر شده می باشد (۱۷)، پژوهش حاضر نیز به بررسی تجربی اثر ضدجھشی عصاره های مختلف آبی و الکلی گلبرگ های گلرنگ در شرایط تنش خشکی و آبیاری طبیعی بر باکتری های جھش یافته *Salmonella typhimurium* در مقابل ماده جھش زای سدیم آزید با استفاده از روش ایمز پرداخته است.

مواد و روشها

کشت گیاه و تنش خشکی: این مطالعه تجربی در بهار ۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج (عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۴۳ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۴۹ دقیقه شرقی) به ارتفاع ۱۱۷۴ متر بالاتر از سطح دریا انجام شد. آزمایش روی رقم گلرنگ پائیزه (گلدشت) بصورت کرت های خرد شده در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار طراحی و تیمارهای تنش در کرت های اصلی قرار گرفتند و اولین آبیاری پس از کاشت انجام شد. آبیاری های بعدی بر اساس شرایط

ROS را کاهش دهند. بنابراین عدم تعادل بین آنتی اکسیدان ها و عوامل اکسید کننده که به تنش اکسایشی معروف است منجر به لطمات فیزیولوژیکی می شود که با سرطان، پیری، تصلب شرائین و آسیب های التهابی ارتباط دارد (۴). با توجه به اینکه محیط اطراف ما مملو از مواد سرطان زاست، این عوامل قادرند با تغییر در توالی نوکلئیک اسیدهای DNA سبب القای جھش و بروز سرطان شوند. مواد جھش زا گاهی سبب آسیب به سلول های بنیادی جنینی و جھش قابل توارث از نسلی به نسل دیگر می شوند. بدیهی است که دسترسی به روش ارزان، آسان و سریع برای شناسایی مواد جھش زا از اهمیت ویژه ای برخوردار است و استفاده از گیاهان و فراورده های آن ها در این راه می تواند یکی از بهترین گزینه ها باشد (۲۳). گلرنگ گیاهی یک ساله با نام علمی *Carthamus tinctorius* L. می باشد که به دلیل قدرت سازگاری بالا با شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی و شوری و نیز دارا بودن دانه های روغنی در اکثر مناطق جهان کشت می شود. همچنین گل های آن به عنوان منبع رنگ و دارو در طب سنتی و گیاهی کاربرد دارد (۵). در مطالعات انجام شده در رابطه با خصوصیات آنتی اکسیدانی ترکیبات کنجاله حاصل از روغن گیری دانه گلرنگ هفت ترکیب از مشتقات سروتونین را با خاصیت آنتی اکسیدانی قوی شناسایی شده است (۲۸). این ترکیبات جزو گروه آمیدهای اسید اندول هیدروکسی سینامیک محسوب می شود و در شرایط *in vitro* از قدرت آنتی اکسیدانی بالایی برخوردار هستند و اثرات بیولوژیک مختلفی بر وضعیت لیپیدها در پلاسما و کبد بروز می دهند (۴). از گل های گلرنگ بیش از ۲۰۰ ترکیب جداسازی و شناسایی شده اند که عمده آن ها از فلاونوئیدهای گروه کالکون هستند. این ترکیبات رنگدانه های طبیعی هستند که از اهمیت تجاری برخوردارند. ترکیبات فنولی با خواص آنتی اکسیدانی قوی که از متابولیت های ثانویه در این گیاه هستند در اندام های مختلف این گیاه به ویژه به مقادیر بیشتر در گل ها وجود

شده توسط مارون و ایمز (۱۷) انجام شد. عدم آلودگی فرآورده با افزودن ۵۰ میکرولیتر از مخلوط S9 به محیط‌های کشت تاپ آگار و ریختن آن روی محیط گلوکز آگار حداقل انجام شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و از استریل بودن مخلوط تهیه شده اطمینان بعمل آمد و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون ضد جهش زایی: آزمون ضد جهشی بر اساس آزمون سالمونلا/ میکروزوم شرح داده شده توسط مارون و ایمز و نیز آزمون تغییر داده شده توسط مورتلانز و زابگر انجام گرفت (۱۷ و ۱۸). روش کار با استفاده از طی کردن ۱۰ دقیقه دوره‌ی پیش انکوباسیون در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از سوش‌های باکتری رشد داده شده (کشت شبانه‌ی ۲۴ ساعته) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی استریل و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی استریل و ۱۰۰ میکرولیتر عامل جهش‌زا در لوله‌های استریل تاپ آگار انجام گرفت. در همه‌ی آزمایشات برای شاهد-های منفی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و برای شاهد-های مثبت ۱۰۰ میکرولیتر آزید سدیم اضافه شد. بمنظور انجام چند چرخه‌ی تقسیم سلولی و ایجاد یک زمینه‌ی رشد باکتریایی که با چشم غیر مسلح قابل رویت و شمارش باشد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ میلی مولار هیستیدین/بیوتین به هر لوله اضافه شد. پس از ریختن محتویات لوله‌های تاپ آگار بر روی پلیت‌های گلوکز آگار حداقل و نگهداری ۴۸ ساعته در دمای ۳۷ درجه انکوباتور، تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت شمارش شد.

محاسبات آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن و در سطح آماری ۵٪ انجام شد. اختلاف بین متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در ارتباط با ماده‌ی جهش‌زا، توسط نرم‌افزار SPSS و با آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه (ANOVA) تجزیه و تحلیل گردید.

طبیعی و تنش انجام شد که در شرایط طبیعی پتانسیل آب در خاک ۳ بار و در شرایط تنش ۶ بار بود. البته تا مرحله ساقه دهی روی تمام تیمارها به صورت هفتگی آبیاری انجام شد ولی در آغار مرحله گلدهی اعمال تنش انجام شد و آبیاری طبیعی به صورت هفتگی و کم آبیاری (تنش) دو هفته یک بار بود.

عصاره گیری از گلبرگ‌ها: بمنظور استخراج عصاره، ۳۰ گرم گل خشک آسیاب شده از هر نمونه شاهد بدون تنش با آبیاری طبیعی و تحت تنش به ۳۰۰ میلی لیتر اتانول، متانول و آب اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر هم زده شد. سپس مخلوط صاف شده و عمل استخراج یک بار دیگر بر روی تفاله‌ها انجام شد. دو عصاره حاصل با هم مخلوط شده و در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد در دستگاه تبخیر گردان Heidolph مدل Laborota 4003 تغلیظ شدند. در نهایت عصاره در آون خلا Labtech مدل L 70-2030 ساخت کره جنوبی و در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به دمای ثابت خشک شدند. پودر حاصل تا زمان انجام آزمایشات لازم در دمای یخچال نگهداری شد (۹).

باکتری مورد استفاده و تایید جهش: مواد استفاده شده در این مطالعه‌ی از شرکت مرک آلمان تهیه شد و از آزیدسدیم بعنوان ماده‌ی جهش‌زا استفاده شد. سوش باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم TA100 پس از تایید جهش مورد استفاده قرار گرفت. جهت تایید جهش در سوش از کشت شبانه‌ی نوترینت برات استفاده شد. سویه‌های *Salmonella typhimurium* دارای یک نقص یا جهش در ژن ترمیم در برابر پرتو فرابنفش (uvrB) بوده دارای حساسیت به کریستال ویوله بوده و قادر به سنتز پروتئین دیواره‌ی سلولی نیستند (rfa). هم چنین سوش‌ها برای حضور فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین بررسی شدند. این فاکتور یک شناساگر متداول است که می‌تواند حضور پلاسمید فاکتور R را نشان دهد. تهیه‌ی مخلوط S9 مطابق روش شرح داده

دارد. هم‌چنین در بین عصاره‌های مختلف تنش، عصاره‌ی اتانولی در شرایط تنش با ۹۰ درصد بیشترین اثر ضد جهشی و عصاره‌ی آبی در شرایط طبیعی با ۴۸ درصد کمترین اثر ضد جهشی را در بین عصاره‌های مختلف داشتند. جداول ۱ و ۲، به ترتیب نتایج حاصل از تنش و طبیعی را بر روی ماده‌ی جهش‌زای آزید سدیم نشان می‌دهد.

نتایج این آزمایش به روشنی نشان داد که کلیه‌ی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی گلبرگ‌های گلرنگ دارای اثر ضد جهشی قوی بر علیه آزید سدیم بودند و با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از عصاره‌ها در شرایط تنش و طبیعی مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین عصاره‌های تحت تنش و طبیعی وجود دارد که نشان از تاثیر ضد جهشی بیشتر عصاره‌ها در این شرایط دارد. هم‌چنین در بین عصاره‌های مختلف تنش، عصاره‌ی اتانولی با ۹۰ درصد بیشترین اثر ضد جهشی و عصاره‌ی آبی طبیعی با ۴۸ درصد کمترین اثر ضد جهشی را در بین عصاره‌های مختلف داشتند. از سوی دیگر مشخص شد که در بین عصاره‌های مختلف، عصاره‌ی اتانولی در شرایط تنش به دلیل حضور ترکیبات موثر آنتی‌اکسیدان در گلبرگ‌ها و حل شدن بهتر آن‌ها در اتانول است.

بحث و نتیجه‌گیری

گلرنگ عضوی از تیره کمپوزیته محسوب می‌شود که عمدتاً بعنوان دانه روغنی و خوراک پرندگان کشت می‌شود. در مطالعه خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات کنجاله حاصل از روغن‌گیری دانه گلرنگ هفت ترکیب از مشتقات سروتوین را با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی در آن شناسایی شده است (۲۸). این ترکیبات در گروه آمیدهای اسید اندول هیدروکسی سینامیک محسوب می‌شود و گزارش شده است از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی در شرایط *in vitro* برخوردار هستند و اثرات بیولوژیکی مختلفی از خود بر وضعیت لیپیدها در پلاسما و کبد بروز می‌دهند (۲۳).

جهت اطمینان از درستی نتایج، برای هر ماده پلیت‌های سه‌گانه در نظر گرفته شد. با توجه به تعیین حدود اطمینان و معنی‌داری در ارتباط با سوش مورد نظر و عصاره‌های اتانولی ماده‌ی مورد آزمون، با $P \leq 0.05$ از درستی نتایج آزمون‌ها در حضور ماده‌ی جهش‌زای مورد استفاده اطمینان حاصل گردید. آزمون ضد تومورزایی مطابق با روش ضد-جهشی در حضور مخلوط میکروزومی کبد موش (S9) انجام شد (۱۱). اثر جهش‌زایی آزید سدیم در غیاب نمونه‌های مورد آزمایش به صورت ممانعت ۱۰۰ درصد یا ۰ درصد تعیین شد. محاسبه‌ی درصد بازدارندگی مطابق رابطه‌ی زیر انجام شد:

$$S = \left(1 - \frac{T}{M}\right) * 100$$

که در آن T، تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در حضور عامل ضد جهش، S درصد بازدارندگی از جهش و M تعداد کلنی‌های برگشتی در هر یک از پلیت‌های کنترل مثبت می‌باشد (تعداد کلنی‌های برگشتی خود بخودی در کنترل منفی باید از صورت و مخرج کسر کاسته شود). بر اساس تحقیقات انگ، هنگامی که درصد بازدارندگی بین ۴۰-۲۵ درصد باشد اثر ضد جهشی نمونه‌ی آزمایشی متوسط تلقی می‌شود و مادامی که درصد بازدارندگی بیش از ۴۰ درصد باشد، اثر ضد جهشی نمونه قوی است و در صورتی که کمتر از ۲۵ درصد باشد اثر ضد جهشی نمونه ضعیف می‌باشد (۲۰).

نتایج

نتایج این آزمایش روشنی نشان داد که کلیه‌ی عصاره‌های اتانولی گلبرگ‌ها دارای اثر ضد جهشی قوی بر علیه آزید سدیم بودند و با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از عصاره‌های شاهد و تنش خشکی مشخص شد که تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین عصاره‌های شاهد و تنش خشکی وجود دارد که نشان از تاثیر ضد جهشی بیشتر و ساخت بیشتر مواد آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش خشکی

جدول ۱- ارزیابی اثر ضدجهشی عصاره گلبرگ های گلرنگ در شرایط آزمایشگاه بر روی آزید سدیم با استفاده از سوش باکتری *Salmonella typhimurium* در غیاب و حضور عصاره‌ی کبدی موش (S9)

(+S9)TA100 <i>Salmonella typhimurium</i>				(-S9)TA100 <i>Salmonella typhimurium</i>				تنش خشکی
میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی (انحراف معیار)	درصد جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی (انحراف معیار)	درصد جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی (انحراف معیار)	درصد جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی (انحراف معیار)	درصد جهش	
۳)۲۲	-	۳)۲۲	-	۳)۲۲	-	۳)۲۲	-	شاهد منفی
۱۴۲)۱۶/۶۲	-	۱۴۲)۱۶/۶۲	-	۱۴۲)۱۶/۶۲	-	۱۴۲)۱۶/۶۲	-	شاهد مثبت
۷۲)۱۱/۵۳	۵۷	۷۲)۱۱/۵۳	۶۴	۶۹)۱۶/۰۹	۵۷	۶۹)۱۶/۰۹	۶۴	عصاره‌ی آبی تنش
۶۵)۴/۲۶	۶۴	۶۵)۴/۲۶	۶۶	۶۸)۶/۲۲	۶۴	۶۸)۶/۲۲	۶۶	عصاره‌ی متانولی تنش
۳۶)۱۱/۵۶	۸۸	۳۶)۱۱/۵۶	۹۰	۳۱)۱۶/۵۳	۸۸	۳۱)۱۶/۵۳	۹۰	عصاره‌ی اتانولی تنش

جدول ۲- ارزیابی اثر ضدجهشی آبیاری طبیعی در شرایط آزمایشگاه بر روی آزید سدیم با استفاده از سوش باکتری *Salmonella typhimurium* در غیاب و حضور عصاره‌ی کبدی موش (S9)

(+S9)TA100 <i>Salmonella typhimurium</i>				(-S9)TA100 <i>Salmonella typhimurium</i>				آبیاری طبیعی
میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی (انحراف معیار)	درصد جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی (انحراف معیار)	درصد جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی (انحراف معیار)	درصد جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی (انحراف معیار)	درصد جهش	
۲)۲۲	-	۲)۲۲	-	۲)۲۲	-	۲)۲۲	-	شاهد منفی
۱۴۲)۱۶/۶۲	-	۱۴۲)۱۶/۶۲	-	۱۴۲)۱۶/۶۲	-	۱۴۲)۱۶/۶۲	-	شاهد مثبت
۷۴)۵/۲۹	۴۸	۷۶)۷/۲۱	۴۸	۷۴)۵/۲۹	۴۸	۷۴)۵/۲۹	۴۸	عصاره‌های آبی طبیعی
۶۴)۳/۶۱	۶۷	۶۵)۹/۱۸	۶۷	۶۴)۳/۶۱	۶۷	۶۴)۳/۶۱	۶۷	عصاره‌های متانولی طبیعی
۵۵)۱/۷۳	۷۸	۵۲)۱۲/۷۶	۷۸	۵۵)۱/۷۳	۷۸	۵۵)۱/۷۳	۷۸	عصاره‌های اتانولی طبیعی

گیاه می‌تواند بعنوان منبعی غنی از ترکیبات زیست‌فعال مورد استفاده قرار گیرند (۲۳).

تحقیقات نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی می‌توانند از انتشار واکنش‌های رادیکال‌های آزاد جلوگیری نمایند (۲۳). بخش عمده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌ها و سبزیجات از ترکیباتی نظیر فلاونوئیدها، ایزوفلاون‌ها، فلاون‌ها، آنتوسیانین‌ها، کاتشین‌ها و ایزوکاتشین‌ها ناشی می‌شود (۲۴). مشخص شده است که تحت تاثیر تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی یا تیمار با ترکیبات مختلف از جمله سالیسیلیک اسید میزان تجمع ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله ترکیبات فنولی در میوه و

از گل‌های گلرنگ بیش از ۲۰۰ ترکیب شناسایی و جداسازی شده‌اند که عمده آن‌ها از فلاونوئیدهای گروه کالکون تشکیل شده‌اند. این ترکیبات رنگدانه‌ای هستند که از اهمیت تجاری برخوردارند (۵). در مطالعات انجام شده اسید گالیک بعنوان مهم‌ترین جزء ترکیبات فنولی گل‌های گلرنگ شناسایی شده و سایر ترکیبات اصلی نیز شامل اسید کلروژنیک، اسید سیرینجیک، تری‌هیدرات روتین، کوئرستین-۳-گالاکتوزید و نفتوروزوسینول نیز گزارش شده است. هم‌چنین با بررسی روند تغییرات فنولی در طول دوره رشد گلرنگ نشان دادند گل‌های این

به تست جهش‌زایی استفاده کرد. میکروزوم‌ها حفره‌های غشایی کوچکی هستند که در یاخته‌های زنده و سالم دیده نشده و نتیجه تکه تکه شدن قسمت‌هایی از سیستم غشایی درون یاخته‌ای و نیز شکسته شدن لوله‌ها و کیسه‌های شبکه اندوپلاسمی می‌باشند (۲).

بررسی‌ها نشان می‌دهند که سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان مولکول‌های آنتی‌اکسیدان نظیر آلفا-توکوفرول و آسکوربیک اسید و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و هم‌چنین محتوای ترکیبات فنولی در دو واریته گلرنگ موثر است (۱۰). هم‌چنین در شرایط تنش خشکی میزان این ترکیبات آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد که می‌تواند به دلیل افزایش توان جذب گونه‌های اکسیژن‌فعال توسط این عوامل آنتی‌اکسیدان باشد. سیستم آنتی‌اکسیدانی این گیاه سبب کاهش میزان گونه‌های اکسیژن‌فعال نظیر هیدروژن پراکسید و آنیون‌های سوپراکسید می‌شود که میزان سنتز آن‌ها تحت شرایط تنش‌های محیطی نظیر تنش خشکی افزایش می‌یابد. اثرات تنش خشکی در شرایط آب‌کشت بر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان برگ‌ها و گلبرگ‌های گلرنگ نشان داده است که شوری و تنش خشکی می‌تواند سبب افزایش میزان ترکیبات فنولی و آسکوربیک اسید گردد (۱۵). ضمن بررسی میزان ترکیبات پلی‌فنولی در ارتباط با فعالیت جذب رادیکال‌های آزاد در بخش‌های مختلف گلرنگ مثل عصاره‌های برگ و گلبرگ مشخص شد که بین فعالیت جذب رادیکال‌های آزاد و محتوای فنولی در عصاره‌های مختلف گلبرگ و برگ ارتباط معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود دارد (۹). فلاونوئیدهای گلبرگ‌های گلرنگ بخش اصلی عصاره‌های استخراج شده از گلبرگ‌ها هستند که فعالیت موثری در جذب رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اثرات جهش‌زایی آن‌ها دارند (۸). سه ترکیب فلاونولی از گلبرگ‌های گلرنگ جداسازی شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی بر علیه رادیکال‌های آزاد نشان می‌دهند (۲۶). نتایج این پژوهش به

بخش‌های مختلف گیاه انگور افزایش یابد که در این پژوهش نیز تیمار تنش خشکی سبب افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدان در عصاره‌های مختلف تحت تنش خشکی شد (۱۹).

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گل‌های رقم گلدشت با استفاده از تست ایمز مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. با توجه بوفور گل‌های گلرنگ به عنوان محصول جانبی این گیاه در صنعت تولید روغن، استخراج ترکیبات موثره از آن می‌تواند به افزایش ارزش افزوده گلرنگ و نیز تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضدباکتریایی طبیعی برای استفاده در مواد غذایی و ترکیبات دارویی کمک کند. با توجه به اینکه بر اساس نظر انگ‌زمانی که درصد مهار جهش بیش از ۴۰ درصد باشد، اثر ضدجهشی نمونه قوی است در این بررسی نیز عصاره‌های مختلف الکلی و آبی در شرایط طبیعی و تنش خشکی با اثر ضد جهشی بالای ۴۰ درصدی اثر ضدجهشی در سطح بالا را نشان دادند. در مطالعه‌ی ما عصاره‌ی اتانولی در شرایط تنش خشکی با ۹۰٪ اثر بازدارندگی نشان داد که قوی‌تر از شرایط طبیعی و همچنین دیگر عصاره‌های الکلی و آبی این گیاه بود که با مطالعات محققین دیگر همسویی داشت (۵). مشخص شده است که تیمار با عصاره‌های استخراج شده از آلوئه‌ورا و دیگر گیاهان که دارای ترکیبات فلاونوئیدهای فراوان است، باعث کاهش اندازه‌ی تومور و فراوانی متاستاز در مراحل مختلف پیشرفت تومور بدون تاثیر عمده بر رشد تومور می‌گردد (۶). در این تحقیق نیز با اضافه نمودن عصاره میکروزوم کبد موش اثر ضدسرطانی قوی مشاهده شد. علت استفاده از میکروزوم کبدی در این آزمایش فعال کردن برخی مواد جهش‌زاو سرطان‌زاست چرا که بسیاری از این ترکیبات برای بروز ویژگی‌های جهش‌زایی یا سرطان‌زایی باید از نظر متابولیسمی (اکسیداتیو یا احیایی) فعال شوند و از آن‌جا که باکتری *Salmonella* قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا یک عصاره استریل میکروزومی از بافت پستانداران را می‌توان

دادند که در مقایسه با همین عصاره‌ها در شرایط آبیاری طبیعی می‌توان نتیجه گرفت که علاوه بر انحلال پذیری بیشتر این ترکیبات در عصاره‌های اتانولی بیانگر سنتز بیشتر این ترکیبات در شرایط تنش کم آبی می‌باشد. بین برگ، دانه و گل فراوان‌ترین ترکیب آنتی‌اکسیدانی در گل‌ها گزارش شده است و در بین عصاره‌های مختلف آبی و اتانولی، عصاره‌های اتانولی بیشترین فعالیت در به دام انداختن رادیکال‌های آزاد را با ۸۷٪ فعالیت از خود نشان دادند (۱۶). با توجه به تنوع رنگدانه‌ها و مواد موثر در فعالیت ضد جهشی پیشنهاد می‌شود با روش‌های بیوشیمیایی ضمن استخراج آن‌ها تاثیر هر یک از این مواد بررسی شود. هم‌چنین می‌توان در سویه‌های مختلف گلرنگ نیز مواد موثر در این فرایند را بررسی کرد.

جمع بندی

با توجه به بررسی‌های انجام شده در این تحقیق می‌توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از عصاره‌های مختلف گلبرگ‌های گیاه گلرنگ در شرایط آبیاری طبیعی و بویژه در شرایط تنش خشکی که در آن گیاه برای مقابله با عوامل تنش‌زا سنتز ترکیبات مختلف آنتی‌اکسیدانی به ویژه فلاونوئیدها و رنگدانه‌های دارای خواص آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد، می‌تواند به عنوان یکی از راه‌های کم‌هزینه و موثر در کاهش آثار تنش‌های محیطی و اثرات جهش‌زایی عوامل تنش‌زای محیطی در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از رساله دکتری آقای علی خیری دانشجوی دکتری تکوین گیاهی دانشگاه تبریز می‌باشد و هزینه‌های انجام آن بصورت شخصی تامین شده است. نویسندگان این مقاله از آقای دکتر عرب زاده که در مطالعات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها زحمات زیادی انجام دادند و هم‌چنین پرسنل محترم و زحمتکش مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ازاد اسلامی واحد کرج که در تمام

روشنی نشان داد که در بین عصاره‌های مختلف، عصاره اتانولی با تاثیر ۹۰ درصد در شرایط تنش بهترین عصاره است که دلیل حضور ترکیبات موثر آنتی‌اکسیدان در گلبرگ‌ها و حل شدن بهتر آن‌ها در اتانول است که این نتایج در توافق با یافته‌های دیگر دانشمندان است (۲۷). هم‌چنین این یافته‌ها در توافق با نتایج قبلی نشان می‌دهد که افزایش جذب رادیکال‌های آزاد توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان گلبرگ‌های این گیاه سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار اثرات جهش در باکتری شده است (۸). عصاره‌های مختلف متانولی گلبرگ‌های گلرنگ به طرز معنی‌داری اثرات آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهد و عصاره‌های متانولی گلبرگ‌های گلرنگ در سطح کمتر از ۵ درصد اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهند و این اثرات قوی آنتی‌اکسیدانی مربوط به ۴ ترکیب فنولی مختلف در این عصاره‌هاست که با تکنیک HPLC مشخص شد که گالیک اسید مهم‌ترین و موثرترین ترکیب در رقم‌های مورد مطالعه آن‌ها بود. می‌توان عصاره‌های گلبرگ‌های گلرنگ را بعنوان یک منبع طبیعی جایگزین ترکیبات فعال زیستی مصنوعی نمود (۱۳). فعالیت آنتی‌اکسیدانی رقم‌های گلرنگ عمدتاً مربوط به فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات پلی‌فنولی آن است. در پژوهش‌های انجام شده مشخص شد که ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در اندام‌های هوایی سبب افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف الکلی در گیاه خاکشیر می‌شود و در پژوهش حاضر نیز مشخص شد که عصاره‌های مختلف گلرنگ بویژه در شرایط تنش خشکی فعالیت ضد جهشی معنی‌داری نشان می‌دهند که مربوط به تجمع ترکیبات فلاونوئیدی در گلبرگ‌های این گیاه است (۲۵). عصاره‌های مختلف الکلی (متانولی و اتانولی) استونی، دی‌اتیل‌تری و اتیل‌استات به میزان زیادی برای انحلال و جداسازی فلاونوئیدها استفاده می‌شود (۷). در مطالعه ما نیز عصاره‌های اتانولی گلبرگ‌های گلرنگ بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در شرایط تنش کم آبی نشان

مراحل کشت و نمونه‌گیری گلرنگ همراه ما بودند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

- Bae SH. and Suh, HJ. 2007. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea, LWT Food Science and Technology, 40(6): 955-962.
- Bathini M., Goto S., Tian H., Ando F., Fukuhara M., Watanabe I. 2002. Mutagenicity of 1,3-Butadiene, 1,4-Pentadiene-3-ol, Isopren, 2,4-Hexadiene, cis and transpiperylene, Envi-Iron. Health Perspect, 3: 73-78.
- Bedi M.K., Shenefelt P.D. 2002. Herbal therapy in dermatology, Arch Dermatology, 138: 16-28.
- Cao G., Booth S., Sadowski J. and Prior R. 1998. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diet rich in fruit and vegetables, American Journal of Clinical Nutrition, 68(5): 1081-87.
- Ekin Z. 2008. Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: A global view, Journal of Agronomy, 4(2): 83-87.
- Gribel N.V., Pashinskii V.G. 1986. Anti-metastatic Properties of *Aloe vera* Juice, Vopour Oncology, 32(12): 38-40.
- Hajimehdipoor H., Mokhtari-Kondori B., Amin G.R., Adib N., Rastegar H. and Shekarchi M. 2012. Development of a validated HPLC method for the simultaneous determination of flavonoids in *Cuscuta chinensis* Lam. by ultra-violet detection. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 20: 57-60.
- Han S.Y., Li H.X., Bai C.C., Wang L. and Tu P.F. 2010. Component analysis and free radical-scavenging potential of Panax notoginseng and *Carthamus tinctorius* extracts. Chemistry & Biodiversity, 7(2), 383-391.
- Harbone Ch.B. 1997. Methods of chemical analysis. Tehran: Tehran university publication, p:140-175.
- Hiramatsu M., Takahashi T., Komatsu M., Kido T. and Kasahara Y. 2009. Antioxidant and neuroprotective activities of Mogami-benibana (*Carthamus tinctorius* L.). Neurochemical Research, 34(4), 795-805.
- Hojjati M., Modarres-Sanavy S. A. M., Karimi M. and Ghanati F. 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. Acta Physiologiae Plantarum, 33(1), 105-112.
- Horn R.C., Vargas V.M.F. 2003. Anti mutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella / microsome assay Mutagenesis, 18(2):113-118.
- Jiang J.S., Xia P.F., Feng Z.M., Zhang P.C. 2008. Chemical constituents from flowers of *Carthamus tinctorius*. Chinese Materia Medica. Edit Zhongguo yao xue hui. Beijing, 33(24): 2911-2913.
- Karimkhani M.M., Shaddel R., Khodaparast M.H.H., Vazirian M. and Piri-Gheshlaghi Sh. 2016. Antioxidant and antibacterial activity of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) extract from four different cultivars. Quality Assurance and Safety of Crop & Foods. 8(4), 565-574.
- Karray-Bouraooui, N., Harbaoui, F., Rabhi, M., Jallali, I., Ksouri, R., Attia, H., Msilini, N. and Lachaâl, M. 2011. Different antioxidant responses to salt stress in two different provenances of *Carthamus tinctorius* L. Acta Physiologiae Plantarum, 33(4), 1435-1444.
- Kusoglu E and Kahraman S. 2015. Total phenolic content and radical scavenging activity of *Carthamus tinctorius* L. 10. 17932/ IAU. IJEMME.m,21460604. 5(2): 943-947.
- Maron D.M., Ames B.N. 1982. Revised method for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113: 173-215.
- Mortelmans K., Zeiger E. 2000. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. Mutation research, 455: 29-60.
- Nazari F., Maleki M and Rasouli M. 2017. Study of changes the antioxidant properties and free radical scavenging in fakhri and shahani cultivars (*Vitis vinifera* L.) under silicic acid treatment. Plant. Ijbio.ir, 31(3): 694-708.
- Ong T., Ong W.Z.W., Stward J.D., and Brockman H.E. 1986. Chlorophyllin, a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. Mutate Researches, 173: 111-115.
- Riault M.A., Caillet S.A., Kermasha S.A., Lacroix M. 2006. Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products, Food Chemistry, 98: 490-501.
- Sadeghi M., and Zarei M.A. 2018. Evaluation of Antioxidant Activity and Determination of

- Phenol and Flavonoids in Hexane Extract of Aerial Plants *Descurainia Sophia* and *Fumaria vaillantii*, *Plant. Ijbio.ir*, 33(2): 365-373
23. Salem N., Msaada K., Hamdaoui Gh., Limam F., and Marzouk B. 2011. Variation in Phenolic Composition and Antioxidant Activity during Flower Development of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 44-55.
 24. Su L., Yin J.J., Charles D., Zhou K., Moore J., and Yu L. 2007. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf, *Food Chemistry*, 100 (3): 990-997.
 25. Wessner D.R., Maiorano P.C., Kenyon J. Pillsbury R., Campbell A.M. 2000. Spotover- lay Ames test of potential mutagens, See information in: <http://www.zoo.utoronto.ca/able.1-16>.
 26. Yoon H.R., Han H.G. and Paik Y.S. 2007. Flavonoid glycosides with antioxidant activity from the petals of *Carthamus tinctorius*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 50(3): 175-178.
 27. Yu S.Y., Lee Y.J., Kim J.D., Kang S.N., Lee S.K., Jang J.Y., Lee H. K., Lim J. H., Lee O. H. 2013. Phenolic composition, antioxidant activity and anti-adipogenic effect of hot water extract from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Nutrients*. Edit. MDPI, Basel, 5(12): 4894-4907.
 28. Zhang H.L., Nagatsu A., Watanabe T., Sakakibara J., and Okuyama H. 1997. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chemical and pharmaceutical bulletin (Tokyo)*, 45(12): 1910-14.

Studying antimutagenic effects of aqueous and alcoholic extracts of *Carthamus tinctorius* L. petals using Ames test

Kheiri A.^{1*}, Hanieh Mohajjel shoja², Mansour Sarajooghi³

¹ Dept. of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

² Dept. of Agriculture and Plant breeding, Faculty of Agriculture, Azad University of Karaj, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Nowaday, cancer is one of the main causes of death in the world, and mutants cause the deaths of millions of cancer patients. Given the side effects of drugs in cancer treatment, there is a growing body of research to find drugs with less side effects. The aim of this study was to evaluate the animutagenic effect of different aqueous and alcoholic extracts of safflower petals under drought stress and normal conditions against sodium azide mutagen, using Ames test in the absence and presence of microsomes of rat liver (S9). The reason for using liver microsomes in this experiment is to activate some mutagens and carcinogens because many of these compounds must be metabolically (oxidative or reductive) activated to exhibit mutagenic or carcinogenic properties, and since *Salmonella* bacteria are not able to do this activation, so a sterile microsomal extract from mammalian tissue can be used for mutagenicity testing. The difference between the averages of revertant colonies per plate in relation to the mutagen was analyzed using SPSS software and one- way ANOVA. The results showed that ethanolic extracts of petals under stress and aqueous extracts under normal conditions with 90% and 48% inhibition had the highest and lowest anti-mutagenic effects, respectively. In agreement with the results of the microsomal mixture and the findings of previous studies our results show that the plant produced more antioxidant compounds to decrease the stress effects.

Key words: Ames test, antioxidant, drought stress, *Salmonella typhimurium*, safflower