مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) جلد ۳۵، شماره ۲، ۱۴۰۱
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0
مقاله پژوهشی

بررسی خواص ضد جهش زایی عصاره‌های آبی - الکلی گلبرگ های گلرنگ با استفاده از آزمون ایمز

علی خیری[1*]، هانیه محجل شجا[1] و منصور سراجوقی[2]

[1] ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی گیاهی

[2] ایران، کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحدکرج، 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، پژوهش های بسیاری برای دست یابی به داروهایی با عوارض کمتر در حال گسترش است. این مطالعه، با هدف ارزیابی اثر ضدجهشی عصاره‌های مختلف آبی و الکلی گلبرگ های 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 ازمیکروزوم کبدی در این آزمایش فعال کردن برخی مواد جهش زاو سرطان زاست چرا که بسیاری از این ترکیبات برای بروز ویژگی های جهش زایی یا سرطان زایی باید از نظر متابولیکی (اکسیداتیو یا احیایی) فعال شوند و از آن جا که باکتری سالمونلا قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا یک عصاره استریل میکروزومی از بافت پستانداران را می توان به تست جهش زایی 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 گلبرگ ها در شرایط تنش و عصاره آبی در شرایط طبیعی به ترتیب با درصد بازدارنگی ۹۰٪ و ۴۸٪ بیشترین و کمترین اثر ضدجهشی را دارند. نتایج حاصل از بکارگیری مخلوط میکروزومی و یافته‌های مطالعات پیشین نشان می دهد که گیاه برای مقابله با آثار تنش تولید ترکیبات آنتی اکسیدان خود را افزایش می دهد.

واژه های کلیدی : آزمون ایمز، آنتی اکسیدان، تنش خشکی، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، گلرنگ

*نویسنده مسئول: علی خیری، تلفن:۰۹۳۶۴۰۱۳۴۹۹ پست الکترونیکی:alikheiri61@gmail.com

مقدمه

از زمان های گذشته تا به امروز گیاهان به عنوان یکی از مهمترین منابع غذایی و دارویی به شمار می‌رفته اند تا جایی که امروز حتی امروزه بیش از ۸۰٪ افراد غالبا به درمان‌های سنتی اعتقاد دارند. در واقع بسیاری از درمان-های رایج امروزی کاملا یا به طورجزیی 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 جمله گونه‌های اکسیژن واکنشگر(ROS: Reactive Oxygen Species) اثر تخریبی خود را نشان می‌دهند. به عنوان مثال پراکسید شدن زنجیره های جانبی در غشاهای بیولوژیک که تحت تاثیر اکسیژن های واکنشگر روی می دهد اثر مخربی بر عملکرد نفوذپذیری آن دارد و با تولید ترکیباتی سمی نظیر استالدئید سبب آسیب به مولکول های بیولوژیک مثل DNA و RNA می شود (۳). موادی که بعنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند ، می‌توانند آثار زیان‌بار

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0
مقاله پژوهشی

ROS را کاهش دهند. بنابراین عدم تعادل بین آنتی اکسیدان ها و عوامل اکسید کننده که به تنش اکسایشی معروف است منجربه 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 جهش و بروز سرطان شوند. مواد جهش زا گاهی سبب آسیب به سلول های بنیادی جنینی و جهش قابل توارث از نسلی به نسل دیگر می شوند. بدیهی است که دسترسی به روش ارزان، آسان و سریع برای شناسایی مواد جهش 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 دارند و به این دلیل ما از عصاره های برگ این گیاه برای بررسی اثر ضدجهشی استفاده می کنیم (۱۳). مشخص شده است که اسید گالیک مهم ترین جزئ 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 ضدجهشی و ضدسرطانی آزمون ایمز با بکارگیری باکتری‌های دارای جهش خاص و تاثیر مواد مورد نظر همراه با مواد جهش زا بر باکتری‌های ذکر شده می‌باشد (۱۷)، پژوهش حاضر نیز به بررسی تجربی اثر ضدجهشی عصاره‌های مختلف آبی و الکلی گلبرگ های گلرنگ در شرایط تنش خشکی و آبیاری طبیعی بر باکتری‌های جهش یافته‌ی *Salmonella typhimurium* در مقابل ماده جهش 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 کرت‌های 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

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0
مقاله پژوهشی

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 آغاز مرحله گلدهی اعمال تنش انجام شد و آبیاری طبیعی به صورت هفتگی و کم آبیاری (تنش) دو هفته یک بار بود.

عصاره گیری از گلبرگ ها: 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 تفاله ها 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 سانتی گراد 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 براث 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 شده توسط مارون و ایمز (۱۷) انجام شد. عدم آلودگی فراورده 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 درجه‌ی 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 ضدجهشی بر اساس آزمون سالمونلا/ میکروزوم شرح داده شده توسط مارون و ایمز و نیز آزمون تغییر داده شده توسط مورتلمانز و زایگر انجام گرفت (۱۷ و ۱۸). روش کار با استفاده از طی کردن ۱۰ دقیقه دوره‌ی پیش انکوباسیون در دمای ۴۵ درجه‌ی 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 وتحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS وSPSS و مقایسه میانگین ها با استفاده ازآزمون 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.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0
مقاله پژوهشی

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 ۰۵/ ≥ P 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 جهش زایی آزید سدیم در غیاب نمونه‌های مورد آزمایش به صورت ممانعت ۱۰۰درصد یا ۰درصد 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 کلنی های برگشتی در هر یک از پلیت‌های کنترل مثبت می باشد (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 ضدجهشی نمونه‌ی آزمایشی متوسط تلقی می‌شود و مادامی که درصد بازدارندگی بیش از ۴۰ درصد باشد، اثر ضدجهشی نمونه قوی است و در صورتی که کمتر از ۲۵ درصد باشد اثر ضد جهشی نمونه ضعیف می‌باشد (۲۰).

نتایج

نتایج این آزمایش بروشنی نشان داد که کلیه‌ی عصاره‌های اتانولی گلبرگ ها دارای اثر ضد جهشی قوی بر علیه آزید سدیم بودند و با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از عصاره-های شاهد و تنش خشکی مشخص شد که تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد بین عصاره‌های شاهد و تنش خشکی وجود دارد که نشان از تاثیر ضد جهشی بیشتر و ساخت بیشتر مواد آنتی اکسیدان در شرایط تنش خشکی دارد. هم‌چنین در بین عصاره‌های مختلف تنش، عصاره‌ی اتانولی در شرایط تنش با۹۰ درصد بیشترین اثر ضد جهشی و عصاره ی آبی در شرایط طبیعی با ۴۸ درصد کمترین اثر ضد جهشی را در بین عصاره‌های مختلف داشتند. جداول ۱و۲، 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 عصاره-های آبی، متانولی و اتانولی گلبرگ های 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 عصاره ها در این شرایط دارد. هم‌چنین در بین عصاره‌های مختلف تنش، عصاره‌ی اتانولی با ۹۰ درصد بیشترین اثر ضد جهشی و عصاره ی 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 گلبرگ ها و حل شدن بهتر آن‌ها در اتانول است.

بحث و نتیجه گیری

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0
مقاله پژوهشی

جدول۱- 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)

تنش خشکی	(-S9)TA100 *Salmonella typhimurium*			(+S9)TA100 *Salmonella typhimurium*		
	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی(انحراف معیار)	سطح معنی داری	درصد مهار جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی(انحراف معیار)	سطح معنی-داری	درصد مهار جهش
شاهد منفی	(۳)۲۲	./۰۵	–	(۳)۲۲	./۰۵	–
شاهد مثبت	(۱۶/۶۲)۱۴۲		–	(۱۶/۶۲)۱۴۲		–
عصاره‌ی آبی تنش	(۱۶/۰۹)۶۹		۶۴	(۱۱/۵۳)۷۲		۵۷
عصاره‌ی متانولی تنش	(۶/۲۲)۶۸		۶۶	(۴/۲۶)۶۵		۶۴
عصاره‌ی اتانولی تنش	(۱۶/۵۳)۳۱		۹۰	(۱۱/۵۶)۳۶		۸۸

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)

آبیاری طبیعی	(-S9)TA100 *Salmonella typhimurium*			(+S9)TA100 *Salmonella typhimurium*		
	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی(انحراف معیار)	سطح معنی داری	درصد مهار جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی(انحراف معیار)	سطح معنی-داری	درصد مهار جهش
شاهد منفی	(۲)۲۲	./۰۵	–	(۲)۲۲	./۰۵	–
شاهد مثبت	(۱۶/۶۲)۱۴۲		–	(۱۶/۶۲)۱۴۲		–
عصاره‌های آبی طبیعی	(۵/۲۹)۷۴		۴۸	(۷/۲۱)۷۶		۵۲
عصاره‌های متانولی طبیعی	(۳/۶۱)۶۴		۶۷	(۹/۱۸)۶۵		۶۱
عصاره‌های اتانولی طبیعی	(۱/۷۳)۵۵		۷۸	(۱۲/۷۶)۵۲		۷۶

از گل های گلرنگ بیش از ۲۰۰ ترکیب شناسایی و جداسازی شده اند که عمده آن ها از فلاونوئیدهای گروه کالکون تشکیل شده اند. این ترکیبات رنگدانه ای هستند که از اهمیت تجاری برخوردارند (۵). در مطالعات انجام شده اسید گالیک بعنوان مهم ترین جزئ ترکیبات فنولی گل های گلرنگ شناسایی شده و سایر ترکیبات اصلی نیز شامل اسید کلروژنیک، اسید سیرینجیک، تری هیدرات روتین، کوئرسین-۳-گالاکتوزید و نفتوروزوسینول نیزگزارش شده است. هم چنین با بررسی روند تغییرات فنولی در طول دوره رشد گلرنگ نشان دادند گل های این گیاه می توانند بعنوان منبعی غنی از ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار گیرند (۲۳).

تحقیقات نشان داده است که آنتی اکسیدان های گیاهی می توانند از انتشار واکنش های رادیکال های آزاد جلوگیری نمایند (۲۳). بخش عمده ظرفیت آنتی اکسیدانی میوه ها و سبزیجات از ترکیباتی نظیر فلاونوئیدها، ایزوفلاوون ها، فلاوون ها، آنتوسیانین ها، کاتشین ها و ایزوکاتشین ها ناشی می شود (۲۴). مشخص شده است که تحت تاثیر تنش های محیطی از جمله تنش خشکی یا تیمار با ترکیبات مختلف از جمله سالیسیلیک اسید میزان تجمع ترکیبات آنتی اکسیدان از جمله ترکیبات فنولی در میوه و

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0
مقاله پژوهشی

بخش های مختلف گیاه انگور افزایش یابد که در این پژوهش نیز تیمار تنش خشکی سبب افزایش ترکیبات آنتی اکسیدان در عصاره های مختلف تحت تنش خشکی شد (۱۹).

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی گل های رقم گلدشت با استفاده از تست ایمز مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. با توجه بوفور گل های گلرنگ به عنوان محصول جانبی این گیاه در صنعت تولید روغن، استخراج ترکیبات موثره از آن می تواند به افزایش ارزش افزوده گلرنگ و نیز تولید ترکیبات آنتی اکسیدان و ضدباکتریایی طبیعی برای استفاده در مواد غذایی و ترکیبات دارویی کمک کند. با توجه به اینکه بر اساس نظر انگ زمانی که درصد مهار جهش بیش از ۴۰ درصد باشد، اثر ضدجهشی نمونه قوی است در این بررسی نیز عصاره های 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 عصاره های الکلی و آبی این گیاه بود که با مطالعات محققین دیگر همسویی داشت (۵). مشخص شده است که تیمار با عصاره‌های استخراج شده از آلوئه ورا 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 ضد-سرطانی قوی مشاهده شد. علت استفاده ازمیکروزوم کبدی در این آزمایش فعال کردن برخی مواد جهش زاو سرطان زاست چرا که بسیاری از این ترکیبات برای بروز ویژگی های جهش زایی یا سرطان زایی باید از نظر متابولیکی (اکسیداتیو یا احیایی) فعال شوند و از آن جا که باکتری *Salmonella* قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا یک عصاره استریل میکروزومی از بافت پستانداران را می توان به تست جهش زایی استفاده کرد. میکروزوم ها حفره های غشایی کوچکی هستند که در یاخته های زنده و سالم دیده نشده و نتیجه تکه تکه شدن قسمت هایی از سیستم غشایی درون یاخته ای و نیز شکسته شدن لوله ها و کیسه های شبکه اندوپلاسمی می باشند (۲).

بررسی ها نشان می دهند که سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان مولکول های آنتی اکسیدان نظیر آلفا-توکوفرول و آسکوربیک اسید و میزان آنزیم های آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و هم چنین محتوای ترکیبات فنولی در دو واریاته گلرنگ موثر است (۱۰). هم چنین در شرایط تنش خشکی میزان این ترکیبات آنتی اکسیدان افزایش می یابد که می تواند به دلیل افزایش توان جذب گونه های اکسیژن فعال توسط این عوامل آنتی اکسیدان باشد. سیستم آنتی اکسیدانی این گیاه سبب کاهش میزان گونه های اکسیژن فعال نظیر هیدروژن پراکسید و آنیون های سوپراکسید می شود که میزان سنتز آن ها تحت شرایط تنش های محیطی نظیر تنش خشکی افزایش می یابد. اثرات تنش خشکی در شرایط آب کشت بر میزان ترکیبات آنتی اکسیدان برگ ها و گلبرگ های گلرنگ نشان داده است که شوری و تنش خشکی می تواند سبب افزایش میزان ترکیبات فنولی و آسکوربیک اسید گردد (۱۵). ضمن بررسی میزان ترکیبات پلی فنولی در ارتباط با فعالیت جذب رادیکال های آزاد در بخش های مختلف گلرنگ مثل عصاره های برگ و گلبرگ مشخص شد که بین فعالیت جذب رادیکال های آزاد و محتوای فنولی در عصاره های مختلف گلبرگ و برگ ارتباط معنی دار در سطح ۵ درصد وجود دارد (۹). فلاونوئیدهای گلبرگ های گلرنگ بخش اصلی عصاره های استخراج شده از گلبرگ ها هستند که فعالیت موثری در جذب رادیکال های آزاد و جلوگیری از اثرات جهش زایی آن ها دارند (۸). سه ترکیب فلاونولی از گلبرگ های گلرنگ جداسازی شده است که فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار قوی بر علیه رادیکال های آزاد نشان می دهند (۲۶). نتایج این پژوهش به

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0

روشنی نشان داد که در بین عصاره‌های مختلف، عصاره‌ی اتانولی با تاثیر ۹۰ درصد در شرایط تنش بهترین عصاره است که دلیل حضور ترکیبات موثر آنتی‌اکسیدان در گلبرگ ها و حل شدن بهتر آن‌ها در اتانول است که این نتایج در توافق با یافته های دیگر دانشمندان است (۲۷). هم چنین این یافته ها در توافق با نتایج قبلی نشان می دهد که افزایش جذب رادیکال های آزاد توسط ترکیبات انتی اکسیدان گلبرگ های این گیاه سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار اثرات جهش در باکتری شده است (۸). عصاره های مختلف متانولی گلبرگ های گلرنگ به طرز معنی داری اثرات آنتی اکسیدانی را نشان می دهد و عصاره های متانولی گلبرگ های گلرنگ در سطح کمتر از ۵ درصد اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی نشان می دهند و این اثرات قوی آنتی اکسیدانی مربوط به ۴ ترکیب فنولی مختلف در این عصاره هاست که با تکنیک HPLC مشخص شد که گالیک اسید مهم ترین و موثرترین ترکیب در رقم های مورد مطالعه آن ها بود. می توان عصاره های گلبرگ های گلرنگ را بعنوان یک منبع طبیعی جایگزین ترکیبات فعال زیستی مصنوعی نمود (۱۳). فعالیت آنتی اکسیدانی رقم های گلرنگ عمدتا مربوط به فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات پلی فنولی آن است. در پژوهش های انجام شده مشخص شد که ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در اندام های هوایی سبب افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف الکلی در گیاه خاکشیر می شود و در پژوهش حاضر نیز مشخص شد که عصاره های مختلف گلرنگ بویژه در شرایط تنش خشکی فعالیت ضد جهشی معنی داری نشان می دهند که مربوط به تجمع ترکیبات فلاونوئیدی در گلبرگ های این گیاه است (۲۵). عصاره های مختلف الکلی (متانولی و اتانولی) استونی، دی اتیل اتری و اتیل استات به میزان زیادی برای انحلال و جداسازی فلاونوئیدها استفاده می شود (۷). در مطالعه ما نیز عصاره های اتانولی گلبرگ های گلرنگ بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را در شرایط تنش کم آبی نشان دادند که در مقایسه با همین عصاره ها در شرایط آبیاری طبیعی می توان نتیجه گرفت که علاوه بر انحلال پذیری بیشتر این ترکیبات در عصاره های اتانولی بیانگر سنتز بیشتر این ترکیبات در شرایط تنش کم آبی می باشد. بین برگ، دانه و گل فراوان ترین ترکیب آنتی اکسیدانی در گل ها گزارش شده است و در بین عصاره های مختلف آبی و اتانولی، عصاره های اتانولی بیشترین فعالیت در به دام انداختن رادیکالهای آزاد را با ۸۷٪ فعالیت از خود نشان دادند (۱۶). با توجه به تنوع رنگدانه ها و مواد موثر در فعالیت ضد جهشی پیشنهاد می شود با روش های بیوشیمیایی ضمن استخراج آن ها تاثیر هر یک از این مواد بررسی شود. هم چنین می توان در سویه های مختلف گلرنگ نیز مواد موثر در این فرایند را بررسی کرد.

جمع بندی

با توجه به بررسی های انجام شده در این تحقیق می توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از عصاره های مختلف گلبرگ های گیاه گلرنگ در شرایط آبیاری طبیعی و بویژه در شرایط تنش خشکی که در آن گیاه برای مقابله با عوامل تنش زا سنتز ترکیبات مختلف آنتی اکسیدانی به ویژه فلاونوئیدها و رنگدانه های دارای خواص آنتی اکسیدانی را افزایش می دهد، می تواند به عنوان یکی از راه های کم هزینه و موثر در کاهش آثار تنش های محیطی و اثرات جهش زایی عوامل تنش زای محیطی در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از رساله دکتری اقای علی خیری دانشجوی دکتری تکوین گیاهی دانشگاه تبریز می باشد و هزینه های انجام آن بصورت شخصی تامین شده است. نویسندگان این مقاله از آقای دکتر عرب زاده که در مطالعات آماری و تجزیه و تحلیل داده ها زحمات زیادی انجام دادند و هم چنین پرسنل محترم و زحمتکش مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ازاد اسلامی واحد کرج که در تمام

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0
مقاله پژوهشی

مراحل کشت و نمونه گیری گلرنگ همراه ما بودند تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1. Bae SH. and Suh, HJ. 2007. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea, LWT Food Science and Technology, 40(6): 955-962.

2. Bathini M., Goto S., Tian H., Ando F., Fukuhara M., Watanabe I. 2002. Mutagenicity of 1,3-Butadiene, 1,4-Pentadiene-3-ol, Isopern, 2,4-Hexadiene, cis and transpiprylene, Envi-Iron. Health Perspect, 3: 73-78.

3. Bedi M.K., Shenefelt P.D. 2002. Herbal therapy in dermatology, Arch Dermathology, 138: 16-28.

4. Cao G., Booth S., Sadowski J. and Prior R. 1998. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diet sigh in fruit and vegetables, American Journal of Clinical Nutrition, 68(5): 1081-87.

5. Ekin Z. 2008. Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: A global view, Journal of Agronomy, 4(2): 83-87.

6. Gribel N.V., Pashinskii V.G. 1986. Anti–metastatic Properties of *Aloe vera* Juice, Vopour Oncology, 32(12): 38-40.

7. 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.

8. 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.

9. Harbone Ch.B. 1997. Methods of chemical analysis. Tehran: Tehran university publication, p:140-175.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. Karimkhani M.M., Shaddel R., Khodaparast M.H.H., Vazirian M. and Piri-Gheshlaghi Sh. 2016. Antioxidant and antibacterial activivity of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) extract from four different cultivars. Quality Assurance and Safety of Crop & Foods. 8(4), 565-574.

15. Karray-Bouraoui, 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.

16.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.

17. Maron D.M., Ames B.N. 1982. Revised method for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113: 173-215.

18. Mortelmans K., Zeiger E. 2000. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. Mutation research, 455: 29-60.

19. 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.

20. Ong T., Ong W.Z.W., Stward J.D., and Brockman H.E. 1986. Chlorophillin, a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture . Mutate Researches, 173: 111-115.

21. 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.

22. Sadeghi M., and Zarei M.A. 2018. Evaluation of Antioxidant Activity and Determination of

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.4.0

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 shoja[2], Mansour Sarajooghi[3]

[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