مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دوم، شماره چهارم، پیاپی هشتم، بهار ۱۳۹۳ (۷۵-۶۷)

بررسی اثرات عصاره آبی زعفران (*Crocus sativus*) بر اندازه لاروهای مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) در بازه‌های زمانی مختلف مرحله لاروی

سیده فاطمه فانی یزدی[۱]*، مجید رجبیان [۲]، ناصر مهدوی شهری [۳]، سید امین فانی یزدی[٤]
۱. کارشناس ارشد، زیست‌شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه پیام نور
۲. استادیار، بیوشیمی، دانشگاه پیام نور
۳. دانشیار، بافت‌شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤. دانشجوی دکتری کشاورزی، دانشگاه پیام نور
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲، تاریخ تصویب: ۹۲/۷/۲۸)

چکیده
گیاه زعفران (*Crocus sativus*)، گیاه بومی کشور ایران و خصوصاً منطقه خراسان می‌باشد و جایگاه خاصی در الگوی تغذیه مردم دارد. با توجه به مطالعات متعدد اثرات زعفران و از آنجا که در زمینه اثرات آن بر روند تکوین مگس سرکه به عنوان یک مدل جانوری مطالعات خاصی صورت نگرفته، در این مطالعه اثرات زعفران بر اندازه لاروها در حین تکوین، مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۵ جفت مگس سرکه وحشی بالغ سه روزه جهت جفت‌گیری و تخم‌گذاری به هر یک از ظروف کشت حاوی غلظت‌های متفاوت عصاره آبی زعفران منتقل و پس از هشت ساعت خارج گردیدند. نمونه‌گیری از لاروها در هفت مرحله و با فواصل زمانی دوازده ساعته انجام و در هر مرحله تغییرات مورفومتریک طول و عرض آنها بررسی گردید. تجزیه و تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SAS، تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه One way ANOVA و میانگین داده‌ها با آزمون T_{tukey} با حداقل سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ مقایسه شدند. در غلظت‌های پایین‌تر زعفران که شامل غلظت‌های ۲۰-۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است، افزایش اندازه لاروها در سه نمونه‌برداری اولیه، در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. با افزایش غلظت زعفران در محیط کشت، کاهش معنی‌دار اندازه لاروها در اکثر نمونه‌برداری‌ها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. با توجه به افزایش معنی‌دار اندازه لاروها در نمونه‌برداری‌های اولیه و کاهش معنی‌دار اندازه لاروها در غلظت‌های بالاتر زعفران می‌توان گفت زعفران در مراحل اولیه لاروی، اثرات مثبت و در غلظت‌های بالا، اثر منفی بر زیست‌پذیری این موجود زنده داشته است.

واژه‌های کلیدی: مگس سرکه، زعفران، لارو.

Effects of Aqueous Extract of Saffron (*Crocus sativus*) on the Size of the Larvae of Fruit Flies (*Drosophila melanogaster*) in the Larval Stage of Several Timescales

S. F. Fani Yazdi[1]*, M. Rajabian[2], N. Mahdavi Shahri[3], S. A. Fani Yazdi[4]
1. M.Sc. Developmental Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor of Biochemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Associate Professor of Histology, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
4. Ph.D. Candidate of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran
(Received: Jan. 21, 2013; Accepted: Oct. 20, 2013)

Abstract
The Saffron plant (*Crocus sativus*), a native plant from Iran and especially of Khorasan region, has a specific place for people's diet. According to several studies about effects of Saffron and because there are no specific studies on the effects of Saffron on the development of *Drosophila melanogaster* as an animal model, this subject is being evaluated in the current study. A total of 5 pairs of 3-days-old wild *Drosophila melanogaster* were transferred to every culture plate containing different concentrations of Saffron in order to intercross and oviposition and were brought out after 8 hrs. Sampling of larvae were performed in the seven steps at intervals of twelve hours and in each step. Morphometrical changes in the length and width of the larvae, were studied. The obtained data were evaluated statistically using SAS software. The variance between groups were evaluated by the test of One way ANOVA, and the mean of data were compared using Ttukey test with minimum significance level of $p<0.05$. In low volumes of saffron, 0.3 to 20 mg/ml, resulted in the increased size of larvae in three initial samplings, in comparison with the control group. Presence of high volumes of Saffron on the medium had a significant decrease of the size of larvae in most samplings in contrast with the control group. With regard to the significant increase of the size of larvae in initial sampling and decrease of the size of larvae in higher concentration of saffron, it be said that saffron has positive effects in initial larval stages and in high concentrations, has inverse effect on the biology of this insect.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, *Crocus sativus*, Larvae.

* نویسنده مسؤل:
E-mail: Sffy63@yahoo.com

مقدمه

هدف این تحقیق، مطالعه مگس سرکه به عنوان یک مدل مناسب جهت بررسی اثرات زعفران بر رشد جانور در طول دوره لاروی و بررسی تغییرات مورفومتریک اندازه لاروها می‌باشد. لذا این تحقیق با بهره‌گیری از روش‌های مطالعات ریخت‌سنجی لاروها در سنین مختلف، صورت گرفت. باتوجه به اثرات جانبی ناخواسته برخی داروهای شیمیایی، توجه بیشتر به اثرات احتمالی گیاهان دارویی بر عملکرد بخش‌های مختلف بدن لازم است. در این میان زعفران از زمان‌های قدیم به عنوان یک چاشنی و رنگ در غذاها و همچنین در درمان انواع وسیعی از اختلالات همچون سرفه، نفخ شکم، اختلالات معده، بیخوابی، خونریزی مزمن رحم، اختلالات زنانگی، تب سرخ (مخملک) و اختلالات قلبی عروقی استفاده می‌شده است (Fatehi *et al.*, 2003).

نتایج مطالعات فارماکولوژیک جدید نشان می‌دهد که عصارهٔ زعفران دارای اثرات کاهش چربی، افزایش یادگیری و حافظه، پالاینده خون، کاهنده کلسترول و فشار خون و تصفیه‌کننده طحال و کبد و افزایش میل جنسی می‌باشد (Hosseinzadeh & Younesi, 2002). گزارش شده است که این ماده، مانع رشد سلول‌های توموری انسان از طریق تشکیل کلنی و سنتز اسید نوکلئیک سلول می‌شود (Abdullaev *et al.*, 1995). بر همین اساس برای پایان دادن به حاملگی ناخواسته (سقط جنین) و کاهش باروری نیز مصرف می‌گردد (Salomi *et al.*, 1991). مصرف این ماده در دوران بارداری و در دوران بحرانی تشکیل اندام‌ها (به عنوان نوشیدنی) می‌تواند به جنین صدماتی وارد نماید (Tafazoli *et al.*, 2004). مقایسه بین ژنوم دروزوفیلا و انسان نشان می‌دهد که ما به حشرات، بیشتر از آنچه تصور می‌کنیم، نزدیک می‌باشیم. استفاده از روش‌های ژنتیکی تخصص‌یافته در ترکیب با تکنیک‌های ژنومی جدید نشان می‌دهند که مگس سرکه می‌تواند به عنوان ابزاری برای درک فرایندهای اصلی سلولی عمل نماید و یک سیستم مدل پیچیده و جذابی را برای کشف و بررسی اساس ملکولی بیماری‌های انسانی مثل سرطان، آلزایمر و هانتینگتون ارائه دهد (Tickoo & Russell, 2002).

در مطالعه Castaneda *et al.* (2001) عواملی که مگس سرکه را به عنوان یک مدل مناسب آزمایشگاهی معرفی می‌کند به شرح زیر است:

مگس سرکه به امکانات ساده‌ای نیاز دارد. دوره تولیدمثل کوتاهی داشته و در هر تولیدمثل تعداد زیادی فرزند تولید می‌کند. محیط کشت ارزان قیمتی دارد و انجام آزمایشات in vivo به راحتی بر روی آن امکان‌پذیر است. بنابراین بی‌مهرگان دارای اهمیت اکولوژیکی بوده و کاربرد مهمی به عنوان سیستم مدل دارند (Hirsch *et al.*, 2003).

هر چند مطالعات بسیاری در مورد تأثیرات زعفران بر نمونه‌های مختلف جانوری صورت گرفته است، اما بررسی اثرات آن روی حشرات هنوز به خوبی ارزیابی نشده است. برای مثال Hosseini *et al.* (2009) بررسی اثرات سقط اوروتراتوژنیک مصرف غلظت‌های ۰/۴٪ و ۰/۸٪ عصاره آبی دم کرده گیاه زعفران در بازه‌های زمانی متفاوت در دوران بارداری در جنین موش سوری را انجام دادند. نتایج نشان داد که طول قد، طول دم، قطر و وزن جفت در گروه‌هایی که غلظت بالاتر و مدت زمان بیشتری زعفران را مصرف کرده‌اند نسبت به جنین‌های گروه کنترل به‌طور معناداری کمتر شد و همچنین تعداد جنین‌های مرده و جذب شده در غلظت ۰/۸ به طور معناداری بیشتر از غلظت ۰/۴ بود. با توجه به نتایج حاصل، دوزهای مصرفی ذکر شده در زمان بارداری، عمدتاً تراتوژن هستند.

همچنین Tafazoli *et al.* (2004) اثرعصاره آبی زعفران بر جذب جنین (سقط جنین) عوارض آن در موش کوچک آزمایشگاهی را بررسی نمودند. تعداد جنین صغر یافته و جذب شده در گروه مصرف کننده زعفران، نسبت به گروه شاهد به طور نسبی بیشتر

بود. بین صغر یافتن جنین و تاحدی جذب جنین ارتباط معنی‌داری حاصل گردید. با توجه به نتایج حاصل، مصرف زعفران در دوران بارداری می‌تواند عوارضی بر جنین اعمال نماید. در بررسی‌های سلولی، Nezhad Shahrokhabadi *et al.* (2009) اثرسایتوتوکسی‌سیتی عصاره تام زعفران بر روی سلول‌های کارسینومای کبد انسان (HepG2) را بررسی نمودند. نتایج نشان داد عصاره تام زعفران می‌تواند با تغییرات درون سیتوپلاسمی و هسته‌ای اثرات سایتوتوکسی‌سیتی بر سلول‌های توموری داشته باشد. همچنین غلظت مهارکننده ۵۰ درصد رشد سلول‌ها (IC50) برای سلول‌های سرطانی ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

در تحقیقات متفاوت و گسترده، خصوصیات بیولوژیکی مصرف دارویی زعفران مشخص گردیده است که تعدادی از این خصوصیات شامل تأثیرات جهش‌زا یا ضدجهش‌زا (Abdullaev, 2002; Abdullaev, 2003)، اثرات آنتی‌ژنوتوکسیک (Premkumar, 2003)، تأثیرات بازدارنده روی سرطان پوست (Das *et al.*, 2010)، تأثیر سیتوتوکسیک (Aung *et al.*, 2007)، تأثیر روی جراحت عصبی (Takashi *et al.*, 2007)، فعالیت ضد اضطراب (Pitsikas *et al.*, 2008)، تأثیر بر رفتار جنسی (Hosseinzadeh *et al.*, 2008)، فعالیت تنظیم‌کننده ایمنی (Escribano *et al.*, 1999)، فعالیت حفاظت‌کننده قلب (Goyal *et al.*, 2010) و تأثیر روی وزن بدن (Gout *et al.*, 2010) می‌باشد. با توجه به تمامی فواید و مضرات ذکر شده از این گیاه دارویی که از قدیم در نقاط مختلف دنیا به ویژه در ایران به عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرار گرفته، در این تحقیق از اثرات زعفران بر مگس سرکه به عنوان یک جاندار مدل تحقیقات تکوینی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه برای انجام تمام مراحل تکثیر، پرورش و انجام آزمایشات، از مگس‌های تیپ وحشی استفاده شد. نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شرایط تاریکی مطلق و داخل ظروف حاوی محیط کشت نگهداری شدند. برای تهیه محیط کشت، آب، آرد سفید، مخمر و گلوکز نقش تأمین مواد غذایی را دارد. آگار برای جامد شدن محیط کشت لازم است. اسید آسکوربیک و اسید پروپیونیک برای تخم‌گذاری، تبدیل مرحله لاروی به شفیره‌ای و به عنوان قارچ‌کش و میکروب‌کش مورد نیاز است. آماده‌سازی محلول‌های آزمون با استفاده از زعفران و آب جاری انجام پذیرفت. محلول‌های زعفران در ۱۲ غلظت ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش تهیه عصاره دم‌کرده، هر بار به‌طور تازه آماده شدند. محلول‌ها در حجم ۱ میلی‌لیتر در نهایت با محیط کشت به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بنابراین غلظت‌های نهایی مورد اثر به ترتیب ۰/۳، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. روش انجام آزمون به این ترتیب بود که محلول‌های زعفران در دوازده غلظت و در هر غلظت پنج تکرار (با به کار بردن ارلن‌هایی با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) آماده شدند. هر ارلن با ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی غلظت‌های زعفران پر شد. برای نمونه کنترل ارلن‌ها در هر تکرار با محیط کشت حاوی آب جاری استریل (به جای محلول حاوی غلظت زعفران مورد نظر) پر شدند. در مرحله بعد، جهت انجام مطالعات ریخت‌سنجی، تعداد ۲۰ جفت مگس سه روزه وارد ارلن‌ها گردید. پس از هشت ساعت مگس‌ها رها شده و پس از آن نمونه‌گیری از لاروها به صورت هر ۱۲ ساعت یک بار در هفت مرحله (تا زمان ظهور شفیره) صورت گرفت. در هر مرحله نمونه‌گیری، ۷ لارو به تصادف از محیط کشت کلیه غلظت‌ها خارج گردید.

به منظور تعیین اندازه لاروهای مگس سرکه گونه *Drosophila melanogaster*، در سنین مختلف و همچنین تعیین اثر غلظت‌های متفاوت زعفران بر

روند تکوین این حشره از مطالعات ریخت‌سنجی استفاده شد. اندازه‌گیری بدین صورت بود که پس از عکس‌برداری از لاروها، از ابتدایی‌ترین تا انتهایی‌ترین نقطه بدن جهت تعیین طول بدن اندازه گیری شد. نقطه میانی طول نمونه‌ها، به عنوان محل اندازه‌گیری عرض تعیین گردید (Day & Wallman, 2006). با توجه به این که تمامی نمونه‌ها ماکروسکوپی بودند از استریو میکروسکوپ برای بررسی‌های مربوطه استفاده شد. کشتن لاروها با ریختن آب ۹۰ درجه بر روی آنها صورت گرفت. نمونه‌ها در زیر استریومیکروسکوپ مجهز به دوربین Labomed و با درشت‌نمایی 30X عکس‌برداری شده و با نرم‌افزار Labomed اندازه‌گیری شدند. نتایج به صورت Mean±SEM ارائه شدند. تجزیه و تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SAS صورت گرفت. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه One way ANOVA یا در صورت لزوم دو طرفه Two way ANOVA و میانگین داده‌ها با آزمون T_{tukey} با حداقل سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ مقایسه شدند. نمودارها نیز با نرم‌افزار آماری Excel رسم شدند.

نتایج

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف زعفران بر مورفولوژی لارو، مطابق با روش کار ذکر شده، عکس‌برداری از نمونه‌ها و اندازه‌گیری طول و عرض آنها با کمک نرم‌افزار Labomed صورت گرفت. جدول ۱ نتایج مقایسه بین طول بدن لارو در غلظت‌های مختلف زعفران را در هر بار نمونه‌برداری نشان می‌دهد. وجود یک حرف مشترک بین دو عدد نشانه معنی‌دار نبودن آن دو عدد با یکدیگر است (آزمونTukey، ۵٪ =α).

جدول ۱. مقایسه میانگین طول لارو در هر بار نمونه‌برداری در غلظت‌های مختلف

غلظت زعفران (mg/ml)	طول لارو (میلیمتر)						
	نمونه‌برداری اول	نمونه‌برداری دوم	نمونه‌برداری سوم	نمونه‌برداری چهارم	نمونه‌برداری پنجم	نمونه‌برداری ششم	نمونه‌برداری هفتم
صفر (کنترل)	۰/۹۵cdef	۱/۲۳cd	۱/۹۰b	۲/۵۳ab	۳/۴۶ab	۴/۳۸ab	۴/۷۴abc
۰/۳	۰/۹۹abcd	۱/۲۴bc	۲/۰۹a	۲/۴۵bc	۳/۰۴bc	۴/۳۱abcd	۴/۶۳abc
۰/۵	۰/۹۷bcde	۱/۲۶bc	۲/۲۱a	۲/۶۵a	۳/۶۲a	۴/۵۰a	۴/۹۵a
۱	۰/۹۹abcd	۱/۳۶a	۲/۱۷a	۲/۴۴bc	۲/۹۹c	۴/۲۸abcd	۴/۷۵ab
۲	۱/۰۰abc	۱/۳۳ab	۲/۱۵a	۲/۲۳de	۲/۸۹c	۴/۳۶abc	۴/۵۷bc
۵	۱/۰۵a	۱/۳۳ab	۱/۸۷b	۲/۰۸ef	۲/۸۹c	۴/۰۱bcde	۴/۶۴abc
۱۰	۱/۰۳ab	۱/۱۶cd	۱/۸۰b	۲/۳۲cd	۲/۷۴cd	۳/۹۳def	۴/۴۷bcd
۲۰	۱/۰۳ab	۱/۱۴d	۱/۶۲c	۲/۰۱f	۲/۶۹cd	۳/۶۴efg	۴/۴۰cde
۳۰	۰/۹۲defg	۰/۹۸e	۱/۳۴e	۲/۱۱ef	۲/۸۱c	۳/۹۶cdef	۴/۱۷def
۴۰	۰/۸۹fg	۰/۷۷f	۱/۵۹c	۲/۰۴f	۲/۷۷cd	۳/۵۹fg	۴/۱۰ef
۵۰	۰/۸۷g	۰/۷۶f	۱/۵۵cd	۱/۷۰g	۲/۷۶cd	۳/۶۸efg	۴/۲۱def
۸۰	۰/۹۲cdefg	۰/۷۱fg	۱/۴۱de	۲/۰۰f	۲/۳۵d	۳/۳۹gh	۳/۹۹f
۱۰۰	۰/۹۰efg	۰/۶۵g	۱/۳۹e	۱/۷۴g	۲/۳۵d	۳/۱۱h	۳/۳۵g

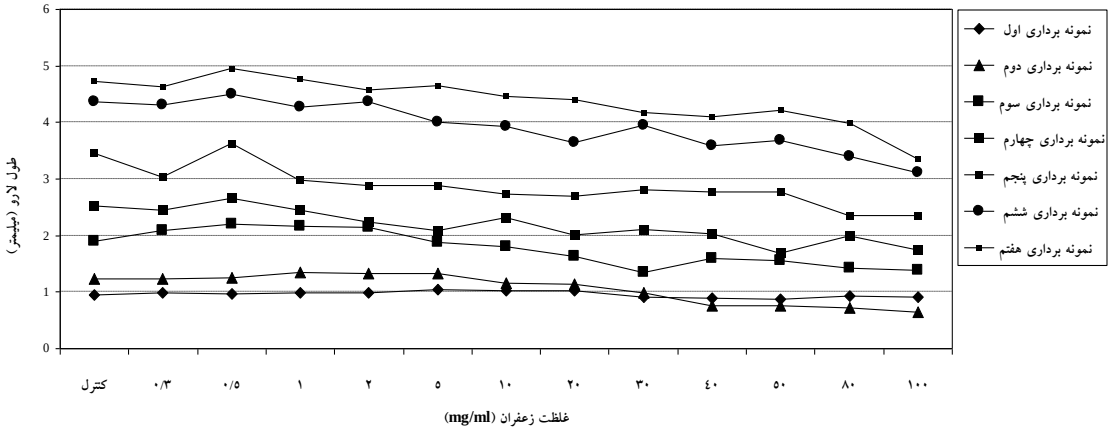
وجود یک حرف مشترک بین دو عدد نشانه معنی‌دار نبودن آن دو عدد با یکدیگر است (آزمونTukey، ۵% =α), (Data=Mean±SEM) , (n=5, m=5).

با توجه به نتایج گزارش شده در جدول ۱: افزایش غلظت زعفران در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری اول، در غلظت‌های ۲۰-۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش معنی‌دار در طول لاروها گردیده

و در سایر غلظت‌ها (به جز غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمایش و گروه کنترل مشاهده نمی‌شود. طول لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری دوم، در غلظت‌های ۵-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری افزایش و در غلظت‌های ۱۰۰-۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته است. طول لارو در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. طول لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری سوم، غلظت‌های ۲-۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری افزایش و در غلظت‌های ۱۰۰-۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته است. طول لارو در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. طول لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری چهارم، در غلظت‌های ۱۰۰-۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. طول لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری پنجم، در غلظت‌های ۱۰۰-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. طول لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری ششم، در غلظت‌های ۱۰۰-۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. طول لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری هفتم، در غلظت‌های ۱۰۰-۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

با توجه به اینکه نمونه‌گیری از لاروها به صورت هر ۱۲ ساعت یک‌بار انجام شد، در نمودار ۱ اثر توأم افزایش غلظت زعفران در محیط کشت بر رشد لاروها در طی زمان نشان داده شده است.

در جدول ۲ نتایج مقایسه بین عرض بدن لارو در غلظت‌های مختلف زعفران در هر بار نمونه‌گیری نشان داده شده است. وجود یک حرف مشترک بین دو عدد، نشانه معنی‌دار نبودن آن دو عدد با یکدیگر می‌باشد (آزمون Tukey، ۵٪ =α).



نمودار ۱. اثر توام افزایش غلظت زعفران در محیط کشت بر رشد لاروها در طی زمان

با توجه به نتایج گزارش شده در جدول ۲:

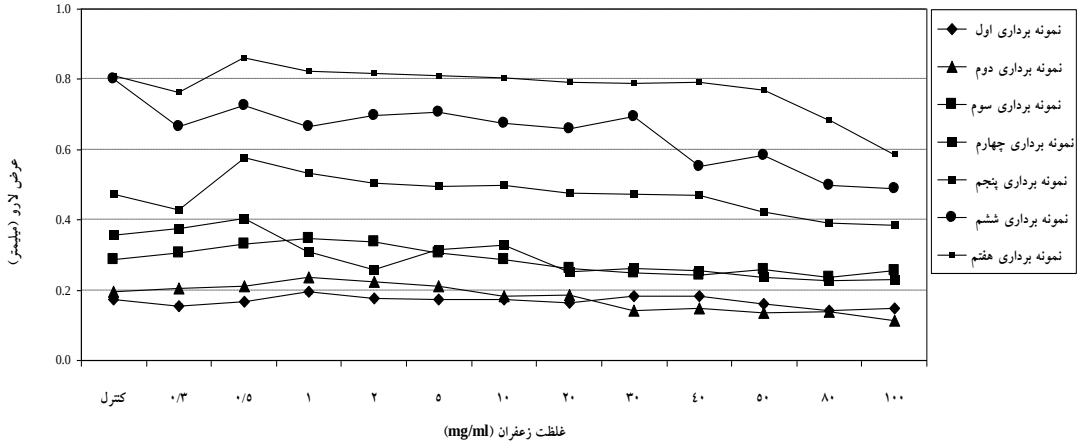
عرض لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری اول، در غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری

کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. عرض لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری دوم، در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری افزایش و در غلظت‌های ۱۰۰-۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. عرض لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری سوم، در غلظت‌های ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری افزایش و در غلظت‌های ۱۰۰-۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (به جز غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. عرض لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری چهارم، در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری افزایش و در غلظت‌های ۱۰۰- ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (به جز غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. عرض لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری پنجم، در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری افزایش و در غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. عرض لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری ششم، در کلیه غلظت‌ها به صورت معنی‌داری کاهش یافته است. عرض لاروها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در نمونه‌گیری هفتم، در غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در سایر غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

با توجه به این که نمونه‌گیری از لاروها به‌صورت هر ۱۲ ساعت یک‌بار انجام شد، در نمودار ۲ اثر توأم افزایش غلظت زعفران در محیط کشت بر رشد لاروها در طی زمان نشان داده شده است.

جدول ۲. مقایسه میانگین عرض لارو در نمونه‌برداری‌های مختلف در مطالعات مورفومتری

غلظت زعفران (mg/ml)	عرض لارو (میلیمتر)						
	نمونه‌برداری اول	نمونه‌برداری دوم	نمونه‌برداری سوم	نمونه‌برداری چهارم	نمونه‌برداری پنجم	نمونه‌برداری ششم	نمونه‌برداری هفتم
صفر (کنترل)	۰/۱۷abc	۰/۲۰cde	۰/۲۹cd	۰/۳۶bc	۰/۴۷bcd	۰/۸۰a	۰/۸۱ab
۰/۳	۰/۱۵cde	۰/۲۰bcd	۰/۳۱bc	۰/۳۸ab	۰/۴۳ cde	۰/۶۷b	۰/۷۶b
۰/۵	۰/۱۷bcd	۰/۲۱bc	۰/۳۳ab	۰/۴۰a	۰/۵۸ a	۰/۷۲b	۰/۸۶a
۱	۰/۱۹a	۰/۲۴a	۰/۳۵a	۰/۳۱d	۰/۵۳ab	۰/۶۶b	۰/۸۲ab
۲	۰/۱۸abc	۰/۲۲ab	۰/۳۴a	۰/۲۶e	۰/۵۰ab	۰/۷۰b	۰/۸۲ab
۵	۰/۱۷abc	۰/۲۱bc	۰/۳۱bc	۰/۳۲d	۰/۴۹ bcd	۰/۷۱b	۰/۸۱ab
۱۰	۰/۱۷abc	۰/۱۸e	۰/۲۹cd	۰/۳۳cd	۰/۵۰bc	۰/۶۸b	۰/۸۰ab
۲۰	۰/۱۶bcde	۰/۱۹de	۰/۲۶de	۰/۲۵e	۰/۴۷bcd	۰/۶۶b	۰/۷۹ab
۳۰	۰/۱۸ab	۰/۱۴f	۰/۲۵ef	۰/۲۶e	۰/۴۷bcd	۰/۶۹b	۰/۷۹ab
۴۰	۰/۱۸ab	۰/۱۵f	۰/۲۴ef	۰/۲۵e	۰/۴۷bcd	۰/۵۵cd	۰/۷۹ab
۵۰	۰/۱۶cde	۰/۱۳fg	۰/۲۶def	۰/۲۴e	۰/۴۲de	۰/۵۸c	۰/۷۷b
۸۰	۰/۱۴e	۰/۱۴f	۰/۲۴f	۰/۲۳e	۰/۳۹e	۰/۵۰d	۰/۶۹c
۱۰۰	۰/۱۵ de	۰/۱۱g	۰/۲۵ef	۰/۲۳e	۰/۳۸e	۰/۴۹d	۰/۵۹d



نمودار ۲. اثر توام افزایش غلظت زعفران در محیط کشت بر رشد لاروها در طی زمان

بحث و نتیجه‌گیری

پس از بررسی نتایج مربوط به تغییرات ریخت سنجی لارو، مشاهده می‌شود که به‌طور کلی با افزایش غلظت زعفران، در برخی غلظت‌های پایین‌تر شاهد افزایش اندازه لاروها و بتدریج با افزایش غلظت، شاهد کاهش اندازه لاروها در مقایسه با گروه کنترل می‌باشیم (نمودارهای ۱ و ۲). در مورد افزایش طول لارو در مقایسه با گروه کنترل در سه نمونه‌برداری اول به ترتیب از غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سمت غلظت‌های پایین‌تر شاهد این افزایش هستیم. به نحوی‌که در نمونه‌برداری اول افزایش معنی‌دار در سه غلظت ۲۰–۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در نمونه‌برداری دوم افزایش معنی‌دار در سه غلظت ۵–۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در نمونه‌برداری سوم افزایش معنی‌دار در چهار غلظت ۲–۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده می‌گردد و در نمونه‌برداری‌های بعدی، دیگر شاهد افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نبودیم. احتمالاً این مسئله بیانگر این است که غلظت‌های کمتر زعفران در مراحل اولیه رشد لارو شاید بتواند اثرات مثبتی بر رشد داشته باشد. در رابطه با کاهش طول لارو نیز تا حدی همان ترتیب ذکر شده در روند افزایش طول را در مقایسه با گروه کنترل شاهد هستیم. با این تفاوت که روند کاهش طول لارو در غلظت‌های بالای مصرفی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود. به‌طوری که غلظت زعفران و مدت زمان تغذیه از محیط کشت محتوی زعفران با روند کاهش طول لارو در مقایسه با گروه کنترل تا حدی نسبت مستقیم نشان می‌دهند. به این معنا که غلظت‌های بالای زعفران در همان نمونه‌برداری‌های اولیه، تغییرات کاهشی خود را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهند و با گذشت زمان نیز این روند کاهشی ادامه می‌یابد؛ اما به ترتیب با کم شدن غلظت زعفران، روند کاهشی دیرتر خود را نشان می‌دهد و در آخرین نمونه‌برداری کاهش معنی‌دار طول لارو به غلظت‌های ۱۰۰–۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محدود می‌شود (جدول ۱). در مورد تغییرات عرض لارو نیز تقریباً همان ترتیب ذکر شده در تغییرات طول لارو در طی زمان قابل مشاهده است (جدول ۲). در مورد افزایش طول و عرض لاروها احتمالاً در غلظت‌های پایین‌تر زعفران، با تغذیه لارو از محیط، زعفران وارد بدن جاندار شده و به تدریج در ساختارهای بدن تجمع یافته و اثرات مثبت خود را که منجر به تسریع رشد و افزایش طول و عرض در مقایسه با گروه کنترل است، القا می‌کند. در مطالعه Premkumar *et al.* (2006) نیز عصاره آبی زعفران منجر به افزایش رشد جنینی در موش گردید. در مورد کاهش طول و عرض لاروها در غلظت‌های بالای زعفران، با تغذیه لارو از محیط، زعفران وارد

بدن جاندار شده و به تدریج در ساختارهای بدن تجمع یافته و در غلظت‌های بالا سمیت ایجاد کرده و اثر سمی خود را القا می‌کند. در نتیجه، کاهش اندازه لارو نسبت به نمونه کنترل در غلظت‌های بالاتر مشهودتر است. در مطالعه Ding & Wang (2006) نیز با افزایش غلظت فلز مس، میانگین طول لاروها در مرحله پوست‌اندازی سوم نسبت به نمونه کنترل کاهش می‌یابد و به دلیل ایجاد سمیت فلز مس می‌توان نتیجه را که مشاهده روند کاهش در طول لاروها در مقایسه با نمونه کنترل است را مطابقت داد.

از طرف دیگر در مطالعه Hosseini *et al.* (2009)، استفاده از دوزهای بالای عصاره زعفران منجر به کاهش میانگین وزن، طول دم و بدن جنین‌های ۳ روزه موش در مقایسه با گروه کنترل گردید.

به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که زعفران، مرحله لاروی مگس سرکه *Drosophila melanogaster* را به طور حیاتی تحت تأثیر قرار می‌دهد. بررسی تغییرات ریخت‌سنجی شامل طول و عرض لاروها در مراحل مختلف تکوین، کاهش معنی‌دار اندازه لاروها، در مقایسه با گروه کنترل را تقریبا در کلیه مراحل نمونه‌گیری در غلظت‌های بالای زعفران نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان ادعا کرد که زعفران در این محدوده از غلظت، یک اثر منفی روی زیست‌پذیری این موجود زنده داشته است. از طرف دیگر در غلظت‌های پایین‌تر که تقریباً شامل غلظت‌های ۱-۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است، شاهد افزایش اندازه لاروها در چندین نمونه‌برداری، در مقایسه با گروه کنترل بودیم. در نتیجه می‌توان ادعا کرد وجود غلظت‌های مذکور زعفران در محیط کشت مگس سرکه می‌تواند اثرات مثبتی بر سیر تکوین این حشره داشته باشد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر ناصر مهدوی شهری و آقای دکتر مجید رجبیان و سرکار خانم دکتر شاهرخ‌آبادی که در تمامی مراحل این تحقیق مرا یاری و راهنمایی نمودند و نیز از مدیریت محترم دانشکده علوم پایه و مدیر محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد که مقدمات اجرای این پروژه تحقیقاتی را در دانشگاه، برای اینجانب ایجاد نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abdullaev, FI.; (2002) Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Exp. Biol Med. 227: 20.

Abdullaev, FI.; (2003) Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). Toxicology in vitro, 17(5-6):751.

Abdullaev, FI.; Gonzalez, D.; Mejia, E.; (1995) Inhibition of colony formation of Hela cells by naturally occurring and synthetic agents. Biofactors, 96; 5(3): 133-38.

Aung, HH.; Wang, CZ.; Ni, M.; Fishbein, A.; *et al*. (2007) Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. Exp Oncol, 29(3): 175-180.

Castaneda, PL.; Munoz, GLE,; Duran, DA.; Heres, PME.; Duenas, GIE.; (2001) LD50 in *Drosophila melanogaster* fed on lead nitrate and lead acetat. Drosophila Information Service, 84: 44-48.

Das, I.; Das, S.; Saha, T.; (2010) Saffron suppresses oxidative stress in DMBA-induced skin carcinoma, A histopathological study. Acta histochemic. a; 112: 317-327.

Day, DM.; Wallman, JF.; (2006) Width as an alternative measurement to length for post-mortem interval estimatios using Calliphora augur (Diptera: Calliphoridae) larvae. Forensic Science International, 159: 158-167.

Ding, L.; Wang, Y.; (2006) Effect of copper on the development, protein and esterase isozymes of *Drosophila melanogaster*. Integrative Zoology, 2:

73-77.

Escribano, J.; Diaz-Guerra, JMM.; Riese, HH.; Ontanon, J.; *et al*. (1999) In vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of Crocus sativus L. Cancer Letters, 144: 107-114.

Fatehi, M.; Rashidabady, T.; Fatehi-Hassanabad, Z.; (2003) Effects of *Crocus sativus* petals'extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. Journal of Ethnopharmacology, 84: 199-203.

Gout, B.; Bourges, C.; Dubreuil, SP.; (2010) Satiereal, a *Crocus sativus* L., extract, reduces snacking and increases satiety in a randomized placebo-controlled study of mildly overweight, healthy women. Nutrition Research, 30: 305-313.

Goyal, SN.; Arora, S.; Sharma, AK.; Joshi, S.; *et al*. (2010) Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultra structural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. Phytomedicine, 17: 227-232.

Hirsch, HVB.; Mercer, J.; Sambaziotis, H.; Huber, M.; *et al*. (2003) Behavioral effects of chronic exposureti low levels of lead in *Drosophila melanogaster*. Neuro Toxicology, 24: 435-442.

Hosseini, SM.; Dashti, MH.; Anvari, M.; Zeinali, F.; *et al*. (2009) Studying teratogenic and abortificant effects of different doses of saffron (*CrocusSativus*) decoction in 1st or 2nd trimesters in mice. Iranian Journal of Reproductive Medicine, 7: 2- 35.

Hosseinzadeh, H.; Younesi, HM.; (2002) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. BMC Pharmacology, 2: 147-155.

Hosseinzadeh, H.; Ziaee, T.; Sadeghi, A.; (2008) The effect of saffron, *Crocus sativus* stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. Phytomedicine, 15: 491-495.

Nezhad Shahrokhabadi, KH.; Tavakol Afshari, J.; Rakhshandeh, H.; Borouk, A.; (2009) Study of cytotoxicity effect of total saffron extract on hepatocarcinoma cell line (hepg2). Medical sciences journal of Islamic Azad University, 19(3)(57): 154-159.

Pitsikas, N.; Boultadakis, A.; Gergiadou, G.; Tarantilis, PA.; *et al*. (2008) Effects of the active constituents of *Crocus sativus L.* in an animal model of anxiety. Phytomedicine, 15: 1135-1139.

Premkumar, K.; (2003) Protective effects of saffron (*Crocus sativus* L.) on genotoxininduced oxidative stress in Swiss albino mice. Phytother Res, 17(6): 614-617.

Premkumar, K.; Thirunavukkarasu, C.; Abraham, SK.; Santhiya, ST.; *et al*. (2006) Protective effect of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice. Hum ExpToxicol, 25(2): 79-84.

Salomi, MJ.; Nair, SC.; Panikkar, KR.; (1991) Inhibitory effects of Nigella sativa and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. Nutr Cancer, 16 (1): 67-72.

Tafazoli, M.; Kermani, T.; Saadatjoo, AR.; (2004) Effects of saffron on abortion and its side effect on mice balb/c. Ofogh-e- danesh, Jornals of University of Medical Sciences and Health Services, 10(3): 52-55.

Takashi, O.; Hiroshi, S.; Ken-ichi, M.; Katsunori, I.; *et al*. (2007) Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. Biochimica ET Biophysica Acta, 1770: 578-584.

Tickoo, S.; Russell, S.; (2002) *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. Current Opinion in Pharmacology, 2: 555-560.