القابلية المضادة للتطفير للجرجير *Eruca sativa* والجزر *Daucus carota* على حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين في البكتريا

الهام عبد الهادي خلف * زهرة محمود الخفاجي **
مصطفى سامي السلماني ***

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٤/١٢/١

الخلاصة

تم دراسة التاثير المضاد للتطفير لعصير نبات الجرجير *Eruca sativa* ومقارنته بعصير الجزر *Daucus carota* على حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين بالمطفر Nitrosoguanidine (NTG) وبمعاملات مختلفة مثل استعمال العصير قبل المعاملة بالمطفر او بعد استعمال المطفر او مع المطفر ، باستعمال نظام تطفير بكتري مكون من ثلاث عزلات G3، G12، G27 حساسة جدا للستربتومايسين اسفرت الدراسة عن ان عصير النباتات المستعمل لم يكن له تاثير على العدد الحي للعزلات ولكن اثر عصير الجزر بشكل طفيف على معامل البقاء (N/No) في حالة العزلة G27. اما التاثير المضاد للتطفير في الجرجير فقد كان واضحا حيث منع حث الطفرات بالمطفر (NTG) تحت المعاملات المختلفة وبشكل مواز لعصير الجزر .

المقدمة

الغذاء نظام معقد يحوي على العديد من المطفرات والمسرطنات والتي تشارك في حث ٣٠ % من السرطانات في الانسان (١) ، والتي يمكن ان تحدث بنسبة ٣٠ % في عمر ٨٥ سنة أي انها من الامراض ذات العلاقة بمعدلات العمليات الايضية (٢) .

ومن جهة ثانية فان الاغذية تحوي ايضا على مضادات التسرطن والتطفير كما أشارت العديد من الدراسات حول العلاقة العكسية بين حدوث السرطان وتناول الاغذية خاصة الحاوية على الكاروتينات Carotenoids او فيتامين A(٣)، وقد وجد ان مضادات التطفير تلعب دورا مهما في معاكسة تاثير العوامل المسببة للسرطان أي انها تعمل كمثبطات للمسرطنات كما اشارت الدراسات التي اجريت باستعمال سلالات ايمس (Ames strains) كنظام لبدائية النواة او فحص بقع الجناح في ذباب الفاكهة *Drosophila*كنظام معقد للخلايا حقيقية النواة (٤ ، ٥).

وفي الاونة الاخيرة ونتيجة التطور الصناعي بشكل خاص وما تلاه من طرح المواد المؤذية للبيئة زاد الاهتمام بمنع السرطانات و هذا يحتاج الى تطوير انظمة سريعة للكشف عن المواد المطفرة والمسرطنة (٣).ولذلك انتشر استعمال الانظمة الميكروبية (Microbial testers) كونها سريعة وتعد من الكواشف الحيوية الحساسة لايضاح اثر المواد في التدمير الحاصل للمواد الوراثية بواسطة المواد المحبة للالكترونات (Electrophils) (٣، ٦) .

ونبات الجرجير *Eruca sativa* من النباتات الورقية لمنطقة البحر المتوسط ، وازداد الاهتمام به في الدول الغربية وغيرها واصبح ينافس الخس (٧ ، ٨) وقد ادخلت زراعته الى العراق في ثمانينات القرن المنصرم ونجحت زراعته ويستعمل الان على نطاق واسع .استهدفت الدراسة الحالية الكشف عن قابلية عصير الجرجير

* باحث-وزارة العلوم والتكنلوجيا
** دكتوراه-استاذ مساعد-معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية-جامعة بغداد
*** طالب ماجستير-معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية-جامعة بغداد

المضادة للتطفير باستعمال الجزر كمعاملة مقارنة في الانظمة البكترية.

المواد وطرائق العمل

النباتات المستعملة :جذور الجزر *Daucus carota* من العائلة الخيمية Umbelliferae (٩) تم شراؤه من الاسواق المحلية لمدينة بغداد .الجرجير *Eruca sativa* من العائلة الصليبية (Cruciferae Brassicaceae) (١٠) تم شراؤه من الاسواق المحلية لمدينة بغداد .

المطفر : استعملت مادة N- methyl – N nitro-nitrosoguanidine(NTG) من شركة Fluka

الستربتومايسين : من شركة Ajanata/ India

الاوساط الغذائية :-

-وسط المرق المغذي Nutreint broth من شركة Mast / England.

-وسط اكر اساس الدم Blood agar base من شركة Mast / England.

نظام التطفير البكتري : نظام مكون من ثلاث عزلات G3، G12، G27 تمثل عزلات تعود لأجناس مختلفة .فالعزلة G3 مكونة للسبورات تعود لجنس *Bacillu* spp اما العزلة G12فتعود الى الجنس *Arthrobacter* spp في حين تعود العزلة G27 الى جنس *Brevibacterium* spp وقد عزلت وشخصت (دراسة تحت النشر) وتمتاز بكونها حساسة للستربتومايسن (١٠ مايكروغرام/ ملليتر) وهي من المزارع الخزينة / معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد / الجادرية .

طرائق العمل :

- تحضير عصير النباتات : تم اخذ ١٠٠ غرام من اوراق الجرجير او جذور الجزر وغسلت بماء الحنفية لإزالة الأتربة والأوساخ ، تم هرسها مبدئيا ثم خلطت بالخلاط الكهربائي (Blender) لمدة ثلاث دقائق على السرعة المتوسطة ، رشح النموذج الناتج خلال طبقات من الشاش الطبي ، ثم تم ترويق العصير بالطرد المركزي بسرعة ٢٠٠٠ دورة بالدقيقة لمدة ٢٠ دقيقة . عقم النموذج بالترشيح (Millipore filter ٠,٢مايكروميتر) ، وقد كان الناتج ٢٠ ملليتر من العصير الذي استعمل طازجا في تجارب التطفير .

عمليات التطفير : تمت التجارب وفق الخطوات الاتية :

١-حضر مزروع لوغاريتمي (٥ ملليتر) لكل من العزلات التي يشملها النظام (OD_{600} 0.15 – 0.17) في وسط المرق المغذي .

٢- تم فصل الخلايا بالطرد المركزي وغسلها بمحلول دارئ الملح الفسلجي Phosphate buffer saline (PBS) باس هيدروجيني (pH) ٥.٥.

٣- علقت الخلايا بعد الغسل بخمس ملليتر من PBSوكانت المعاملات كالاتي :

- **المعاملة الاولى :** معاملة السيطرة السالبة (cont) بدون أي اضافة ، علقت الخلايا المغسولة في ٥ ملليتر من المرق المغذي وعين عدد الخلايا الحي وحضنت بدرجة ٣٧ °م لليوم الثاني

- **المعاملة الثانية :** معاملة السيطرة الموجبة(NTG) استعمل فيها بتركيز ١٠ مايكروغرام / ملليتر كتركيز نهائي ، اضيف الى الخلايا المغسولة والمعلقة في دارىء الفسفات بأس هيدروجيني ٥.٥ وتركت لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ °م ، ثم غسلت الخلايا بمحلول الفوسفات ، ثم علقت في ٥ ملليتر من المرق المغذي وعين عدد الخلايا الحية وحضنت بدرجة حرارة ٣٧° لليوم الثاني للتعبير المظهري (Phenotypic expression)

- **المعاملة الثالثة :** تم تعريض الخلايا المغسولة والمعلقة في دارىء الملح الفسلجي (٥ ملليتر) لعصير الجزر او الجرجير باستعمال ٥٠٠ مايكروليتر وحضنت الخلايا لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ ° م ثم غسلت الخلايا وعلقت في ٥ ملليتر من المرق المغذي (معاملة الجزر ca، معاملة الجرجير J.) وتم تحديد العدد الحي (عند وقت الصفر) وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ ° م لليوم الثاني .

- **المعاملة الرابعة :** تم معاملة الخلايا بعصير النباتات اولا ثم بـ NTG(معاملة الجزر ca/NTG، معاملة الجرجير J/NTG)وكانت المعاملة تتضمن معاملة الخلايا بعصير النباتات اولا لمدة ١٥دقيقة وغسلت الخلايا وعلقت في دارىء الفوسفات ثم عوملت لمدة ١٥ دقيقة بـ NTG (١٠مايكروغرام / ملليتر) ثم غسلت الخلايا بدارىء الفوسفات وعلقت بـ ٥ ملليتر من وسط المرق المغذي وعين عدد

الخلايا الحي في وقت الصفر ، وبعدها حضنت الخلايا لليوم الثاني بدرجة ٣٧ ° م .

- **المعاملة الخامسة** : تم معاملة الخلايا بالمطفر NTG (١٠ مايكروغرام / ملليتر) أولا ثم بعصير النبات (معاملة الجزر NTG/ca ، معاملة الجرجير NTG/J) وكانت المعاملة تتضمن معاملة الخلايا بالمطفر اولا لمدة ١٥ دقيقة ثم غسل الخلايا وتعليقها في دارئ الفوسفات ، ثم عوملت لمدة ١٥ دقيقة بعصير النبات ٥٠٠ مايكروليتر ثم غسلت الخلايا بدارئ الفوسفات وعلقت بـ ٥ ملليتر من وسط المرق المغذي وعين عدد الخلايا الحي في وقت الصفر ، وبعدها حضنت النماذج لليوم الثاني بدرجة ٣٧ ° م

-**المعاملة السادسة** : تم معاملة الخلايا بالمطفر (١٠ مايكروغرام/ملتر) و ٥٠٠ مايكروليتر من عصير النبات سوية لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حوارة ٣٧ ° م (معاملة الجزر والمطفر NTG+ca معاملة الجرجير والمطفر NTG+J ثم غسلت الخلايا بدارئ فوسفات الملح الفسلجي ثم علقت الخلايا بخمسة ملتر من المرق المغذي وعين عدد الخلايا الحي في وقت الصفر ، تم حضنت الخلايا بدرجة ٣٧ م لليوم التالي .تم تحديد عدد الخلايا الحي في اليوم الثاني لكل المعاملات بالاضافة الى تحديد عدد الطفرات المقاومة لـ ١٠ مايكروغرام /ملتر من الستربتومايسين .

التحليل الاحصائي: تم تحليل النتائج باستعمال F-test لمقارنة معدلات عدد الطفرات /ملتر الناتجة وحساب LSD

النتائج والمناقشة

تم مبدئيا تحديد تركيز الستربتومايسين بـ ١٠ مايكرو غرام / ملتر اذ كانت العزلات الثلاثة G3, G12 , G27حساسة لهذا التركيز .تم ايضا تحديد التركيز الملائم في المطفر NTG (١٠ مايكروغرام / ملتر) بحيث لا يكون سلما للخلايا وانما يظهر الفعل التطفيري (١١) .

ويوضح الشكلان ١، ٢ تاثير المعاملات المختلفة مثل معاملة الخلايا بعصير الجرجير او الجزر على العدد الحي بالإضافة الى تاثير المعاملات المختلفة على العدد الحي بعد المعاملة مباشرة للعزلة G3 .اما الشكلان ٣، ٤ فيوضحا تاثير المعاملات المختلفة على العزلة G12، في حين يوضح الشكلان ٥،٦ نتائج التاثير على العزلة G27 . ويلاحظ بصوة عامة ان ليس هناك فروق معنوية بين المعاملات ومعاملة السيطرة الضابطة (السالبة) حيث لم تزداد الفروق بينها عن نصف دورة لوغارتيمية (١٢).

وبغض النظر عدم اهمية تاثير المعاملات على العدد الحي الا ان حساب معامل البقاء Survival Index (N/N_0) يلاحظ ان معاملة خلايا العزلة G27 قد ادى الى الوصول الى حد العتبة Threshold هي ٠,٩٦ والتي تعد الحد الفاصل (Cut off) من كون النموذج غير مؤثر او مطفر ضعيف جدا (١٣) كما موضح في الشكل ٧ بالنسبة لتاثير الجرجير وشكل ٨ بالنسبة لتاثير عصير الجزر ، ويلاحظ ان عصير الجزر لم يكن له أي تاثير على معامل البقاء ، وهذا يمكن ان يعود الى ان نبات الجرجير تتركز فيه النترات بشكل كبير مقارنة بباقي النباتات (٧) ولكن هذا التاثير يمكن ان يعاكسه ان الجرجير يحوي على كميات كبيرة من فيتامين ' اذ يصل مستواه الى ١٣٩-٦٤٣ ملغم /كغم (٧) لذلك فان العزلةG27) , قد تكون مفيدة وحساسة للكشف عن مركبات النتروجين ذات التاثير الضار بالانظمة الوراثية . اما التاثير المضاد للتطفير لمختلف معاملات الجرجير فموضحة في جدول ١ اما تاثير عصير لجزر فموضح في الجدول ٢ .ويلاحظ ان معدلات عدد الطفرات في المعاملات المختلفة تختلف معنويا عن المعاملة الموجبة وهي استعمال المطفر NTG، ولكن يلاحظ انه لم يكن لعصير الجرجيراو الجزر أي تاثير في حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين .

جدول 1 : معدل الطفرات / ملليتر المقاومة للستربتومايسين (10 مايكروغرام/ ملليتر) واقل فرق معنوي تحت معاملات مختلفة من استعمال عصير الجرجير (J)

LSD (0.05)	معدل عدد الطفرات / ملليتر	المعاملة
	G3	
	0	سيطرة سالبة
	0	J
70	0	J/NTG
NS**	16.67	NTG/J
70	0	NTG+J
	83.33	NTG*
	G12	
	0	سيطرة سالبة
	0	J
604.1	16.67	J/NTG
607.5	83.33	NTG/J
224.5	0	NTG+J
	1400	NTG
	G27	
	0	سيطرة سالبة
	0	J
70	0	J/NTG
70	0	NTG/J
70	0	NTG+J
	208.33	NTG

NTG = Nitrosoguanidine (10 µ g / ml)*

NS - Non significant ** غير مهمة معنويا على مستوى 0.05

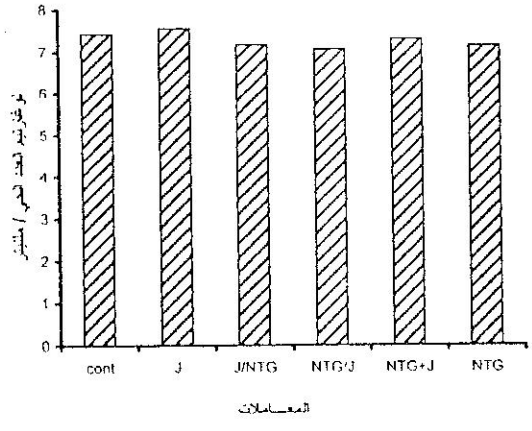
جدول 2 : معدل عدد الطفرات / ملليتر المقاومة للستربتومايسين (10 µ g) واقل فرق معنوي تحت معاملات مختلفة من استعمال عصير الجزر (ca)

LSD (0.05)	معدل عدد الطفرات / ملليتر	المعاملة
	G3	
	0	سيطرة سالبة
	0	ca
32	0	ca/NTG
32	0	NTG/ca
32	0	NTG+ca
	83.33	NTG
	G12	
49.1	0	سيطرة سالبة
	0	ca
49.1	0	ca/NTG
49.1	0	NTG/ca
	0	NTG+ca
	1400	NTG
	G27	
	0	سيطرة سالبة
	0	ca
115.2	0	ca/NTG
161.1	83.33	NTG/ca
115.2	0	NTG+ca
	208.33	NTG

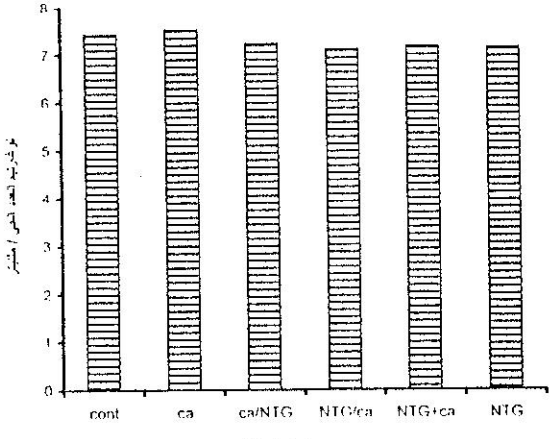
ولكن بصورة عامة يلاحظ ان لعصير الجزر التأثير الإبرز لمختلف المعاملات ولكن كانت هناك بعض الطفرات المستحثة في حالة معاملات الجرجير ولكنها بقيت دون الأهمية الإحصائية مقارنة بالسيطرة الموجبة .

ان القاسم المشترك بين المطفرات والمسرطنات هي كونها مواد محبة للإلكترونات خاصة الشكل النهائي منها الذي يتفاعل مع المواد الوراثية (٦) وعند دراسة تاثير المطفرات لابد من انتخاب الجرع غير المميتة منها (١٤) وقد وجد ان التركيز العام الملائم لكل العزلات هو ١٠ مايكرو غرام / مللتر من NTG الذي يعد مطفرا قويا ويعمل على شوكة التضاعف لاشرطة DNA في وسط حامض(PH) ٥.٥ ونظرا لاعتماد قوة التطفير على تركيب المادة ودرجة قطبيتها (١٥) فان NTG يعد مثاليا لمثل هذه الدراسات بالاضافة الى انه يولد الاورام في القوارض ويعد من المطفرات المباشرة التي لا تحتاج الى تنشيط (٦، ١٦) وبصورة عامة فان مضادات التطفير تقسم الى مثبطات التطفير Desmutagens والقسم الاخر الذي يكون مضادا للتطفير داخل الخلايا Bio:antimutagens (١٧) فهي تعمل في بعض الاحيان في التاثير على المطفر قبل وصوله الى الهدف او تعمل على غلق او اصطياد المسرطنات النهائية Ultimate carcinogens المحبة للالكترونات وتحويلها الى مواد غير مؤذية (٤، ١٨).كما ان مضادات التسرطن او التطفير يمكن ان تعمل بعيدا عن الانظمة الوراثية (epigenetic) ولكنها توثر على التحوير والتعبير الجيني (٦). ومن الاليات الاخرى هو امكانية التنافس بين المواد المسرطنة او المطفرة ومضاداتها من الوصول الى اخاديد واشرطة ال DNA وبالتالي حمايته (١٤).

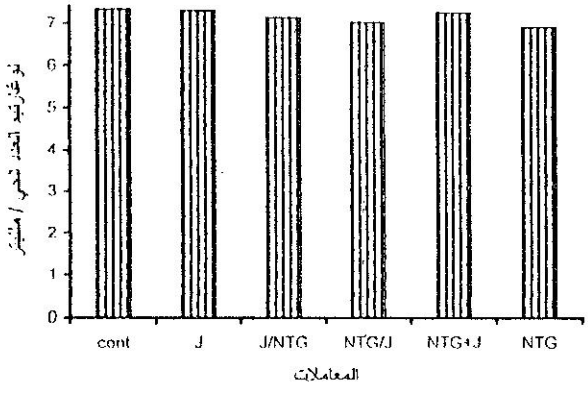
والحقيقة ان كل من عصير الجزر الذي استعمل كمعاملة مقارنة وعصير الجرجير تحتوي على خليط من المواد التي تتأزر في ما بينها للتخلص من التاثيرات السامة للمواد خاصة فيما اذا اقترنت بغذاء قليل السعرات (١٩ ، ٢٠ ، ٢١).



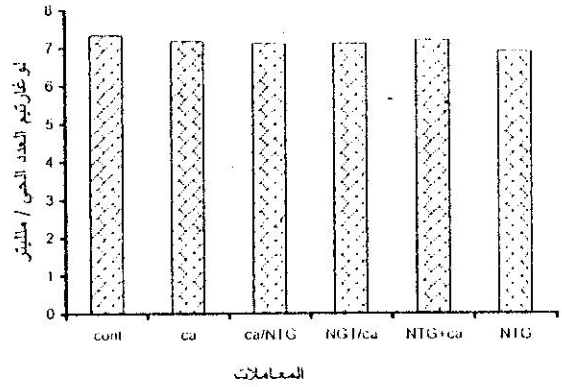
شكل ١ : تاثير المعاملات المختلفة باستعمال عصير الجرجير على العد العيوشي للعزلة G3 .



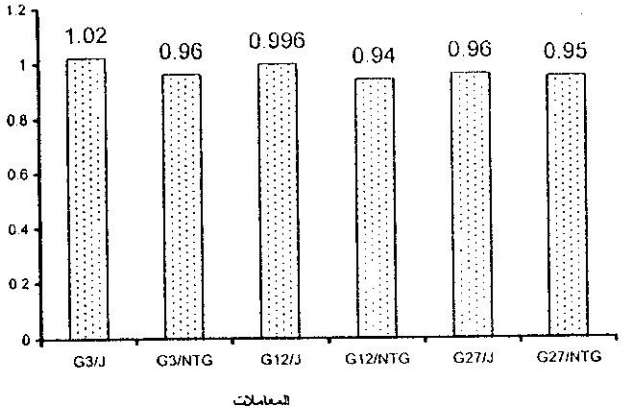
شكل ٢ : تاثير المعاملات المختلفة باستعمال عصير الجزر على العد العيوشي للعزلة G 3 .



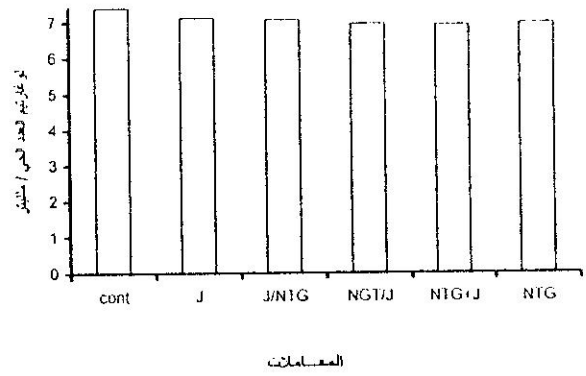
شكل ٣ : تاثير المعاملات المختلفة باستعمال عصير الجرجير على العد العيوشي للعزلة G12



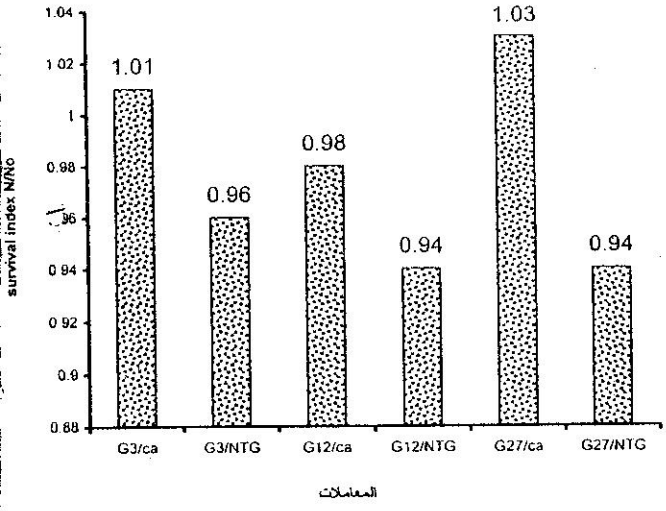
شكل ٤ : تاثير المعاملات المختلفة باستعمال عصير الجزر على العد العيوشي للعزلة G12



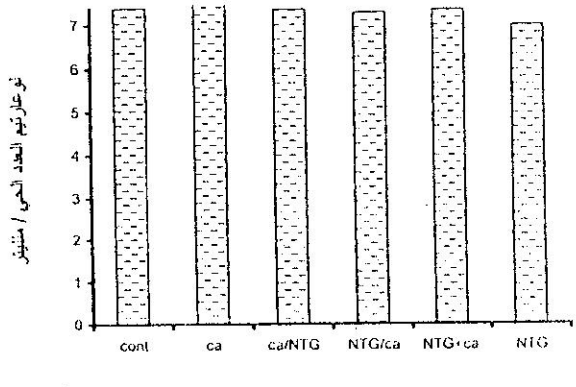
شكل ٧ : تاثير معاملة العزلات بعصير الجرجير على معامل البقاء N/No.



شكل ٥ : تاثير المعاملات المختلفة باستعمال عصير الجرجير على العد العيوشي للعزلة G27 .



شكل ٨ : تاثير معاملة العزلات بعصير الجزر والمطفر على معامل البقاء N/No.



شكل ٦ : تاثير المعاملات المختلفة باستعمال عصير الجزر على العد العيوشي للعزلة G27

References

1. De Marini,D.M.1998.Dietary interventions of human carcinogenesis Mut. Res .400:457-465.
2. Dix ,D., Cohen,R.and Flannery ,J.1980.Role of aging in cancer incidence. J .Theor.Biol. 83:163-173.
3. Knudsen,I .(Ed) .1986.Genetic Toxicology of the Diet. Alan R.Liss.New York.
4. Ames,B.N.1983.Dietary carcinogens and anticarcinogens.Science 21:1256-1263.
5. Karekar, V. Joshi,S. and ShindeS.L.2000.Antimutagenic profile of three antiioxidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test.Mut.Res.468:183-194
6. Felkner, I. C.(Ed) . 1981. Microbial Testers : Probing Carcinogenesis. Marcel Dekker, Inc. :New York ,Basel.
7. Lenzi,A. and Tesi,R.2000.Effect of some cultural factors on nitrate accumulation in rocket(*Diplotaxis temuifalia* L.)DC. *Eruca Sativa* Mill L. Rivista di Agronomia.34:419-424.
8. Parente,A., Serio ,F. and Santamaria,p.2000.A simple way to reduce nitrate content of rocket *Eruca vesicaria* L. subsp. sativa Mill. Atti . v . Giornate .Scientiche, S . O . L . I: 257-278 .
9. مجيد سامي هاشم و محمود مهند جميل .١٩٨٨ . النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي .مطابع دار الثورة . بغداد / العراق .
10. Morales,M.and Janick,J.2002. Arugula a promising specialty leaf vegetable .*In*" Trends in New Crops and New Uses " Eds. J. Janick &A Whipkey.ASHS Press : Alexandria .VA.
11. Sterips,U.N., Laumbach, A.D and Yasbin, R.E. 1981 Bacterial Mutation Monitors for Active Metabolites of Chemical Carcinogens :*B. subtilis*. Assay for Mutation and DNA Repair .*In* " Microbial Testers : Probing Carcinogenesis "Ed. I.C. Felkner. Marcel Dekker , Inc : New York, Basel.
12. Jarvis,B .Lach,V.H and Wood , J.M. 1977.Evaluation of the spiral plate marker for the enumeration of microorganisms in foods .J.Appl.Bact,43:149-157.
13. Leifer,Z. Hyman,J.and Rosenkranz,H.S .1981.Determination of Genotoxic Activity Using DNA Polymerase-Deficient and-Proficient *E.coli*. *In* "Short-Term Tests for Chemical Carcinogens" Eds. H.F.Stich and R.H.C.San. Springer-Verlag: New York, Heidelderg.
14. Ferfguson ,L . R ., Lim , I . F . , Pearson , A. E. Ralph , J. and Harris , P. G.2003 . Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls Mut .Res.542 : 49-58 .
15. Edenharder ,R.Rauscher,R.and Platt,K.I.1997.The inhibition by flavonoids of 2-amino-3- methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen : a structure-activity relationship study. Mut .Res . 379: 21-32.
16. Weaver ,R.F. and Hedrick, P.W.1997.Genetics.3rd edition. Wm .C. Brown Publishers :London, Chicago.
17. Kada,T. Inoue,T., Morita,k. and Namiki,M.1986. Dietary Desmutagens. *In*"Genetic Toxicotogy of the Diet" Ed. I.Knudsen. Alan, R.Liss .Inc.New york.
18. Renner,H.W.1986.Bioassays with an Antimutagenic factors.*In*"Genetic Toxicotogy of the Diet" Ed. I.Knudsen. Alan, R.Liss .Inc.New york.
19. Roe, F.J.C.1981.Are nutritionists worried about the epidemic of

21. Kroon,, P . A . , Faulds , C . B . . Ryden , p . ,Robertson , J . S . and Williamson . 1997 . Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon . J .Agric . Food Chem . 45 : 661 – 667 .

tumors in laboratory animals ? Proc.Nutr.Soc.40.:57-65.

20. Yu,B.B,Masoro,E.J., Murata,I., Bertrand,H.A and F.T 1982. Lifespan study of SPF Fischer – 344 male rats fed ad libitum or restricted diets longevity , growth , lean body mass and disease . J . Gerontology 37 : 130 141 .

Antimutagenicity of Arugula (*Eruca sativa*) and Carrot (*Daucus carota*) Against Induction of Streptomycin Resistant Mutants in the Bacteria

Elham A. Khalaf Zahra M. Al- khafaji
Mustafa S.Al-Salmani

Genetic Engineering and Biotechnology Institute for Postgraduate Studies-University of Baghdad

Abstract

The antimutagenic effect of arugula / salad rocket (*Eruca sativa*) juice on hinduction of streptomycin resistant mutants by Nitrosoguanidine (NTG) was studied in different combinations and in comparison with carrot (*Daucus carota*). The effect was studied using G- system which is a bacterial system consists of three isolates G3, G12, and G27, they are very sensitive to streptomycin (10 µg/ ml). The results revealed that arugula and carrot juices had no effect on the viable counts of isolates , but the arugula juice caused a slight reduction in the survival Index (N/No) for isolate G27 . The results showed that both arugula and carrot juices repressed the induction of streptomycin resistant mutants approximately at the same extent against NTG mutagenesis