-----مجلة علوم الرافدين، المجلد 21، العدد 4، ص87- 105،2010------

دور الكافائين 1,3,7 trimethylxanthine في استحداث ونمو وتمايز كالس السيقان تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L.

فراس حميد خضير

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

Firas_hammed2003@yahoo.com

(تاريخ الاستلام 20/ 5 / 2010 ؛ تاريخ القبول 16 / 8 / 2010)

الملخص

تناولت هذه الدراسة معرفة تأثير الكافائين في استحداث ونمو الكالس من القطع النباتية للسيقان تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. وتمايز الكالس إلى جذور. إذ أبدت القطع النباتية قابلية في استحداث الكالس عند إضافة تراكيز مختلفة من الكافائين إلى الوسط القياسي (MS +0.5 ملغم /لترNAA +1.0 ملغم /لتر BA). وكان أفضلها اعتمادا على الوزن الطري للكالس هو الوسط MS القياسي الحاوي على الكافائين بتركيز 0.5 ملغم /لتر اذ بلغ الوزن الطري 5.176 غم بعد مرور 35 يوم من الزراعة وهذا يفوق الوزن الطري للكالس النامي في الوسط القياسي. ووجد أن إضافة الكافائين إلى الوسط الغذائي الحاوي على (BA) لوحده بتركيز 1.0 ملغم /لتر له تأثير تحفيزي أيضا في استحداث ونمو الكالس. إذ سجل أعلى وزن طري للكالس 3.920 غم على وسط MS المضاف إليه (5.0 ملغم /لتر كافيين+ 1.0 ملغم /لتر BA).

كما وجد أيضا أن إضافة (2,4-D) بتركيز 1.0 ملغم /لتر إلى الوسط الغذائي الحاوي على الكافائين بتركيز 0.5 ملغم /لتر شجع نمو الكالس بدرجة أفضل من الوسط الغذائي الحاوي على (2,4-D) لوحده إذ بلغ الوزن الطري 1.150 غم. في حين لوحظ من خلال النتائج أن إضافة 0.5 ملغم /لتر (NAA) إلى الوسط الغذائي الحاوي على تراكيز مختلفة من الكافائين أدت إلى استحداث ونمو الكالس وتمايزه إلى جذور و كان الوسط الحاوي على 2.5 ملغم /لتر كافائين أفضل وسط في تمايز الكالس إلى جذور و بلغت نسبة التجذير 87.5% .

كما أشارت النتائج إلى مقدرة القطع النامية على الأوساط الغذائية الحاوية على تراكيز مختلفة من الكافائين لوحدها على تكوين الجذور بأعداد و أطوال فاقت إضافة (NAA) والمعروف بدوره الكبير في التجذير. إذ بلغ

معدل طول الجذر 12.6 سم و بأعداد 11جذر في الوسط الحاوي على الكافائين بتركيز 2.5 ملغم /لتر بعد مرور 35 يوما.

الكلمات المفتاحية: زهرة الشمس، كالس، زراعة الأنسجة، الكافائين، إنتاج الجذور.

Role of the Caffeine (1,3,7 trimethylxanthine) on Callus Initiation, Growth and Differentiation from Hypocotyls of Sun Flower *Helianthus annuus* L.

Firas H. Khdheyer
Department of Biology
College of Sciences
Mosul University

ABSTRACT

The present study deals with the effect of caffeine on callus initiation and growth from hypocotyl explants of *Helianthus annuus*, Explants exhibits response for callus initiation when caffeine added to MS medium (MS+0.5 mg/L NAA +1.0mg/L BA). The best was that with 0.5 mg/L caffeine in which the fresh weight of callus reached 5.176g after 35 days of culture . It was Also found that addition of caffeine to MS medium alone with 1.0 mg/L BA enhanced initiation and growth of callus the highest fresh weight was 3.920g obtained when 5.0 mg/L caffeine added with 1.0 mg/L BA .

It was also found that with addition 1.0 mg/L 2,4-D to MS medium containing 0.5 mg/L caffeine callus growth was better than its growth when 2,4-D alone was added, so the fresh weight of callus reached 1.150 g . It was noticed that addition of 0.5 mg/L NAA to MS medium containing different concentrations of caffeine led to initiation of callus, and the callus differentiation of roots specially when 0.5 mg/L was added with 2.5 mg/L caffeine 87.5% root formation was obtained .

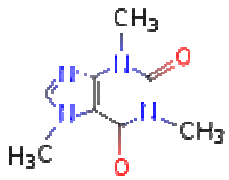
The results cleared that addition of caffeine alone with different concentrations to MS medium enhanced root formation. The best medium was that MS with addition of 2.5 mg/L caffeine which enhance 11 roots with 12.6 cm in length that after 35 days .

Keywords: *Helianthus annus*, callus, tissue culture, caffeine, root regeneration.

المقدمة

يعود نبات زهرة الشمس إلى العائلة المركبة (Asteraceae)، موطنه الأصلي منطقة جنوب غرب المكسيك (Heiser, 1976) يمتلك جذر وتدي، الساق اسطوانية مغطاة بزغب وعليها أوراق عريضة ذات عنق ونورة التي تسمى بالقرص وهي مكونة من أزهار شعاعيه وأنبوبية، البذور زيتية تحتوي على كلوسيدات ونسبة 25-55%من الزيت الغني بالأحماض الدهنية غير المشبعة مثل Oleic, Linoleic وكميات قليلة من الفلورين وفيتامينات (A,D,E) و مغنسيوم، حديد، زنك، فسفور و نحاس (Pope *et al.*,2001). استعمل الأطباء قديما البذور في علاج الملاريا وتخفيف الكولسترول في الدم ومنع تصلب الشرايين كما استخدم كمدرر وطارد للديدان وأيضا في علاج السعال والبرد والروماتيزم وفي نمو العظام ومنع تسوس الأسنان، كما تقلل خطر الإصابة بمرض سرطان الرئة (عوف ،2010).

الكافائين (1,3,7 trimethylxanthine) بيورين قلويدي موجود في الطبيعة وبكميات متنوعة في الأوراق والبذور والفواكه لأكثر من 100 نوع من النباتات ويعد الشاي والقهوة والكولا من أهم مصادر الكافائين. التركيب الكيميائي له:



يعتبر الكافائين واحد من أكثر المركبات الايضية استعمالا ويرجح بعض العلماء إلى أن استخدام الكافائين قد يرجع إلى العصور الحجرية (POL's, 2010). إذ يضاف كنكهة في العديد من الصناعات الغذائية والمشروبات الغازية (Kim *et al.*, 2006). كما يدخل في صناعة الشكولاته ومشروبات الطاقة وحديثا دخل الكافائين في صناعة الشامبو والصابون (Lovett, 2005). ويستخدم على نطاق واسع في المستحضرات الصيدلانية فهو يعمل كمنبه تساهم في تنشيط الجهاز المركزي حيث يجعل الشخص يقضا وهذا ما جعله شائع في عدد كبير من البلدان (Nehlig *et al.*, 1992). وقد ذكر تقرير علمي أن شرب فنجان شاي مفيد للمخ إذ يبطي تدهور الخلايا ويحافظ على حدة العقل. كما يعمل الكافائين كموسع للقصبات الهوائية في علاج الربو (Haskell *et al.*, 2007) وأيضا يدخل في معالجة مرض السرطان (Kesavan, 2005) ويقلل من مخاطر الإصابة بأمراض القلب (Greenberg *et al.*, 2007) ومن مخاطر الإجهاض (Rubin, 2008) ومدرر للبول(Griffin and Griffin, 2003). فهو يمتلك عدد من التأثيرات الفسيولوجية على الأعضاء المختلفة للجسم و بتراكيز قليلة

واهم هذه التأثيرات هو تثبيط عمل انزيم Phosphodiestraes و ينتج عن ذلك زيادة في مستوىcAMP في الخلية كما يؤثر على مستوى الكالسيوم في الخلية وعامل مضاد لمستقبلات الادينوسين (Serafin, 1995). وأيضا له فعالية عالية في القضاء على العديد من المسببات المرضية مثل *E. coli* و *Pseudomonas* من خلال تأثيره على DNA وبناء البروتين للكائنات المجهرية وبهذا يكون عمله مشابه لـ *Penicillin* و *Tetracycline*. (Ramanaviciene *et al*., 2003).

ينتج الكافائين إما طبيعيا في أنواع من النباتات أو يتم تحضيره صناعيا من مادة Xanthosine وهي المادة التي تنتج من هدم القواعد النتروجينية للادنين والكوانين ومن ثم تحول هذه المادة إلى 7-Methylxanthosine مرورا 7-Methylxanthine الى Theobromine وأخيرا تبني Caffeine. (Smyth, 1992) .

أما دور الكافائين في النبات فقد لوحظ بان الكافائين يساعد على نمو النبات بصورة جيدة وهذا يعزى إلى أن الكافائين قد يعمل كمبيدات طبيعة تشل وتقتل الحشرات أو الفطريات التي تتغذى على النباتات Frischknecht *et al.*, 1985) كما أن الكافائين يفرز من النباتات إلى التربة وتعمل على تثبيط إنبات البذور وبالتالي تقلل من نمو النباتات التي تنمو بالقرب من النباتات الحاوية على الكافائين وهي ظاهرة تسمى (Allelopathy) وبهذا يعطي للنباتات فرصة أفضل للبقاء (Friedman and Waller, 1983). كما أن الكافائين الموجود في الأوراق والبراعم يعيق الحيوانات من أكل هذه النباتات وذلك لان الكافائين يعتبر ذو طعم مر ومنفر لهذه الحيوانات (Uefuji *et al.*, 2004). كما وجد أيضا أن الكافائين يشجع في إنبات ونمو السبورات لنبات السرخس *Onoclea sensibilis* (Miller and Bassel , 1980).

ويوجد العديد من الدراسات المهمة التي توضح دور الكافائين في زراعة الأنسجة النباتية منها إنتاج الجذور من قطع النبات (explant) وإنبات البذور وأيضا لها دور فعال في انقسام الخلايا النباتية (McCarthy and McCarthy, 2007). ولان الكافائين بيورين طبيعي فانه يمتلك جهد تطفيري في الخلية أسوة ببقية البيورينات وهذا لوحظ من قبل Fries وKihlman (1948) في فطر*Ophiostoma multiannulatum* وأيضا في بعض أنواع البكتريا (*E.coli*) وعلى هذا الأساس استخدم الكافائين لإحداث طفرات لتحسين بعض الصفات لأنواع النباتات سواء كميا أو نوعيا (Kumar and Tripathi, 2004). كما لاحظ Melo عام 2002 بان الكرمُوسومات تكسر إلى قطع كروماتين في الخلايا النباتية المعاملة بالكافائين دراسات أخرى أجريت في المقارنة بين تأثير الكافائين و 2,6-dichlorobenzonitril على الانقسام السايتوبلازمي. وجد بان 2,6-dichlorobenzonitril لها تأثير مثبط مؤقت على مسار ايض الانقسام السايتوبلازمي بينما الكافائين لها تأثير

دائمي على الانقسام السايتوبلازمي. وفي أبحاث أخرى وجد أن الكافائين سبب زيادة في امتصاص الخلية لـ Ca^{+} وأيضا في زيادة نشاط فعاليـة أنزيـم alchohol dehydrogenase في الخلايـا النباتيـة المزروعـة *mayes Zea* (Baxater and Ghang, 2003) .

يهدف البحث إلى معرفة تأثير الكافائين و بتراكيز مختلفة لوحدها أو بوجود منظمات النمو النباتية في انقسام الخلايا النباتية واستطالتها لتكوين الجذور من القطع النباتية و دورها في تكوين الكالس من القطع النباتية بالإضافة إلى معرفة دور هذه المادة في عملية تمايز الكالس وخصوصا في تمايز الكالس إلى جذور.

مواد وطرائق العمل

1- زراعة البذور وإنتاج البادرات المعقمة:

استخدمت بذور نبات زهرة الشمس (*Helianthus annuus* L.) وحددت نسبة إنباتها مسبقا وكانت 100% عقمت البذور بغمرها بالكحول 70% لمدة دقيقتين ثم بعد ذلك نقلت إلى محلول هايبوكلورات الصوديوم (القاصر التجاري) بتركيز 6% والمخفف بالماء المقطر باستخدام 1حجم من القاصر التجاري إلى 1حجم من الماء المقطر لمدة 15 بعد ذلك غسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لإزالة اثر القاصر ثم وضعت البذور على أوراق ترشيح معقمة للتخلص من الماء ثم زرعت البذور في قناني زجاجية معقمة سعة 100سم^3 حاوية على25 سم^3 وسط MS الصلب (Murashige and Skoog, 1962) وتمت كل هذه العملية في جهاز النقل ذو الجو المعقم (Hepaire) حفظت القناني في ظروف الظلام في الحاضنة بدرجة حرارة 20م° بعد إنبات البذور نقلت إلى ظروف الإضاءة بشدة 1500 لوكس لمدة 16 ساعة ضوء يعقبها 8 ساعات ظلام.

2- تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلقية :

تم زراعة قطع السيقان تحت الفلقية بعد 21 يوما من إنبات البذور وبطول 1سم إذ زرعت هذه القطع في قناني زجاجية حاوية الوسط الغذائي القياسي MS الصلب مضافا إليه (BA 1.0ملغم/لتر+NAA 0.5ملغم /لتر، كما استخدم الوسط القياسي MS الصلب مضافا إليه 1.0 ملغم/لتر 2,4-D (Ozyigit *et al*.,2007) وذلـك لاستحداث الكالس. وتمت الزراعة بواقع قطعتين وبأربع مكررات/ معاملة حفظت القناني في حاضـنة النمـو بدرجة حرارة 20 ±2 م في ظروف إضاءة شدتها 1500 لوكس لمدة 16ساعة يعقبها 8 ساعات ظلام .

تحضير الاوساط الغذائية الحاوية على تراكيز مختلفة من الكافائين

استخدمت أوساط غذائية (MS) متعددة لاستحداث الكالس حاوية على تراكيـز متعـددة مـن الكافـائين (0.5, 1.0 ,2.5, 5.0)ملغم /لتر وكما يأتي:

أ – استخدام تراكيز مختلفة من الكافائين في الوسط الغذائي MS بدون اضافة منظمات النمو

ب – استخدام تراكيز مختلفة من الكافائين في الوسط الغذائي MS مضافا إليه (1.0 BA ملغ-م/لتر+ 0.5 ملغم/لتر NAA).

ج – استخدام تراكيز مختلفة من الكافائين في الوسط الغذائي MS مضافا إليه 1.0 ملغم /لتر BA فقط.

د – استخدام تراكيز مختلفة من الكافائين في الوسط الغذائي MS مضافا إليه 0.5 ملغم /لتر NAA فقط.

و – استخدام تراكيز مختلفة من الكافائين في الوسط الغذائي MS مضافا إليه 1.0ملغم/لتر 2,4-D فقط .

تقدير الوزن الطري

تم تقدير الوزن الطري للكالس النامي على الأوساط الغذائية المتعددة الحاوية على تراكيز مختلفة من الكافائين وذلك بعد مرور 35 يوما من زراعتها وحسب الوزن الطري كالاتي:.

الوزن الطري=وزن الكالس المزروع بعد 35 يوماً - وزن الكالس عند الزراعة 1غم.

النتائج

تأثير إضافة الكافائين إلى الوسط MS الخالي من NAA و BA على قطع السيقان تحت الفلقية

أظهرت النتائج في الجدول (1) أن إضافة تراكيز مختلفة من الكافائين 5.0,2.5,1.0,0.5 ملغم /لتر إلى الوسط الغذائي الخالي من منظمات النمو النباتية قد أدت إلى تحفيز تكوين الجذور من القطع النباتية للسيقان تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس باعداد كبيرة وباطوال واقطار تباينت باختلاف تراكيز الكافائين المضافة إلى الوسط الغذائي وفاقت من حيث قطر وطول وعدد الجذور للقطع النباتية النامية على الوسط الغذائي الحاوي NAA فقط والمعروف بدورها الكبير في التجذير الشكل (1-A-). فقد لوحظ أن إضافة 2.5 ملغم /لتر من الكافائين إلى الوسط الغذائي بلغت نسبة التجذير فيها 75% و كان عدد الجذور11 وبطول 12.6 سم بعد مرور 35 يوما من زراعة القطع النباتية.

كما لوحظ أيضا من النتائج أن الكافائين أدى إلى تحفيز تكوين الكالس ولكن بكميات قليلة مقارنة بالوسط القياسي الحاوي على NAA و BA إذ بلغ أعلى وزن طري 0.386 غم عند إضافة الكافائين بتركيز 2.5 ملغم /لتر. في حين لم يلاحظ أي استحداث للكالس عند إضافة NAA لوحده.

الجدول1: تأثير إضافة الكافائين إلى وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو في نمو قطع السيقان تحت الفلقية لنبات *Helianthus annuus* L. بعد مرور35 يوما.

الوسط الغذائي			الوزن الطري (غم)*	نسبة التجذير %	معدل عدد الجذور	معدل طول الجذر (سم)
الكافائين ملغم/لتر	NAA ملغم/لتر	BA ملغم/لتر				
0.0	0.5	1.0	0.201 ±3.256	-	-	-
0.0	0.5	0.0	-	37.5	3.0	2.70
0.5	0.0	0.0	0.044 ± 0.385	37.5	3.0	9.0
1.0	0.0	0.0	0.093± 0.367	62.5	5.0	12.5
2.5	0.0	0.0	0.053 ± 0.386	75.0	11.0	12.6
5.0	0.0	0.0	0.077± 0.326	50.0	8.0	12.0

مقارنة

* بواقع أربعة مكررات لكل تركيز

تأثير إضافة الكافائين إلى الوسط MS الحاوي على 0.5 ملغم /لتر NAA و 1.0ملغم /لتر BA على قطع السيقان تحت الفلقية

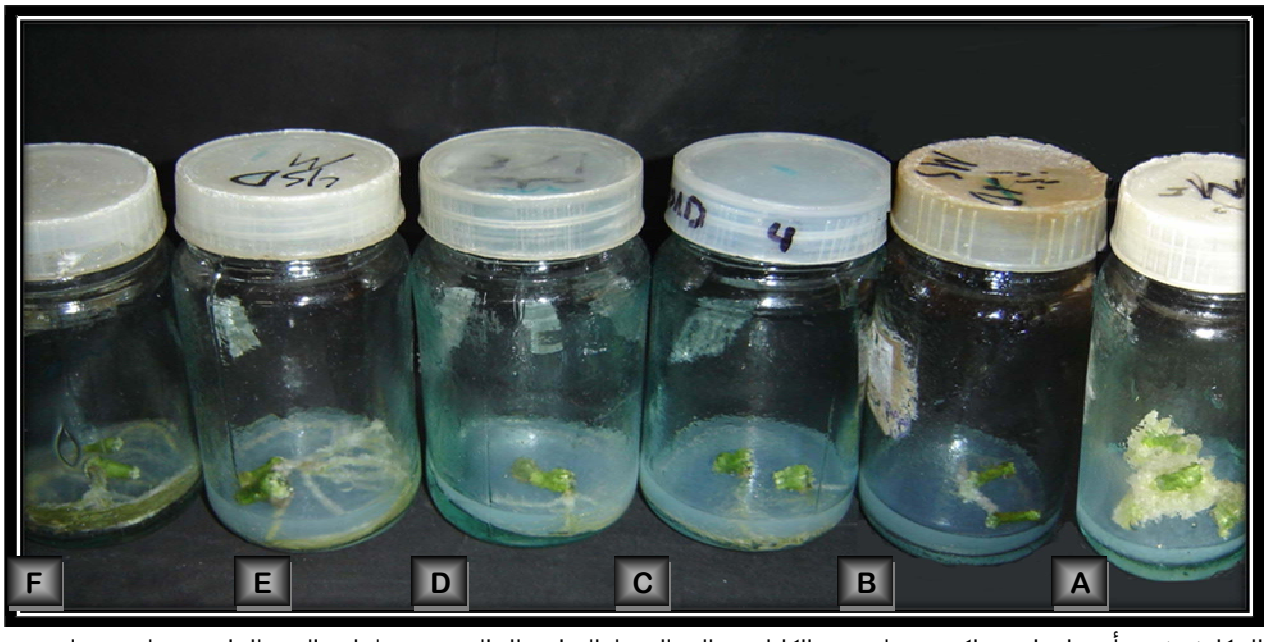
يبين الجدول (2) أن إضافة الكافائين بتراكيز مختلفة إلى وسط MS الصلب حفز تكوين الكالس وبأوزان مختلفة من قطع السيقان تحت الفلقية بعد 35 يوم من الزراعة فاقت في بعض التراكيز من الكافائين الوزن الطري للكالس النامي في الوسط القياسي الحاوي على BA وNAA. إذ لوحظ أن إضافة بعض التراكيز الواطئة والعالية من الكافائين أدت إلى زيادة في الوزن الطري للكالس بلغت 5.176 غم في الوسط الغذائي الحاوي على الكافائين بتركيز 0.5 ملغم /لتر. يليه التركيز 5.0ملغم /لتر إذ سجل الوزن الطري 4.995 غم وذلك بعد مرور 35 يوم في حين أن التراكيز المتوسطة من الكافائين 1و2.5 ملغم /لتر شهدت انخفاضا ملحوظ بالوزن الطري مقارنة بالأوساط الغذائية الأخرى للكافيين. الشكل (1- B-).

كما أشـارت النتائـج أيضا عـدم حدوث أي تمايز للكالـس إلى جذور في جميع الأوسـاط الغذائية الحاويـة علىBA وNAA المضاف إليه تراكيز مختلفة من الكافائين .

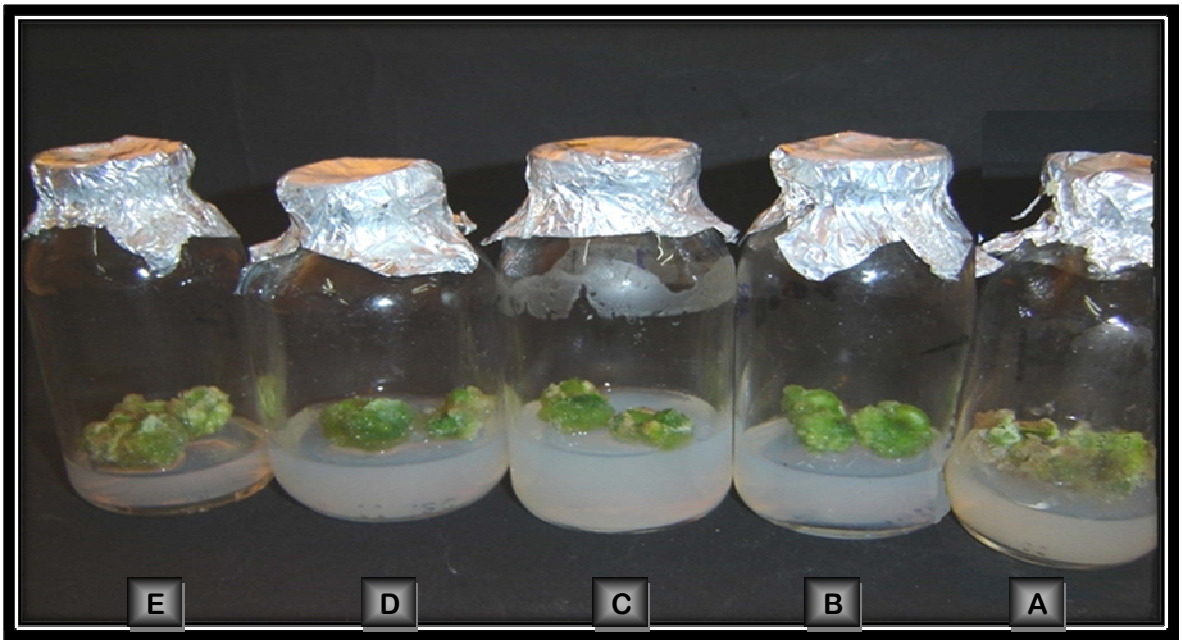
الجدول2: تأثير إضافة الكافائين إلى وسط MSالحاوي على BA , NAA في نمو الكالس لقطع السيقان تحت الفلقية لنبات *Helianthus annuus* L. بعد مرور 35 يوما.

الوسط الغذائي			الوزن الطري للكالس*
الكافائين ملغم/لتر	NAA ملغم/لتر	BA ملغم/لتر	
0.0	0.5	1.0	0.201 ± 3.256
0.5	0.5	1.0	0.389± 5.176
1.0	0.5	1.0	0.178 ± 1.752
2.5	0.5	1.0	0.129 ± 2.727
5.0	0.5	1.0	0.409 ± 4.995

- بواقع أربعة مكررات لكل معاملة.



الشكل1-A: تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الكافائين إلى الوسط الغذائي الخالي من منظمات النمو النباتية في استحداث ونمو كالس السيقان تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس بعد مرور 35 يوم . MS-A حاوي فقط على BA بتركيز 1.0 ملغم/لتر+NAA بتركيز 0.5 ملغم/لتر ; MS -B حاوي فقط NAA بتركيز 0.5 ملغم/لتر MS - C حاوي فقط كافيين بتركيز 1.0 ملغم/لتر : MS- D حاوي فقط كافيين بتركيز 1.0 ملغم/لتر: MS-E حاوي فقط كافيين بتركيز 2.5 ملغم/لتر :F - حاوي فقط كافيين بتركيز 5.0ملغم/لتر.



الشكل B-1 : تـأثير إضـافة تراكيـز مختلفـة مـن الكافـائين إلـى الوسـط الغـذائي القياسـي الحـاوي (BA1.0+NAA0.5) ملغم /لترفي استحداث ونمو كالس السيقان تحت الفلقية لنبـات زهـرة الشمس بعد مرور 35 يوم MS –A القياسي فقـط ; MS -B القياسـي+ كـافيين بتركيـز 0.5ملغم/لتر ; MS - C القياسي+ كافيين بتركيز 1.0 ملغم/لتر : MS- D القياسي+ كـافيين بتركيز 2.5 ملغم/لتر: MS-E القياسي+ كافيين بتركيز 5.0 ملغم/لتر.

تأثير إضافة الكافائين إلى الوسط MS الحاوي على 1.0ملغم /لتر BA على قطع السيقان تحت الفلقية

أظهرت النتائج في الجدول (3) أن الوسط الغذائي الحاوي على BA بتركيز 1.0 ملغم /لتر المضاف إليـه تراكيز مختلفة من الكافائين شجع على استحداث ونمو الكالس بصورة أفضل من إضافة BA لوحـدها. إذ يبـدو واضحا من خلال الجدول بان الوزن الطري للكالس ازداد بصورة عامة بزيادة تركيز الكافائين إلى حد ما فـي الوسط الغذائي. وحصلت اكبر زيادة في الوزن الطري للكالس في الوسط الغذائي الحاوي على الكافائين بتركيـز 5.0ملغم /لتر من الكافائين مع BA إذ بلغ الوزن الطري للكالس 3.920 غم بعد مرور 35 يـوم مـن زراعـة القطعة النباتية كما تميز الكالس بقوامه المتماسك ولونه الاخضر البراق. ولم يلاحظ أي تمايز للكالس في جميع الأوساط الغذائية الحاوية على BA والمضاف إليها تراكيز مختلفة من الكافائين إلى جذور. الشكل (2- A- -)

الجدول 3 : تاثير اضافة الكافائين الى وسط MS الحاوي على BA في نمو الكالس لقطع السيقان تحت الفلقية لنبات *Helianthus annuus* L. بعد مرور 35 يوما.

الوسط الغذائي		الوزن الطري للكالس* (غم)
الكافائين ملغم/لتر	BA ملغم/لتر	
0.0	1.0	1.822 ±0.127
0.5	1.0	1.625 ±0.219
1.0	1.0	1.912 ±0.243
2.5	1.0	1.207 ± 0.309
5.0	1.0	3.920 ± 0.259

*بواقع أربعة مكررات لكل معاملة

تأثير إضافة الكافائين إلى الوسط MS الحاوي على 0.5 ملغم /لتر NAA على قطع السيقان تحت الفلقية

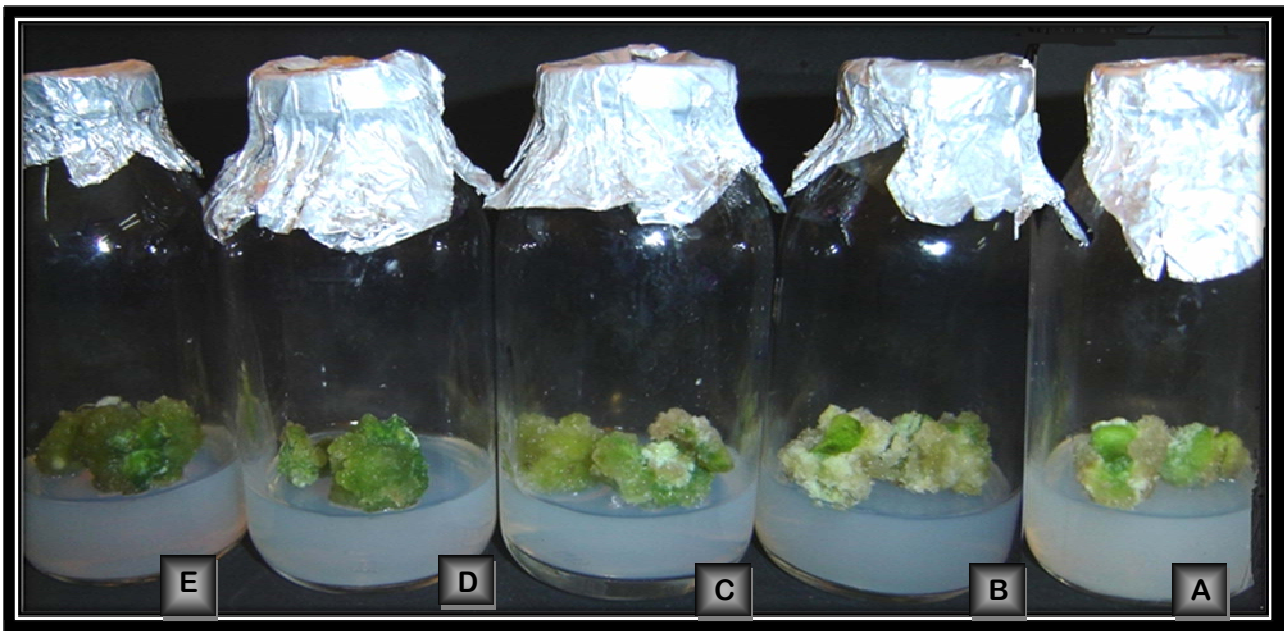
يشير الجدول(4) أن الوسط الغذائي الحاوي على NAA المضاف إليه تراكيز مختلفة من الكافائين قد شجعت نمو الكالس بدرجة اقل من الكالس النامي على الوسط الغذائي القياسي الحاوي على BA+NAA باستثناء الوسط الغذائي الحاوي على الكافائين بتركيز 1ملغم /لتر والمضاف اليه 0.5 ملغم /لتر NAA اذ بلغ معدل الوزن الطري للكالس 3.823 غم مقارنة بالوسط القياسي الذي حيث بلغ الوزن الطري فيه 3.256 غم ،في حين لم يلاحظ أي استحداث للكالس في الوسط الغذائي الحاوي فقط علىNAA .

كما أظهرت النتائج أيضا قدرة الكالس النامي على التمايز إلى جذور بدرجة كبيرة في جميع الأوساط الغذائية الحاوية NAA والمضاف إليه تراكيز مختلفة من الكافائين. إذ لوحظ بان نسبة التجذير ازدادت مع زيادة تركيز الكافائين ليبلغ أعلى نسبة للتجذير هو 87.5% عند إضافة 2.5 ملغم /لتر من الكافائين. في حين بلغ معدل عدد الجذور 12 جذر وبطول جذر 12.75 بعد مرور 35 يوم من الزراعة. الشكل (2-B-).

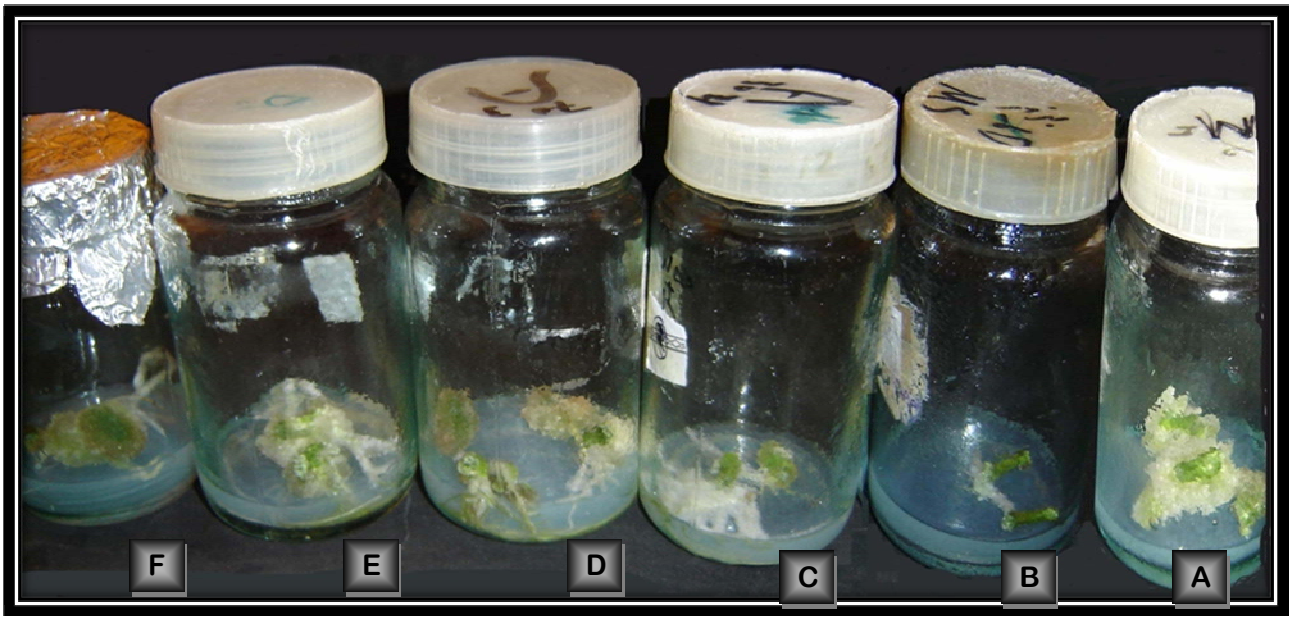
الجدول 4: تأثير الكافائين في الوسط الغذائي الحاوي على 0.5 ملغم/لتر NAA في نمو الكالس لقطع السيقان تحت الفلقية لنبات *Helianthus annuus* L. بعد مرور 35 يوما.

الوسط الغذائي			الوزن الطري (غم)*	نسبة التجذير (%)	معدل عدد الجذور (سم)	معدل طول الجذر (سم)
الكافائين ملغم/لتر	NAA ملغم/لتر	BA ملغم/لتر				
0.0	0.5	1.0 مقارنة مع	0.201 ± 3.256	-	-	-
0.0	0.5	0.0	-	37.5	3.0	2.7
0.5	0.5	0.0	0.014±1.026	32.5	7.0	10.66
1.0	0.5	0.0	0.072±3.823	62.5	10.0	08.16
2.5	0.5	0.0	0.163 ±2.606	87.5	12.0	12.75
5.0	0.5	0.0	0.128 ± 2.530	50.0	2.0	3.25

*بواقع أربعة مكررات لكل تركيز.



الشكل2-A: تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الكافائين إلى الوسط الغذائي الغذائي الحاوي فقط (1.0) ملغم /لتر BA في استحداث ونمو كالس السيقان تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس بعد مرور 35 يوم MS –A الحاوي فقط 1.0 BA ملغم/لتر ; MS -B (1.0 BA + كافيين بتركيز 0.5) ملغم/لتر ; MS -C (1.0 BA + كافيين بتركيز 1.0) ملغم/لتر : MS- D (1.0BA+ كافيين بتركيـز 2.5) ملغـم/لتـر: MS-E (1.0BA+ كافيين بتركيز 5.0) ملغم/لتر.



الشكل2-B: تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الكافائين إلى الوسط الغذائي الحـاوي فقـط (NAA0.5) ملغـم /لترفي استحداث ونموكالس السيقات تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس بعد مرور 35 يوم :MS-A حاوي على BA بتركيز 1.0ملغم /لتر + NAAبتركيز 0.5 ملغم/لتر : MS -B حاوي فقط NAA بتركيز 0.5ملغم/لتر: MS-C(NAA0.5 + كافيين بتركيز 0.5)ملغـم/لتـر : MS- D (NAA0.5+ كافيين بتركيز 1.0)ملغم/لتر: MS-E (NAA0.5+ كافيين بتركيز 2.5)ملغم/لتر :F - MS(NAA0.5+ كافيين بتركيز 5.0)ملغم/لتر

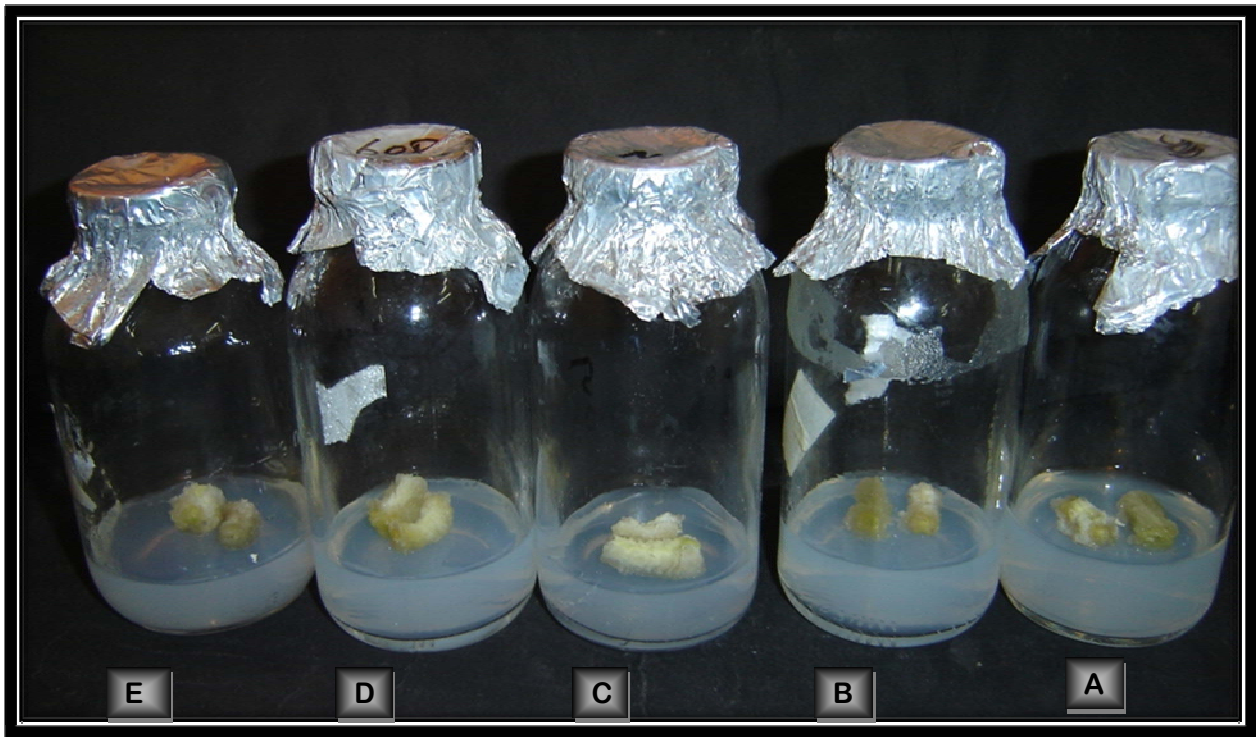
تأثير إضافة الكافائين إلى الوسط MS الحاوي على 1.0ملغم /لتر 2,4-D على قطع السيقان تحت الفلقية

بينت النتائج في جدول (5) أن الوسط الغذائي الحاوي على 2,4-D بتركيز 1ملغم/لتر المضاف إليه تراكيز مختلفة من الكافائين قد أدت إلى استحداث ونمو الكالس و بأوزان متفاوتة فاقت الوزن الطري للكالس في الوسط الغذائي الحاوي على 2,4-D لوحده. إذ لوحظ من الجدول (5) بان إضافة 0.5 ملغم /لتر من الكافائين أدت إلى زيادة في الوزن الطري للكالس بلغ 1.150 غم بعد مرور 35 يوم. أما الوسط MS الحاوي على أعلى تركيز 5.0 ملغم/لتر من الكافائين أدى إلى انخفاض في الوزن الطري للكالس الذي بلغ 0.787 غم وتميز الكالس في جميع التراكيز بلون اصفر شاحب وذا قوام هش. كما لم يلاحظ في جميع الأوساط الحاوية على 2,4-D والمضاف إليه تراكيز مختلفة من الكافائين أي تمايز للكالس إلى جذور. الشكل (C).

الجدول5: تأثير الكافائين إلى وسط MS الحاوي على1.0 ملغم/لتر 2,4-Dفي استحداث ونمو الكالس لقطع السيقان تحت الفلقية لنبات *Helianthus annuus* L بعد مرور 35 يوما.

الوسط الغذائي		الوزن الطري للكالس (غم)*
الكافائين ملغم/لتر	**2,4- D ملغم/لتر**	
0.0	1.0	0.772±0.090
0.5	1.0	0.227±1.150
1.0	1.0	0.047 ± 1.020
2.5	1.0	0.086 ± 1.045
5.0	1.0	0.053 ± 0.787

* بواقع أربعة مكررات لكل معاملة.



الشكل-C: تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الكافائين في الوسط الغـذائي الحـاوي علـى 2,4-D بتركيـز 1.0 ملغم/لترفي استحداث ونمو كالس السيقان تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس بعد مرور 35 يـوم مـن الزراعة.

A- MSحاوي على 1.0 ملغم/لتر 2,4-D فقط.

B- MS حاوي على 2,4-D +كافيين بتركيز 0.5 ملغم/لتر.

C- MS حاوي على 2,4-D +كافيين بتركيز 1.0 ملغم/لتر.

D- MS حاوي على 2,4-D +كافيين بتركيز 2.5 ملغم/لتر.

E- MS حاوي على 2,4-D +كافيين بتركيز 5.0 ملغم/لتر.

المناقشة

هناك مجموعة كبيرة من المركبات العضوية تؤدي إضافتها إلى الوسط الغذائي إلى تحفيز الجزء المزروع فمثلا تضاف بعض المركبات العضوية التي تحتوي على ستة مجاميع من الكاربوكسيل والتي تسمى (Hexitols) إلى الأوساط الغذائية لإحداث تأثيرات متعددة مفيدة في زيادة نمو أنسجة الكالس واستحداث الأعضاء. و أحيانا تضاف بعض القواعد النتروجينية كالبيورين والبايرميدين إلى الأوساط الغذائية، فمثلا يضاف الادنين لبعض

الأوساط الغذائية المستخدمة لاستحداث وادامة الكالس (محمد وعمر، 1990). والكافائين يعتبر من البيورينات تعمل في التراكيز الواطئة كمنظمات نمو نباتية عندما تضاف إلى الأوساط الغذائية (Khursheed *et al.*, 2009) اذ تساهم في انقسام الخلايا النباتية وزيادة عددها من خلال مساهمتها في بناء الصفيحة الخلوية أثناء عملية انقسام الخلية (Lahouti *et al*., 2007). وهذا ما أثبته Stewart (1985) بان الكافائين يمتلك نشاط سايتوكاينيني وذلك عندما أضيف مستخلص أوراق الليمون إلى كالس نبات فول الصويا لاحظ زيادة في نمو لكالس وعند تحليل هذا المستخلص وجد بأنه يحوي على الكافائين الذي يسبب الانقسام الخلوي .

وهذا ما أشارت إليه النتائج إلى أن إضافة الكافائين إلى الوسط الغذائي الخالي من منظمات النمو النباتية قد شجع بدرجة كبيرة تكوين الجذور من قطع السيقان تحت الفلقية لنبات زهرة الشمس والتي فاقت من حيث العدد والحجم الجذور المتكونة من القطع النباتية المزروعة على الوسط الغذائي الحاوي فقط على NAA . والمعروف بدورها الكبير في تحفيز نشوء الجذور واستطالتها (عبدول ، 1987) وهذا يتفق مع ماذكره الباحث Batish وآخرون (2008) بان اضافة الكافائين الى القطع لنبات للفاصوليا قد اسهمت بشكل فعال في تكوين الجذور والسبب يعزى الى ان الكافائين لها تاثير مهم على المحتوى البروتيني ، نشاط انزيمات Proteases و Polyphenol Oxidases ومحتوى المركبات الفينولية الداخلية وهذه تعتبر خطوات حاسمة في تكوين الجذور، اذ يساهم الكافائين في زيادة المحتوى البروتيني فيما يخفض من نشاط انزيم Protease إشارة إلى أن الكافائين يؤثر على ايض البروتين . بينما محتوى المركبات الفينولية الداخلية سوف تقل، اما انزيم Polyphenol Oxidase فيعمل الكافائين على زيادة نشاطه (Batish *et al*., 2008) ، وهو انزيم يعتبر من الانزيمات المشجعة لتكوين الجذور (عبدول ، 1987) وبذلك يعمل الكافائين على زيادة تكوين الجذور. في حين اقترح احد الباحثيين بان الكافائين قد يكون مشابه كيميائيا للاوكسين IAA خاصة في نمو الساق والجذر(Sheena, 2005) وقد وجد الباحث Alabi وآخرون (2010) بان إضافة منقوع التبغ الحاوي على نسبة من النيكوتين والكافائين إلى الوسط الغذائي قد حفز بنسبة عالية تكوين الجذور من قطع نبات Garden croton على الرغم من أن نسبة التجذير وعدد الجذور وحجمها كانت عالية في الوسط الغذائي الحاوي على الكافائين الخالي من منظمات النمو النباتية لكن نسبة استحداث الكالس كانت قليلة جدا وهذا يتفق مع ما توصل إليه Lahouti وآخرون (2007) بان الوزن الطري لكالس القمم النامية لنبات الفاصوليا قل بإضافة التراكيز العالية من الكافائين.

لكن إضافة منظمات النمو النباتية BAو NAAو 2,4-D إلى الأوساط الغذائية الحاوية على الكافائين قد حفز استحداث ونمو الكالس بدرجة كبيرة أفضل من الأوساط الغذائية الغير حاوية على منظمات النمو النباتية وهذا يعود إلى أن الكافائين يعتبر مثبط لأنزيم Phosphodiesterase هذا سوف يزيد من تراكم كميات كبيرة من cAMP في الخلية النباتية (Seiichiro *et al*., 1973) .cAMP المعروف بدوره المهم في عملية انقسام

الخلايا النباتية (Wood *et al.*, 1972) وهذه العملية لا تتم فقط بوجود cAMP بدون إضافة منظمات نمو نباتية إذ أن cAMP لوحدها لا يشجع بدرجة كبيرة انقسام ونمو الخلايا وتكوين الكالس لكن عند إضافة منظمات نمو نباتية الى الوسط الغذائي سوف يؤدي الى تداخل بين cAMP ومنظمات النمو وهذا يشجع بدرجة كبير في نموة وتخصص خلايا الكالس (Seiichiro *et al* ., 1973). إذ تشير البحوث في هذا المضمار بان المستوى الداخلي ل cAMP يحدد لحد ما انقسام او تخصص خلايا الكالس من خلال تأثيره على مستوى الهرمونات النباتية الداخلية.

وعموما يمكن القول بان cAMP يعمل على تنظيم الاوكسينات والسايتوكاينينات بطريقة معينه في نمو وانقسام خلايا الكالس (الصالح ومحمد ،1997) وبينت النتائج أيضا أن إضافة BA لوحده إلى الوسط الغذائي الحاوي على تراكيز مختلفة من الكافائين أدى إلى زيادة في الوزن الطري للكالس 3.920غم عند إضافة 5.0 ملغم /لتر من الكافائين إلى الوسط الغذائي. في حين أن إضافة BA لوحده في الوسط الغذائي أعطى 1.82 غم وهذا يدل على دور الكافائين في زيادة انقسام الخلايا بوجود منظمات النمو النباتية وهذا ما أشار إليـه الباحثـان Vitoria و Mazzafera (1997) بان هناك توافق بين الكافائين والكاينتين في نمو الخلايا المعلقة للسيقان الفلقية لنبات الفجل .

كما أشارت النتائج أيضا أن إضافة الكافائين في الوسط الغذائي الحاوي على BA وNAA قد حفز استحداث ونمو الكالس بنسبة كبيرة بدلالة الوزن الطري والذي بلغت 5.176 غم عند إضافة 0.5 ملغم /لتر كافيين الى الوسط الغذائي .

إن إضافة NAA لوحده إلى الأوساط الغذائية الحاوية على تراكيز مختلفة من الكافائين له تأثير كبير على استحداث ونمو كالس نبات زهرة الشمس اعتمادا على وزنه الطري الذي بلغ 2.930 غم عند إضافة 5.0 ملغم /لتر من الكافائين إلى الوسط الغذائي الحاوي NAA فقط. كما ساهم أيضا إضافة NAA إلى الوسط الغذائي الحاوي على الكافائين إلى تمايز الكالس إلى جذور بلغ طولها 12.75 سم ونسبة تجذير 87.5 سم عند إضافة 2.5 ملغم /لتر من الكافائين وهذا مأكده أيضا الباحث Peter وآخرون (1976) بان إضافة الكافائين إلى الوسط الغذائي الحاوي على IAA والكافائين إلى القطع النباتية لنبات (*Phasealus vulgaris*) قد حفز استحداث وتمايز الكالس إلى جذور .

أما عند إضافة 2,4-D إلى الوسط الغذائي الحاوي على الكافائين أعطت زيادة في الوزن الطري في جميع الأوساط الغذائية الحاوية على تراكيز مختلفة من الكافائين أفضل من الوزن الطري للكالس النامي علـى وسـط 2,4-Dلوحده .لكن لم يحصل اي تمايز للكالس الى جذور في الأوساط الغذائية الحاوية علـى 2,4-D لوحـده او

المضاف اليه تراكيز مختلفة من الكافائين والسبب أن 2,4-D لأنه مركب سريع وفعال فانه يثبط تأثير أي مركب يدخل معه لحدوث التمايز (Ockendon and McClenaghan,1993)

عموما يمكن القول بان تمايز الكالس إلى جذور يعتمد على نوعية الاوكسينات المضافة الى الوسط الغذائي كما تميز الكالس بكونه مفككا وهشا وذا لون اصفر شاحب وهذا يتفق مع ما أشارت إليه الصالح، 1987 بان كالس زهرة الشمس النامي على الوسط الغذائي الحاوي على 2,4-D لا يتميز الكالس إلى جذر وان الكالس النامي كان ذو قوام هش وذو لون اصفر شاحب.

المصادر العربية

الصالح، هناء سعيد عبد الله (1987). تأثير بعض منظمات النمو على النمو ومحتوى البروتين، DNA,RNA والكاربوهيدرات في كالس نبات عباد الشمس *Helianthus annuus* L. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل

الصالح، هناء سعيد ومحمد، عبد المطلب سيد (1997). استخلاص وقياس مركب الادينوسين احادي الفوسفيت الحلقي cAMP في كالس نبات الفستق . *مجلة علوم الرافدين* . **8** (2) ، 12-15.

عبدول، كريم صالح (1987). منظمات النمو النباتية. مديرية دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.ص30

عوف، احمد محمد (2010). موسوعة الأعشاب الطبية. مطبعة ويكي للكتب. مصر.ص23-27

محمد، عبد المطلب سيد و عمر، مبشر صالح (1990). المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأنسجة النباتية. مطبعة دار الكتب، جامعة الموصل / العراق.ص46

المصادر الأجنبية

Alabi, O.A. ; Akinbami, O.A. ; Ogunwenmo , K.O. ; Esan, E.B. (2010). Effects of cigarette tobacco infusion on root regeneration and proliferation of two cultivars of garden croton (*Codiaeum variegatum*). *Asian J. Plant Sci*., **9**, 81-87.

Batish, D. R. ; Singh, H. P. ; Kaur, M.; Kohli, R.K. ; Yadav, S. S.(2008). Caffeine affects adventitious rooting and causes biochemical changes in the hypocotyl cutting of Mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb). *Acta Physiologiae Plantarum* . **30** (3), 401-405.

Baxater, A. ; Ghang, R. (2003). Gene and enhance trap transposable elements reveal oxygen deprivation-regulated gene and their complex patterns of expression in *Arabidopsis*. *Ann.Bot*., **91**, 129-141.

Friedman, J. ; Waller, G.R. (1983). Seed as allelopathic agents. *J. Chem.. Ecol.* **9,** 1107-1115.

Fries, N. ; Kihlman, B. (1948). Fungal mutations obtained with methyl xanthenes *Nature*, **162** (4119), 573-574.

Frischknech, P.M.; Urmer-Dufek, J. ; Baumann, T.W. (1985). Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *coffea Arabica* :expression of an optimal defense strategy. *Phytochemistry* **, 3**, 613-616

Greenberg, J.A .; Dunbar, C.C. ; Schnoll, R.; Kokolis, R.; Kokolis, S. ; Kassotis, J. (2007). Caffeinated beverage intake and the risk of heart diseases mortality in the elderly: a prospective analysis. *Am. J. Clin. Nutr*. **85** (2), 392–398.

Griffin, R. J. and Griffin, J. (2003). Caffeine ingestion and fluid balance: a review. *Journal of human nutria. and diete.* , **16** (6), 411-420.

Haskell, C. F.; Kennedy, D.O.; Wesnes, K.A.; Milne, A. L. ; Scholey, A. B. (2007). A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guarana in humans. *J. Psychopharmacol* **, 21** (1), 65–70.

Heiser, C.B. (1976)." The Sunflower". University of Oklahoma press , USA. pp:198-199

Kesavan, P. C.(2005). Oxygen effect in radiation biology : Caffeine and serendipity. *Current Science*, **89**(2), 318-328.

Khursheed, T. ; Ansari, M.Y.K. ; Shahab, D. (2009). Studies on the effect of caffeine on growth and yield parameter in *Helianthus annuus L*. variety modern. *Biology and Medicine*, **1**, 56-60.

Kim,Y. ; Uefuji, H. ; Ogita, S. ; Sano, H. (2006). Transgenic tobacco plants producing caffeine: a potential new strategy for insect pest control. *Transgenic Res*., **15** , 667-672

Kumar, G. ; Tripathi, A. (2004). Mutagenic response of caffeine in *capsicum annuum* L. *J. Indian Botanical Soc.* , **83**, 136-140.

Lahouti, M. ; Mahmoodzaded, H . ; Jamshidi , S. (2007). Effect of caffeine on structure and ultrastructure of shoot apical meristem of *Phaseolus vulgaris* L. *International J. Botany*. **3**(4) , 379-384.

Lovett, R. (2005). "Coffee: The demon drink". *New Scientist* health (2518). Uk http://www.newscientist.com/article.ns?id=mg18725181.700. Retrieved 2009-08-03

McCarthy, A. A. ; McCarthy, J.G. (2007). The Structure of Two N- Methyltransferases from the Caffeine Biosynthetic Pathway. *Plant Physiology*, **144**(2), 879–889.

Melo, J. (2002) Unified view of the DNA –damage checkpoint. Curr. Opin .*Cell Boil*. **14** ,243-245.

Miller, J. H.; Bassel, A. R. (1980). Effect of caffeien on germination and differentiation in spores of the fern (*Onoclea sensibilis*), *Physiol. Plant*., **50**, 213-220 .

Murashige, T. ; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay Tobacco tissue Culture. *Physiol .plant*., **15**:473-497.

Nehlig, A. ; Daval, J. L. ; Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: Mechanisms of action, biochemical, metabolic, and psychostimulant effects. *Brain Res Rev*., **17** (2), 139–70

Ockendon , D. J. ; McClenaghan, R. (1993). Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of Brussels (*brassica oleracea* var. *gemmmifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **, 32**, 41-46.

Ozyigit, I. I. ; Gozukirmizi, N. ; Semiz, B. D.(2007). Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African J. Biotechnol.* **, 6** (13), 1498-1502

Peter, J. E .; Crocomo, O.J. ; Sharp, W.R (1976). Effect of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of *Phaseolus vulgaris* tissue culture. *Turrialba*. **26**(4), 337-342.

POL's Fortune Factory (2010). "What is Caffeine". Art company and the eternity. Berlin. http//www.pof fortune factory.com

Pope, K ; Pohl, M. E. ; Jones, J. G. ; Lentz, D. L. ; Von Nagy,C. ; Vega, F. J. ; Quitmyer I. R. (2001) . Origin and Environmental Setting of Ancient Agriculture in the Lowlands of Mesoamerica . *Science*,. **292** (5520), 1370 – 1373

Ramanaviciene, A. ; Mostovojus ,V. ; Bachmatova, I. ; Ramanavicius, A. (2003). Anti-bacterial effect of caffeine on escherichia coli and pseudomonas fluorescens . *Acta Medica Lituanica* **10** (4), 185-188 .

Rubin, R. (2008). "New Studys, Different Outcomes on Caffeine , Pregnancy . News Health & Behavior". newspaper home delivery USA. Gannett. Co. Inc. USA http//www.usatoday.com/news/health/2008-01-20-caffeine_n.htm

Seiichiro; K. ; Naoki, S.; Yoshio, M. (1973). Auxin-induced growth of tuber tissue of Jerusalem artichoke VIII. Role of cyclic AMP in the action of auxin, cytokinin and gibberellic acid. *Plant and Cell physiol.***14**(1), 183-192

Serafin ,W. E. (1995)." Methylxanthines. In : Hardman JG, Limbird LE (editors) . The Pharmacological Basisof the Rapeutics" . New York; McGraw-Hill.; USA pp:387-388

Sheena, (2005). "Effect on Cell Wall Development". Botany Archive. USA http//:www.newton .dep.ant. gov /askasci/bot00/bot00550.htm

Smyth, D. A. (1992) . Effect of methylxanthine treatment on rice seedling growth. *J. Plant Growth Regulation.* **11** (2), 125-128.

Stewart, I (1985). Identification of caffeine in citrus flower and leaves. *J. Agric. Food CHEM*. **33**(6), 1163-1165.

Uefuji, H. ; Sano, H. ;Koizumi, N. ; Shinmyo, A. (2004). "Composite Utilization of a Group of Genes in Biosynthese Pathway of Caffeine" . free pantents online. USA http//: www.free patents online.com

Vitoria, A. P. ; Mazzafera, P. (1997). Cytokinin –like effects of caffeine in bioassays . *Biologia Plantarum*. **40**(3), 329-335 .

Wood, H. N. ; Lin, M.C.; Braun, A.C. (1972). The Inhibition of Plant and Animal Adenosine 3́:5́-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterases by a Cell-Divison –Promoting Substance from Tissue Of Higher Plant Species. *Proc. Nat. Acad.Sci*. **69**(2), 403-406