الباب السادس

السيتوكينينات

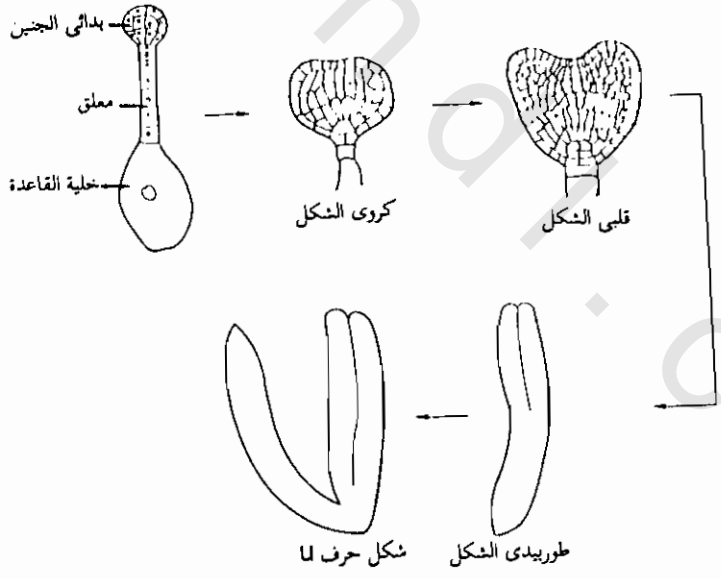
CYTOKININS

هى عبارة عن مركبات لها دور أساسى واضح فى أنقسام الخلايا ولكن لها أيضاً وظائف أخرى علاوة على ذلك أنها تسبب كبر حجم الخلايا وأيضاً تؤثر على التشكل وأيضاً لها تأثير على الشيخوخة والازهار والاثمار. أشتق أسم السيتوكينينات من الأسم العلمى لأنقسام الخلايا cell division أى الأسم باللغة اللاتينية cytokin-esis ومعناه إنقسام الخلايا.

كيفية اكتشاف السيتوكينينات:

من التجارب التى أجريت قديماً بصدد دفع خلايا النبات على الانقسام وحدوث النمو كان حوالى سنة ١٩٤١ حيث حاول Van Overbeek وآخرون تنمية خلية البيضة من الكيس الجنينى على بيئة صناعية وكان مصير ذلك هو الفشل . وعندما قاموا بنزع الجنين فى مراحل نموه الأولى فأنه لم يمكنهم تنمية هذا الجنين أيضاً ولكن عندما عزلوا أو فصلوا الجنين وهو فى الطور الطوربيدى torpedo وأيضاً فى المراحل التى تلى ذلك فقد أمكنهم تنمية هذا الجنين على بيئة صناعية تحتوى على مجموعة من المركبات منها مركبات عضوية (شكل ١٢٢). وبعد ذلك حاولوا تجربة كثير من المركبات لمحاولة تنمية الجنين وهو صغير الحجم ، فقد أمكن عمل ذلك بعد إضافة لبن جوز الهند coconut milk إلى البيئة فقد وجد أن الأجنة فى طورها البدائى يمكن أن تنمو على هذه البيئة. وفى هذه الفترة استنتجوا أن لبن جوز

الهند يحتوى على مركب أو مركبات غير موجودة فى المركبات التى اختبروها وغير معروفة تؤثر على انقسام الخلايا وتكوين الجنين فى مراحل نموه الأولى، وهذه الطرق المستعملة تعتبر أحد أنواع الطرق المسماه بمزارع الانسجة tissue cultures ومما هو جدير بالذكر أنه لم يمكن أيضاً تنمية خلية البيضة على هذه البيئة المحتوية على لبن جوز الهند. قام بعد ذلك Steward ومساعدوه عام ١٩٥٢ بمحاولة لفصل المركب الفعال الذى يسبب إنقسام خلايا النبات من لبن جوز الهند . تم الحصول على مركبين وهما myo - inositol و diphenyl urea وليس لهما أى دور فى أنقسام الخلايا . كما تم عزل مركبات أخرى من لبن جوز الهند مثل بعض الأوكسينات المرتبطة والأحماض الأمينية، وبالتالى فإن هذه المركبات منفردة غير قادره على تنشيط إنقسام الخلايا كما فى حالة لبن جوز الهند . ذلك أن لبن جوز الهند يحتوى على مركبات كثيرة وأن كثير من هذه المركبات يشترك فى تنشيط إنقسام الخلايا وفى تلك الفترة أيضاً أمكن أثبات أن مستخلصات بعض الثمار والبذور أثناء تكوينها تسبب تنشيط إنقسام الخلايا كما هو فى حالة لبن جوز الهند مثل نبات الذرة و *Aesculus* و *Ginkgo* .



(شكل ١٢٢) : خطوات تكوين الجنين فى نبات كيس الراعى *Capsella bursa - pastoris*

قام Skoog ومساعدوه بعمل اختبار لكثير من المركبات الموجودة فى البيئة الطبيعية لاختبار قدرة كل مركب على حده فى حدوث عملية انقسام الخلايا. ولذلك فأنه قد قاموا باختبار عدد كبير جداً من المركبات وبالفعل قد أمكن التوصل إلى أن المركب الموجود فى الأحماض النووية والمعروف باسم أدنين (أحد القواعد النيتروجينية النووية) له قدرة على حدوث انقسام لخلايا نخاع ساق الدخان وأيضاً بعض الأنسجة الأخرى فى نباتات أخرى . كما وجدوا أيضاً أن المركب المشتق منه وهو Adenosine، هو عبارة عن مركب الادنين مرتبط بسكر الريبوز له نفس الكفاءة .

وقد أستمرت التجارب بهذين المركبين لفترة وفى أثناء تجاربهم على herring sperms وهى الحيوانات المنوية لأسماك الرنجة فقد وجد أن عينة قديمة من هذا السائل أى محفوظة لمدة طويلة عند اضافتها للبيئة أمكنها احداث انقسام للخلايا والتأثير عليها، ونتيجة لهذا الاكتشاف فقد استخلصوا السائل المنوى من هذا النوع من السمك فى عينات حديثة وقاموا بتجربة هذه العينات الحديثة فقد وجدوا أنها غير مؤثرة على انقسام الخلايا، ومن هنا استنتجوا أن العينة القديمة قد حدث فيها تحلل لـ DNA للحيوانات المنوية (الجاميطات الذكرية) وأن ناتج تحلل الـ DNA وليست الـ DNA نفسه هو الذى يسبب انقسام للخلية وقد استنتجوا أن فى نواتج تحلل الـ DNA مركب يؤثر على انقسام الخلايا، ولم يتمكنوا من معرفة هذا المركب وقاموا بعد ذلك بنشاط ملحوظ لتطبيق هذه القاعدة فقاموا باستخلاص الـ DNA أى الأحماض النووية من السائل المنوى للرنجة، ولتحليلها قاموا بتعقيمها فى الاوتوكلاف فيحدث تحلل للمركبات ، وجدوا بالفعل أن هذه العينات الحديثة بعد تعقيمها بالاتوكلاف فأن ناتج التعقيم كان فعالاً ومؤثراً على أنقسام الخلايا، ومن هذه التجارب اتضح بما لا يدعوا للشك أن نتيجه تحليل الـ DNA تتكون مركبات تؤثر وتنشط انقسام الخلايا.

وقد قاموا بالفعل بعمل محاولات لاستخلاص المركب المسئول عن ذلك ، وفى سنة ١٩٥٥ تمكن Skoog ومساعدوه وخاصة Miller من عزل مركب فى صورة نقية وتركيبه الكيماوى عبارة عن 6-furfuryladenine وقد سمى هذا المركب

تسمية تجارية باسم kinetin وقد وجدوا هذا المركب الاخير لا يؤثر فى انقسام الخلايا الا فى وجود الأوكسين ولكن وجود الاوكسين فقط لا يؤثر على الاطلاق فى انقسام الخلايا مما يدل على أن kinetin هو المركب المحدد لذلك فى انقسام الخلايا، ومن المعروف أن كفاءة kinetin تفوق بكثير كفاءة الادنين أو الادينوزين فى انقسام الخلايا ولذلك يستعمل الآن الكينتين kinetin بكثرة ومما هو جدير بالذكر أن الأدنين والأدينوزين لا يستعملان الآن حيث أن نشاطهما ضعيف جداً .

مما هو جدير بالذكر أيضا أن الكينيتين kinetin لا يعتبر سيتوكينين طبيعى بل يعتبر سيتوكينين صناعى بالرغم من تكونه من DNA الخلايا حيث أنه فى الحالة العادية للكائنات الحية لا ينتج عن الـ DNA كينيتين سواء فى النبات أو الحيوان ولكن فى الظروف الغير طبيعية مثل التعريض للاوتوكلاف وخلافه ينتج الكينيتين.

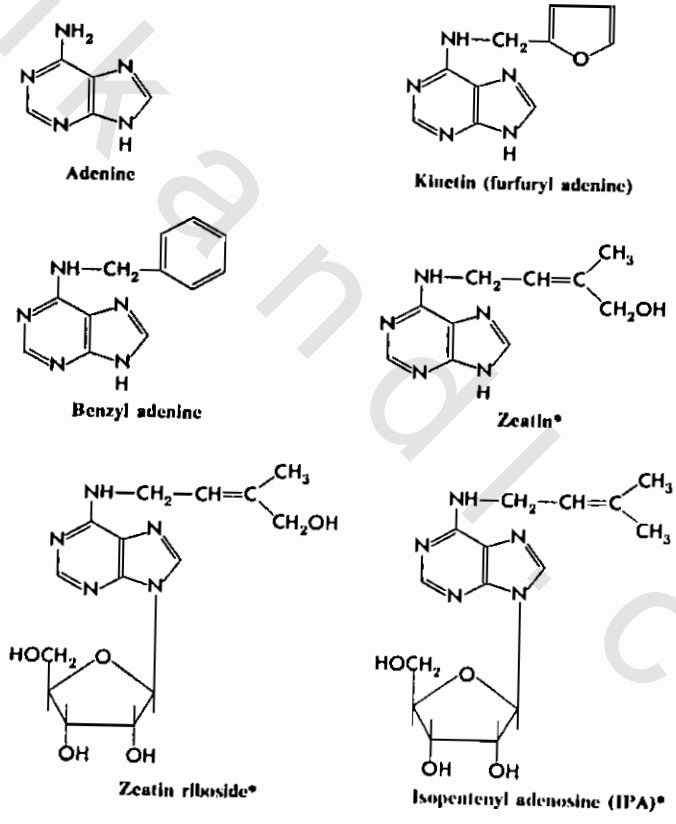
نبذة تاريخية عن اكتشاف السيتوكينينات الطبيعية:

مما سبق يتضح أن اكتشاف السيتوكينينات الصناعية أى التركيبية سبق بوقت كبير نسبياً اكتشاف السيتوكينينات الطبيعية فبعد اكتشاف الكينتين حاول كثير من العلماء استخلاص مركبات مماثلة من مصادر طبيعية وأجريت فى ذلك تجارب كثيرة وقد استخدمت فى ذلك ثمار التفاح والكمثرى الصغيرة حيث أنها تكون نشطة فى الانقسام وتكون مصدر للسيتوكينينات كما استعملت بادرات كثير من النباتات حيث أنها أيضاً تكون نشطة فى الآنقسام، وقد عزلت بعض المركبات وقد كان لها نشاط مؤثر على انقسام الخلايا إلا أن أول مركب طبيعى عزل بصورة نقية وعرف تركيبه وتأثيره بالتفصيل كسيتوكينين طبيعى هو مركب معزول من الحبوب الصغيرة للذرة الشامية فى أثناء تكوينها على الكوز ولأن الذرة الشامية أسمه العلمى *Zea mays* فقد سمى هذا المركب باسم zeatin وكان ذلك بواسطة العالم Letham النيوزيلاندى سنة ١٩٦٤، وبعد ذلك أمكن عزل مركب من حبوب الذرة السكرية وأسمه zeatin riboside، وتعتبر هذه المركبات أول مركبات سيتوكينين طبيعى عزلت بطريقة لا تدع مجال للشك، وأمكن بعد ذلك فى عام ١٩٦٧ من تحليل لبن جوز الهند وأتضح أن هذا المحلول يحتوى على مركب zeatin riboside

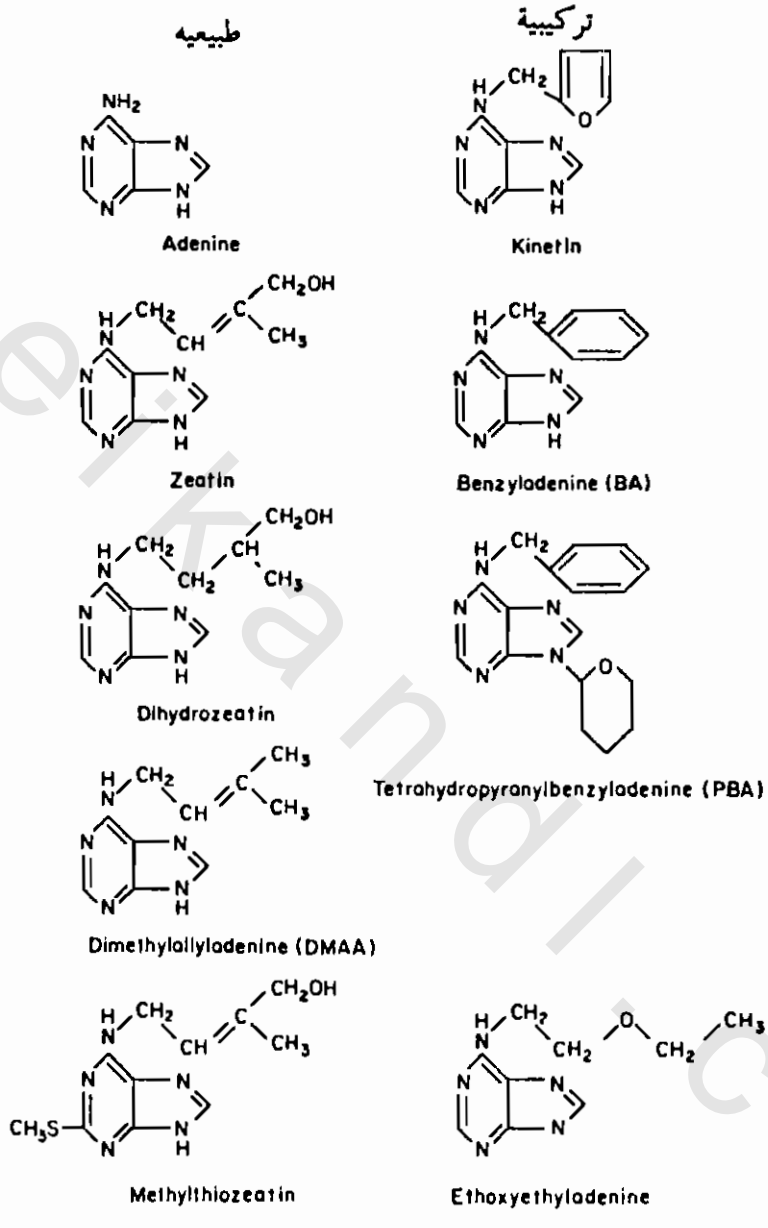
ومن هنا يتضح أن هذا المركب هو الفعال فى انقسام الخلايا كما سبق ذكره فى تجارب مزارع الأنسجة المذكورة سابقاً . والـ zeatin riboside يختلف عن zeatin بأنه مضاف اليه مركب سكر خماسى الريبوز. وبذلك تم التعرف على مركب السيتوكينين الموجود فى لبن جوز الهند بعد ٢٦ سنة.

تقسيم السيتوكينينات :

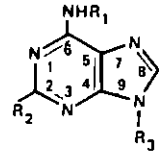
تقسم السيتوكينينات إلى سيتوكينينات طبيعية وهى التى تنتج أساساً بواسطة النبات وسيتوكينينات تركيبيه وهى التى لا تتكون فى النبات ولكنها تخلق صناعياً (أشكال ١٢٣- ١٢٦) .

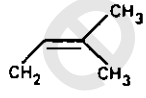
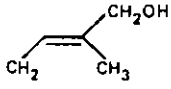
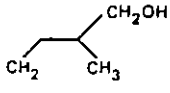
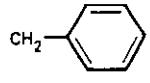
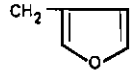
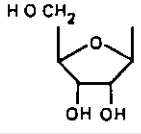


(شكل ١٢٣) : التركيب الجزيئى لبعض مركبات السيتوكينين التركيبية والطبيعية (ذات النجمة).

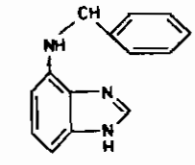


(شكل ١٢٤) : بعض السيتوكينينات الطبيعية والتركيبية.

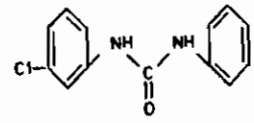


الأستبدلات			الأسم العرفي	الأختصار
R_1	R_2	R_3		
	H	H	N^6 (Δ^2– isopentenyl) adenine	i^6Ade
	H	ribofuranosyl	N^6 (Δ^2– isopentenyl) adenosine	i^6A
	CH_3S	ribofuranosyl	2 methylthio N^6(Δ^2–isopentenyl) adenosine	ms^2i^6A
	H	H	zeatin	io^6Ade
	H	ribofuranosyl	zeatin riboside	io^6A
	H	H	dihydrozeatin	H_2io^6Ade
	H	H	N^6 (benzyl) adenine	bzl^6Ade
	H	H	kinetin	
 H	H		β-D-ribofuranosyl adenosine	

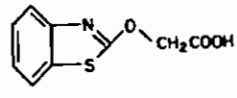
(شكل ١٢٥) : التركيب الجزيئى لبعض السيتوكينينات الطبيعية والتركيبية.



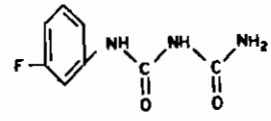
Benzylaminobenzimidazole



Chlorophenylphenylurea



Benzthiazolyloxyacetic acid



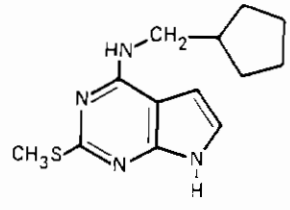
Fluorophenylbiuret

(شكل ١٢٦) : بعض السيتوكينينات التى يدخل فى تركيبها الأدنين.

وعادة تنتج المركبات التركيبية لاستخدامها فى الأغراض الزراعية، ومثال ذلك الكينيتين والبنزيل أدينين وهذا المركب الأخير يستعمل بطريقة أقتصادية فى رش رؤوس البروكولى للاحتفاظ بحيوية النبات لمدة كبيرة أثناء التسويق.

مضادات السيتوكينينات Anticytokinins

وجد أن مركب - 4 - cyclopentylamino-2-methyl thiopyrrolo (2, 3-d) pyrimidine يسبب توقف إنقسام خلايا نخاع ساق التبغ ولذلك يعتبر مضاد للسيتوكينينات (شكل ١٢٧).



(شكل ١٢٧) : مضاد السيتوكينين.

4 - Cyclopentylamino - 2 - methylthiopyrrolo (2,3 - d) - Pyrimidine

كفاءة المركبات المختلفة للسيتوكينينات:

١ ـ من المعروف أن الغالبية العظمى من السيتوكينينات تتكون من أصل هو عبارة عن مركب الادنين ومرتبط به سلسلة جانبية تتكون عادة من خمس ذرات كربون. وقد وجد بالفعل أن المركبات ذات الخمس ذرات كربون الملتصقة بالأدنين هى عبارة عن أكثر المركبات كفاءة فى العمل كسيتوكينينات. وأن تغيير هذا التركيب يؤثر على كفاءة المركب (شكل ١٢٤).

٢ ـ وفى تجارب لزيادة طول السلسلة الجانبية عن خمس ذرات كربون حتى عشر ذرات كربون فقد وجد أن زيادة عدد ذرات الكربون فى السلسلة الجانبية عن خمس ذرات يقلل من نشاط وكفاءة المركب كسيتوكينين ، وقد وجد أن أضافة ذرة أكسيجين فى السلسلة الجانبية كما فى مركب ethoxyethyladenine فقد وجد أن ذرة الاكسجين فى هذه الحالة لا تقلل من كفاءة المركب كسيتوكينين.

٣ ـ وقد وجد أن عمل رابطة مزدوجة فى السلسلة الجانبية لا يقلل من كفاءة السيتوكينين بل قد يزيد النشاط.

٤ ـ وقد وجد أن أضافة حلقة بنزين لهذه السلسلة الجانبية كما فى مركب بنزيل أدينين benzyladenine فأن هذه الحلقة تزيد من كفاءة المركب بقدر كبير حيث أنه من المعروف أن مركب zeatin وهو سيتوكينين طبيعى من أكفأ المركبات الطبيعية فى نشاطها كسيتوكينين ولكن وجد أن مركب بنزيل أدنين أكثر كفاءة من zeatin لوجود حلقة البنزين.

٥ ـ وقد وجد أن أضافة سكر الريبوز إلى zeatin يعطى مركبzeatinriboside أو أضافة سكر ريبوز وحامض فوسفوريك إلى zeatin يعطى مركبzeatinribotide فأن ذلك يقلل من كفاءة الـ zeatin.

٦ ـ وقد وجد أن أدخال مجموعة ميثيل أو مجموعة أمين إلى مركب الادنين يقلل من كفاءة المركب. أما أدخال مجموعة ايدروكسيل OH للمركب فأنه يمنع نشاطه تماماً كسيتوكينين.

٧ ـ ومن المعروف أن الغالبية العظمى للسيتوكينينات يدخل فى تركيبها الادنين ولكن وجد أيضاً بعض من المركبات وهى سيتوكينينات صناعية لا يدخل فى تركيبها الادنين على الاطلاق مثل مركب كلورفينيل فينيل يوريا chlorophenylphenyl urea ومركب فلوروفينيل بيوريت flourophenylbiuret ومركب بنزيل أمينو بنزيميدازول benzylaminobenzi midazole ومركب benzthiazolyloxyacetic acid.

أماكن وجود وتخليق السيتوكينينات:

توجد السيتوكينينات فى الخلايا إلا أنها توجد بتركيز عالى فى الحبوب والثمار الصغيرة السن وأيضاً البذور غير الناضجة، وتوجد فى الجذور وفى بعض افرازات الجذور. أما عن أماكن تخليقها فأنه من الثابت أن قمم الجذور تعتبر هى أماكن تخليق السيتوكينينات ويمكن أن تكون الثمار والبذور. يوجد zeatin فى حبوب الذرة الشامية غير الناضجة أى الصغيرة السن وأيضاً فى إفرازات جذور root exudates نبات عباد الشمس وأوراق نبات البيجونيا *Begonia* وراشح الفطر culture filtrate ريزوبس *Rhizopus roseus* يوجد أيضاً zeatin riboside فى النباتات. حيث يوجد ribofuranosyl فى لبن جذور الهند كما يوجد مركب dihydrozeatin فى بذور الترمس الأصفر yellow lupin.

يمكن أن يوجد السيتوكينين كجزء مكمل لجزيئ RNA الناقل وليست فى صورة حرة منفردة وفى هذه الحالة يوجد فى صورة مركب isopentenyl adenine (IPA)والذى يسمى أيضا بأسم dimethylallylamino purine (DMAA). توجد هذه الحالة فى جزيئ RNA الناقل فى الخميرة والبسلة والذرة ونباتات أخرى. يعتبر هذا المركب مشابه تماما فى تركيبه لمركب zeatin ولكنه يختلف عن المركب الأخير فى نقص مجموعة إيدروكسيد.

أمكن تخليق مركب سيتوكينين فعال وهو methylbutenylamino purine وبعد ذلك وجد هذا المركب فى راشح البكتريا *Corynebacterium fascians* المسببة لمرض التورم والتفلطح فى بعض النباتات.

توجد السيتوكينينات فى راشح البكتريا *Agrobacterium tumefascians* المسببة لمرض التدرن التاجى فى كثير من النباتات مثل العنب والتفاح والكمثرى والخوخ وعباد الشمس كما توجد فى حالة البكتريا *Rhizobium japonicum* المسببة لتكوين العقد الجذرية.

يمكن أن يحمل جزيئ RNA الناقل فى البكتريا *E.coli* هورمون السيتوكينين.

توجد السيتوكينينات بكثرة فى النباتات الراقية . توجد فى جنين وأندوسبرم البذور أثناء تكوينها والمرستيمات القمية والعقد الجذرية بتركيزات كبيرة نسبيا ويقل التركيز كلما زاد عمر عضو النبات أو النسيج. وفيما يلى فى الجدول (رقم ٨) بعض النباتات التى تحتوى هذا الهورمون.

(جدول ٨) : أمثلة لبعض النباتات تحتوي هورمون السيتوكينين

النبات	العضو أو النسيج أو الجزء النباتي
التفاح والبرقوق	الثمار
Ginkgo biloba	النبات الجاميطي المؤنث female gametophyte
البسلة	البادرة
عباد الشمس	إفرازات الجذور
التبغ	خلايا الكمبيوم والأنسجة المتدرنة tumor tissue
الطماطم	عصير الثمار

كيفية انتقال السيتوكينيات:

تختلف السيتوكينينات عن الأوكسينات والجبريللينات فى أنها غير قابلة للحركة الذاتية immobile ولكنها تتحرك أساسا فى نسيج الخشب ابتداء من الجذور فى تيار النتح وتتوزع فى نسيج الخشب فى جميع أجزاء النبات أى أنها تحمل فى تيار النتح

الموجود داخل النبات أى أن حركتها سلبية . وقد أمكن إثبات ذلك فعند حدوث الإدماء bleeding فى حالة ساق نبات العنب فقد وجد أن السائل المائى الناتج من الإدماء يحتوى فعلا على كمية كبيرة نسبيا من السيتوكينينات. وجد أن معاملة أوراق الفاصوليا بواسطة قطرات من محلول بنزيل أدنين مشع وفيه الإشعاع فىّ ذرة الكربون فإن هذا المركب لا ينتشر فى أنسجة الورقة بل يظل محدود فى حركته ويوجد فى مكان القطرة فقط localized.

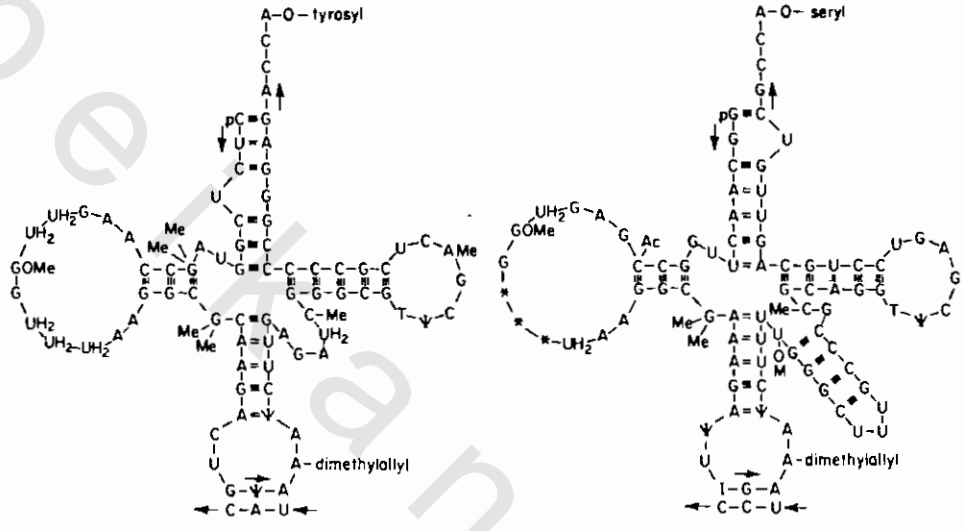
والإدماء هو عبارة عن ظاهرة تساقط وظهور قطرات مائية بعد قطع الساق وخاصة فى منطقة قريبة من سطح التربة. وهذا السائل يخرج من الساق المقطوع من نسيج الخشب ويستمر فى اندفاعه على السطح المقطوع وأن مصدر هذه العصارة والماء الناتج هو نتيجة للضغط الجذرى حيث أنه من المعروف أن صعود العصارة فى النبات هى أساسا للقوة الناشئة عن النتح إلا أن للضغط الجذرى أيضا دور فى صعود العصارة بسيط نسبيا وإلى إرتفاع بسيط ولذلك لا تظهر ظاهرة الإدماء إلا عند قطع ساق النبات على إرتفاعات منخفضة من سطح التربة.

كيفية تكوين السيتوكينين في النبات:

من المعروف أن السيتوكينين فى النبات ينتج عن تحلل بعض الأحماض النووية ولكن وجد أن تركيزه فى النباتات يكون أكبر بكثير من سرعة تحلل الأحماض النووية لتكوين السيتوكينينات. ولذلك فإنه من المعروف أنه توجد طرق أخرى لتخليق السيتوكينينات غير معروفة بالضبط. وقد وجد أن الداى ميثيل أليل أدنين DMAA يتحول إلى zeatin فى وجود فطر عفن الخبز. وكما سبق القول وحتى الآن الطرق السليمة الواضحة لتخليق السيتوكينينات غير معروفة الآن بالتفصيل وبالتأكيد.

ويوجد دليل آخر على كيفية التخليق حيث وجد أنه بأستعمال حامض mevalonic مشع فإن الأشعاع يظهر فى جزيئ RNA الناقل الموجود فى داخل خلايا بكتريا *Lactobacillus* المعاملة. يعتقد أن الإشعاع فى السلسلة الجانبية لهذا الجزيئ الناقل وهى عبارة عن مركب DMAA. كما وجد أنه يمكن إدخال حامض

mevalonic فى تركيب مركب DMAA فى مزارع الأنسجة لنبات التبغ. كما وجد أيضا أنه أمكن إدخال مركب DMAA فى جزيئ RNA الناقل. وقد أمكن عمل الخطوة الأخيرة بواسطة تحضيرات أنزيمية enzyme preparation. ولكن إرتباط DMAA بجزيئ الناقل RNA قد يثبت أو لا يثبت تخليق السيتوكينينات. أى لا يثبت كيفية تخليق السيتوكينينات الحرة (شكل ١٢٨).



(شكل ١٢٨) : RNA ناقل للسيرين والتيروسين. يلاحظ وجود مركب سيتوكينين داي ميثيل أليل أدينين عند قاعدة RNA.

ولا زالت الطريقة الصحيحة لتخليق السيتوكينينات غير واضحة لكن توجد ثلاث طرق أو نظريات أو إتجاهات فى كيفية تخليق السيتوكينين وهى كما يأتى:

الطريق الأول: التخليق الحيوي عن طريق Biosynthesis via tRNA -tRNA :

توجد أنواع عديدة من tRNA تحتوى سيتوكينينات ويمكن أن تكون مصدر للسيتوكينين الحر عند تحولها أوتحللها turnover ولكن لا يمكن أن يكون ذلك هو الطريق الوحيد لتخليق السيتوكينينات الحرة لأسباب عديدة وهى ما يأتى:

أ ـ أن مزارع الأنسجة التى تحتاج إلى مصدر سيتوكينين خارجى أى لابد من إضافة سيتوكينين إلى البيئة النامى عليها النسيج وجد أن هذه الأنسجة تحتوى على tRNA يحتوى سيتوكينينات.

ب ـ أن بعض السيتوكينينات الحرة فى النبات لا يوجد لها مثيل ملتصق بالـ tRNA أو يكون من محتويات RNA.

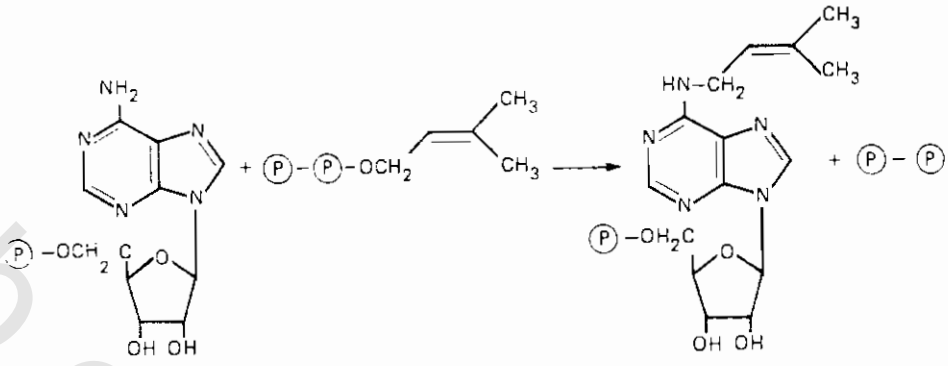
جـ ـ وجد أن مشابه الزيتين فى tRNA النبات له سلسلة جانبية تكون من النوع *cis* والعكس صحيح فى حالة السيتوكينين الحر فى النبات حيث تكون السلسلة الجانبية من النوع *trans* .

د ـ وجد أن سرعة إشتقاق ك^{14} من الأدنين وإرتباطه مع zeatin riboside فى أورام مرض التدرن التاجى فى نبات الونكا *Vinca rosae* تكون عالية جدا ولا يمكن أن تكون نتيجة تحول أو تحلل tRNA - tRNA turnover

الطريق الثانى: التخليق الحيوى من جديد De novo - De novo biosynthesis:

توجد أدلة كثيرة على أن أنسجة النبات تحتوى أنزيمات قادرة على تخليق سيتوكينين حر . وقد أمكن عزل مجموعة من البروتينات من أنسجة نبات تبغ قادرة على تخليق السيتوكينين وقد أمكن التعرف على أنزيم من هذه البروتينات وهو أنزيم.

Δ^2 - isopentenyltransferase: AMP - Δ^2 isopentenylpyro phosphate - يقوم هذا الأنزيم بتحويل AMP- (adenosine monophosphate) ومركب isopentenylpyrophosphate إلى مركب isopentenyl adenosine -5- monophosphate وبيروفوسفات. يعتبر هذا التفاعل هو المدخل فى التخليق الحيوى للسيتوكينين (شكل ١٢٩).



(شكل ١٢٩) : تفاعل بين 5-AMP وبين المركب isopentenylpyrophosphate لأنتاج i6A-5-monophosphate وبيروفوسفات

ويعتبر هذا التفاعل الأساسي والمدخل key step في تكوين السيتوكينين. يحدث ذلك التفاعل بواسطة أنزيم Δ^2 isopentenylpyrophosphate: AMP - Δ^2 - isopentenyltransferase

الطريق الثالث: تخليق حيوى للسيتوكينين فى tRNA

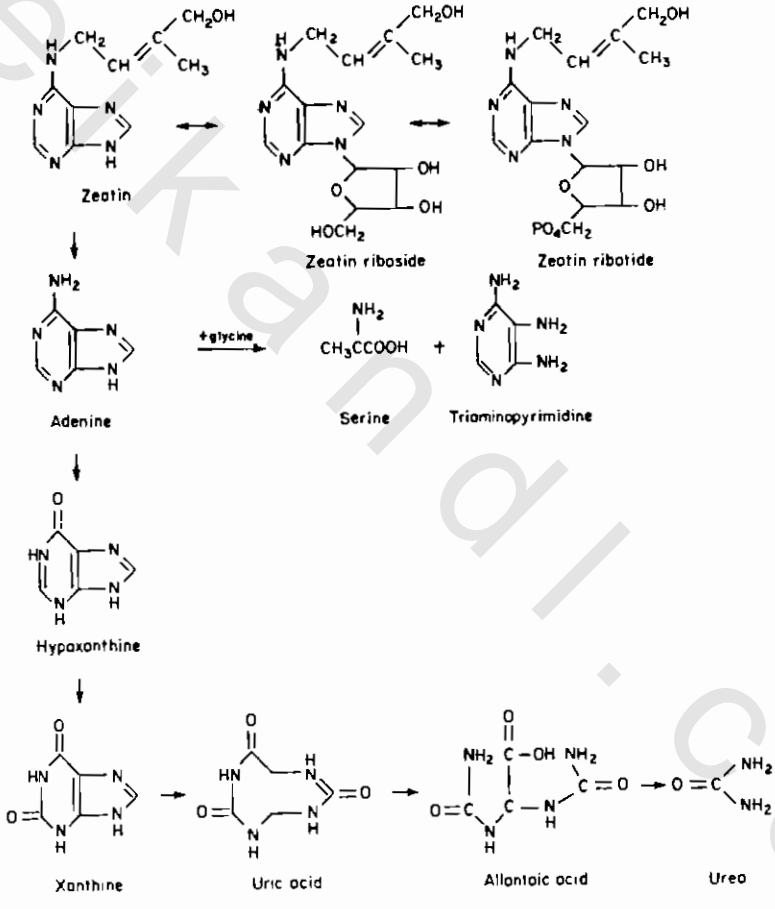
Biosynthesis of cytokinins in -tRNA

عند معاملة أنواع tRNA المحتوية على سيتوكينين بواسطة محلول برمنجنات فإنه ينتج عن ذلك تحطيم السلسلة الجانبية وهى عبارة عن isopentenyl ويتبقى أدينين فقط فى tRNA. أستعمال تحضيرات غير نقية من الأنزيمات crude enzyme preparations المستخلصة من الخميرة أو كبد الفأر أو نخاع ساق نبات التبغ فإنها تسبب إعادة إرتباط هذه السلسلة الجانبية بالأدينين الموجود فى tRNA.

كيفية هدم أو تثبيط السيتوكينينات Degradation or Inactivation of cytokinins:

يمكن التخلص من زيادة تركيز السيتوكينينات بالهدم أو معادلة تأثيرها أى منع نشاطها . وفى حالة الهدم فإنه وجد أن السلسلة الجانبية يمكن أن تنفصل بسهولة عن الأدينين بواسطة الأكسدة الضوئية photooxidation أو فى وجود حامض.

يتحول الأدينين بواسطة زانثين أوكسيديز xanthine oxidase إلى حامض اليوريك uric acid ثم يتحول الأخير إلى allantoic acid ثم يوريا. يوجد تفاعل آخر هو أن تتأكسد ذرة الكربون رقم ٨ وتنفصل عن الجزيئ ليتكون مركب triaminopyrimidineوتتفاعل هذه الذرة المؤكسدة مع الحامض الأميني جليسين لتكون الحامض الأميني سيرين. (شكل ١٣٠). أمكن إثبات ذلك بواسطة آستعمال benzyladenine مشع.



(شكل ١٣٠) : خطوات تحول وهدم الزيتين.

وفى حالة معادلة التأثير فإنه أمكن إثبات وجود glycosides للسيتوكينينات ومثال ذلك جليكوسيد البنزيل أدينين glycoside of benzyladenine وأيضا زيتين جلوكوسيد 7-glucoside of zeatin . ونتيجة للأرتباط بين السيتوكينينات والسكريات لتكوين الجليكوسيدات فإن المركبات الأخيرة تصبح غير نشطة فسيولوجيا وبذلك يحدث معادلة لنشاط السيتوكينين. ومن المعروف أيضا أن بحدوث تحليل hydrolysis لهذه المركبات فى وجود حامض أى acid hydrolysis يتكون سيتوكينين حر نشط. تعتبر هذه الحالة inactivation.

يمكن تكوين مركبات أقل فاعلية فى نشاطها الفسيولوجى بالمقارنة بالزيتين وهى zeatin ribosideوzeatin ribotide . حيث يرتبط الزيتين بسكر الريبوز أو سكر الريبوز وحامض الفوسفوريك (شكل ١٣٠).

يمكن أن يرتبط السيتوكينين بجزيئ RNA ناقل وبالتالى يفقد نشاطه .

طرق أستخلاص السيتوكينينات:

يمكن تصنيف السيتوكينينات تبعا للحالة التى توجد عليها إلى مايأتى:

١ـ سيتوكينين حر Free cytokinin:

وفى هذه الحالة يكون جزيئ السيتوكينين منفرد أى حر وغير مرتبط بأى جزيئ آخر . يمكن فصله فى هذه الحالة بواسطة الأنتشار على طبقة آجار أو جيلاتين. ولكن من المعروف أن قدرة السيتوكينينات على الحركة والإنتشار أو الإنتقال ضعيفة جدا . وهذه الطريقة مثار للجدل . ولذلك لا تستخدم هذه الطريقة .

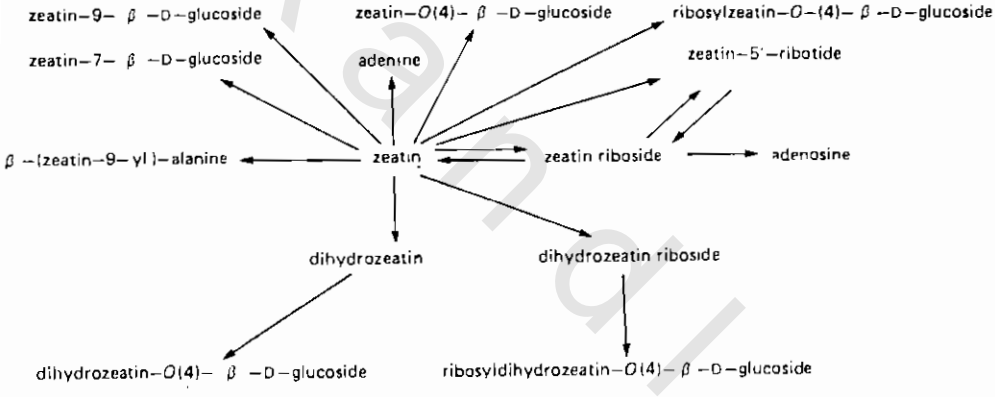
٢ـ سيتوكينين مقيد Bound cytockinin:

وفى هذه الحالة يكون جزيئ السيتوكينين مرتبط بمكون أو جزء آخر فى الخلية ويصعب فصله بالطريقة السابقة ولذلك لابد أن يكون الأستخلاص بالمذيبات العضوية مثل كحول الإيثيل . كثير من السيتوكينينات المستخلصة من النباتات الراقية

قد تم الحصول عليها بهذه الطريقة. حيث يتم إستخلاص RNA الريبوسومى sRNA ثم يتم تحليل المستخلص hydrolysis السابق ويتم الحصول على مكونات fractions مختلفة ومنها مكون رئيسى هو عبارة عن RNA ناقل. يوجد مع بعض أنواع tRNA سيتوكينين مرتبط به وبعملية تحليل أخرى يمكن فصل السيتوكينين عن RNA. بعض أنواع tRNA تحتوى على سيتوكينين وعند تحولها أو تحللها tRNA turnover يتكون منها سيتوكينين حر.

التحول الغذائى للزيتين Zeatin metabolism:

يدخل الزيتين فى تفاعلات عديدة كما يمكن أن يحدث إرتباط الزيتين بمركبات أخرى conjugation. وهذه التفاعلات كما يأتى (شكل ١٣١):



(شكل ١٣١) : خطوات تحول Zeatin إلى المركبات المختلفة.

١ ـ تغيير تركيب السلسلة الجانبية Side-chain modificatin

يمكن تحويل السلسلة الجانبية فى i6Ade وأيضاً فى i6A بواسطة أدخال مجموعة stereospecifically hydroxylated OH ويصبح trans-zeatin وأيضاً trans-zeatin riboside على التوالى. وجد أن هذا التفاعل يحدث فى كثير من الأنسجة النباتية.

يعتبر هذا التفاعل شائع فى النباتات التى تنتج مركبات شبيهة بالزيتين zeatin-like cytokinins وتعتبر الخطوة الأخيرة فى التخليق الحيوى لمركب zeatin-5- mono phosphate.

ويحدث العكس فى حالة tRNA الذى يحتوى سيتوكينين حيث يتم تحويله إلى المشابه الآخر cis-zeatin riboside. يتم التحويل فى جميع الحالات السابقة بواسطة عملية stereospecifcally hydroxylation.

يمكن أن يكون تحويل السلسلة الجانبية للزيتين عن طريق عملية إدخال إيدروجين أى عملية الهدرجة hydrogenation للروابط الغير مشبعة فى السلسلة الجانبية وفيها يتحول الزيتين إلى dihydrozeatin. تحدث هذه الحالة فى جنين بذور الفاصوليا وأيضاً فى الأوراق البالغة لنفس النبات .

قد يكون لهذا التحول أهمية وهو حماية الجزيئ من فصل السلسلة الجانبية عنه.

٢ ـ فصل السلسلة الجانبية Side-chain cleavage

وجد أن الأدنين والأدينوسين يعتبران من نواتج التحول الغذائى لكثير من الأنسجة أو الأجزاء المعاملة بالسيتوكينين. وجد أن أنزيم يحولi6A إلى أدينوسين وذلك بكسر السلسلة الجانبيةisopentenyl ويوجد هذا الأنزيم فى نسيج نخاع ساق التبغ . وجد أنزيم مشابه أمكن عزله وتنقيته من حبوب الذرة الشامية وقد وجد أن هذا الأنزيم له نشاط كبير فى تحويل كثير من السيتوكينينات الطبيعية مثل zeatin, i6A, i6Ade riboside. كما وجد أن هذا الأنزيم لاينشط إلا فى وجود سلسلة جانبية من isopentenyl.

أى أن مركبات السيتوكينين التى ينقصها هذه السلسلة لايعمل عليها هذا الأنزيم. وحيث أن هذا الأنزيم يحتاج إلى الأوكسجين الجزيئ لعمل هذا التفاعل فيسمى سيتوكينين أوكسيديز cytokinin oxidase . وحيث أن السلسلة الجانبية هامة وضرورية لنشاط السيتوكينين فإن هذا الأنزيم يكون هام فى التحكم فى تركيز

السيتوكينين فى داخل الأنسجة النباتية حيث أنه يقلل من تركيز السيتوكينين عند الضرورة . وجد أن الأنسجة التى تحتوى على سيتوكينين بتركيز عال مثل حبوب الذرة الشامية وورم التدرن التاجى فى الونكا تحتوى أيضا على تركيز عال من هذا الأنزيم . يظهر نشاط هذا الأنزيم سريعاً عندمعاملة هذه الأنسجة بواسطة سيتوكينين مشع . وجد أن معاملة نسيج وورم التدرن التاجى فى الونكا خارجياً بواسطة زيتين مشع فيه الإشعاع فى ك١٤ أن جزء كبير جداً من هذا الزيتين تحول إلى أدينين ومشتقاته وأن جزء قليل من هذا الزيتين يستعمل بواسطة هذا النسيج كسيتوكينين. غير معروف حتى الآن بالضبط دور هذا الأنزيم وتكوين أو تخليق السيتوكينينات endogenous cytokinins turnover .

٣- إرتباط السيتوكينين Cytokinins conjugation :

يحدث إرتباط السيتوكينين بالسكريات بكثرة وخاصة الجلوكوز والريبوز. عزلت بكثرة من أنسجة نباتية مركبات

9- ribosides and ribosyl-5- monophosphates of cytokinins.توجد أنزيمات كثيرة يمكنها فصل ribosides وأيضا ribosyl-5-monophosphates المرتبطة مع السيتوكينين. وجد أن السيتوكينينات يمكن أن تتحول إلى nucleoside di and tri-phosphates فى مزارع الأنسجة لخلايا التبغ والجميز cell suspension cultures .

تعتبر glucosides من مرتبطات السيتوكينينات الطبيعية أو التركيبية الهامة. أمكن عزل المرتبط السيتوكينين 7-B-D-glucopyranoside والمرتبط مع الزيتين عند معاملة بادرات فجل بواسطة زيتين مشع به ^{3}H. أمكن أيضا عزل i6 Ade glucoside من خلايا نبات التبغ نامية على ^{14}C-i6 Ade.

وجد المرتبط مع الزيتين المركب 9-B-D-glucopyranoside كناتج للتحول الغذائى metabolite لمركب زيتين مشع ^{3}H-Zeatin معامل به الجذور وأيضا مزارع الأجنة embryo cultures وبادرات الذرة الشامية.

وجد أيضا أن السيتوكينين التركيبى benzyladenine يتحول إلى المرتبط الجليكوسيدى 7,9 and 3-B-Dglucopyranoside فى بادرات الفجل. أمكن عزل وتنقية إنزيم جزئيا من فلقات الفجل يسبب تكوين مركب زيتين 7-B-Dglucopyranoside وذلك من زيتين و UDPglucose.

وجد أيضاً أن مجموعة الأيدروكسيد فى السلسلة الجانبية للزيتين قابلة للأرتباط مع الجلوكوز . أمكن تكوين zeatin - 0(4) - glucoside من معاملة نسيج كالس لفول الصويا بزيتين مشع. وجدت أيضا نفس الحالة فى أوراق الحور *Populus alba* والفاصوليا . علاوة على ذلك وجد فى الأنسجة المذكورة تشبع للسلسلة الجانبية لتكوين ribosyl dihydrozeatin-0(4)-glucoside فى أوراق الحور وتكوين dihydrozeatin-0(4)-glucoside فى أوراق الفاصوليا.

وجد أن إضافة زيتين إلى بادرة *Lupinus augustifolius* يسبب حدوث إرتباط مع حامض أمينى ويتكون B-(zeatin-9-yl)- alanine.

تعتبر cytokinins conjugates أشكال من مركبات لتخزين السيتوكينينات و/ أو نقل السيتوكينينات storage and/or transported forms of cytokinins.

طريقة عمل السيتوكينينات في النباتات:

The mode of action of cytokinins

توجد أربعة احتمالات عن ميكانيكية تأثير السيتوكينينات على النباتات وحتى الآن لم يثبت صحة أى منها بالدليل القاطع وهذه الأحتمالات هى :

١ ـ عوامل الأرتباط بالسيتوكينين Cytokinin - binding factors

يعتقد أن السيتوكينين يرتبط بجزيئات متخصصة مستقبلة specific receptor molecule وبعد ذلك يصبح قادر على إظهار نشاطه . تعتبر هذه النظرية أو هذا الإحتمال عام بالنسبة لمنظمات النمو ومنها على سبيل المثال الأوكسينات أيضا.

ولكن للأسف أجريت كثير من التجارب فى هذا الموضوع ولم يمكن لأى تجربة منها إثبات ذلك بدليل قاطع . حيث وجد فى بعض هذه التجارب أن بعض أنواع من البروتين على درجة عالية من الجذب للسيتوكينين high-affinity cytokinin-binding proteins ولكن لسوء الحظ لم يكن لهذه السيتوكينينات المرتبطة البروتين أى نشاط فسيولوجى أى أنها عديمة التأثير وفيما يلى أمثلة لبعض هذه البروتينات . أمكن عزل بروتين من أجنة القمح ووجد أن له درجة إرتباط عالية مع البنزيل أدينين benzyladenine . وجد أيضاً بروتين كما فى البروتين السابق germ ribosomes فى القمح ووجد أن الوزن الجزيئى للبروتين حوالى ١٨٣ ألف دالتون ويتكون من أربع تحت وحدات subunits . وجد أيضاً عامل إرتباط binding factor ذو درجة إرتباط عالية مع البنزيل أدينين ($Kd1.4x10^{-7}M$) فى نسيج كالس التبغ tobacco callus وأيضاً فى بروتونيما النبات الحزازى القائم فيونازيا *Funaria hygrometrica* . وجد أيضاً حديثاً نسبياً عام ١٩٨١ وجود عامل إرتباط وجذب عال فى أجزاء من ناتج تحلل الميتوكوندريا mitochondrial fraction للبنزيل أدينين ($Kd1x10^{-8}M$) فى بادرات نوع معين من الفاصوليا *Phaseolus aureus* تسمى mung bean .

وكما سبق القول فإن جميع عوامل الإرتباط السابقة لا تعتبر مستقبلات للسيتوكنينين cytokinin receptors لأن إرتباط السيتوكينين بها يفقده نشاطه تماما وكلياً . وعلاقة هذه عوامل الإرتباط بالسيتوكنينين تحتاج إلى تفسير.

٢ ـ التحكم فى النسخ والترجمة Control of transcription and translation

توجد بعض منظمات النمو تتحكم فى تنظيم تخليق البروتين وذلك عن طريق التحكم فى عملية النسخ والترجمة للـ mRNA . وجد فى بعض التجارب أن السيتوكينين يسبب ترجمة لبعض من mRNA الغير مترجم وذلك بربطه بالريبوسومات لتكوين عديد الريبوسومات polysome وبذلك يساعد فى تخليق

البروتين. ولكن وجدت تجارب تثبت عكس ذلك أن السيتوكينين يسبب تنشيط تكوين عديد الريبوسومات ولكن هذا التأثير غير متخصص non specific وقد لايسبب تنشيط تكوين عديد الببتيدات . عامة يعتقد أن للسيتوكينين دور فى تخليق البروتين فى الأوراق .

٣ ـ نقل الأيونات Ion transport

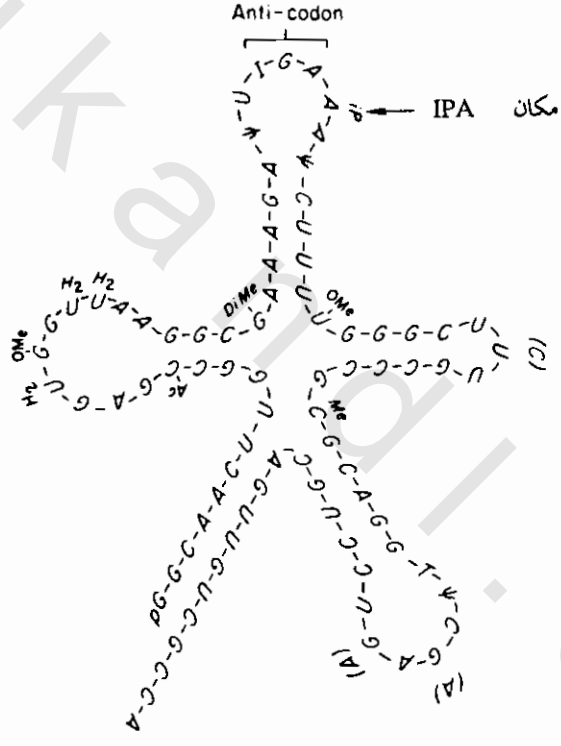
وجد علاقة بين نفاذية أو طرد أوإخراج البروتون proton extrusion وإستطالة الخلية وذلك فى وجود السيتوكينينات. ولكن وجد أيضاً أن إستطالة الخلية ترجع إلى عوامل عديدة وليست فقط لعامل واحد وهو طرد البروتونات وذلك فى فلقات البطيخ المنزوعة.

٤ ـ السيتوكينينات في Cytokinins in tRNA-tRNA

حيث أن السيتوكينينات الطبيعية يكون لها علاقة بالأحماض النووية أو مشتقة منها حيث أمكن إثبات ذلك فى حالة مركب الكينيتين حيث أن ينتج من تحلل الـ DNA. من كل هذه التجارب يتضح أنه يوجد علاقة بين السيتوكينينات والأحماض النووية. ولذلك إتجه العلماء إلى دراسة وتفسير العلاقة بين هذه المركبات والأحماض النووية وقد وجد أن ناتج التحلل لـ DNA لكثير من الكائنات الحية سواء فى النباتات الراقية والكائنات الدقيقة مثل الخميرة والبكتريا *E.coli* والسبانخ والبسلة وغيرها من المصادر. فقد وجد أن Transfer RNA الناقل (tRNA) و Messenger RNA الرسول (mRNA) و Ribosomel RNA الريبوزومى (sRNA). فقد وجد أن RNA الناقل فى حالة تحلل RNA الخميرة و *E.coli* يوجد فيه مركب طبيعى عرف كسيتوكينين وكجزء مكمل للأحماض النووية وللنواة واسمه Isopentenyl-adenosine ويعتبر هذا أول مركب وجد كجزء مكمل للأحماض النووية من نوع الايزوبنتنيل أدينوزين RNA وبالذات tRNA وذلك من ناتج تحلل RNA الخميرة ثم عزل نفس المركب من ناتج تحلل RNA من السبانخ والبسلة

وبعد ذلك وجد أيضاً أنه يوجد علاقة كبيرة بين zeatin riboside وبين tRNA الموجودة فى ناتج تحلل حبوب الذرة السكرية الغير ناضجة. مما سبق يتضح أن هذه السيتوكينينات تكون مرتبطة عادة وأساساً مع tRNA ولاتوجد مع mRNA .

وقد وجد أن tRNA لبعض الأحماض الأمينية يحتاج إلى مركب سيتوكينين والبعض الاخر لا يحتاج . فمثلاً فى حالة tRNA للحامض الأمينى سيرين والحامض الامينى تيروسين والحامض الأمينى أيزوليوسين تحتاج إلى مركب سيتوكينين وهو أيزوبنتنيل أدينوزين IPA (شكل ١٣٢) وهو الداى ميثيل الايل أدينين DMAA

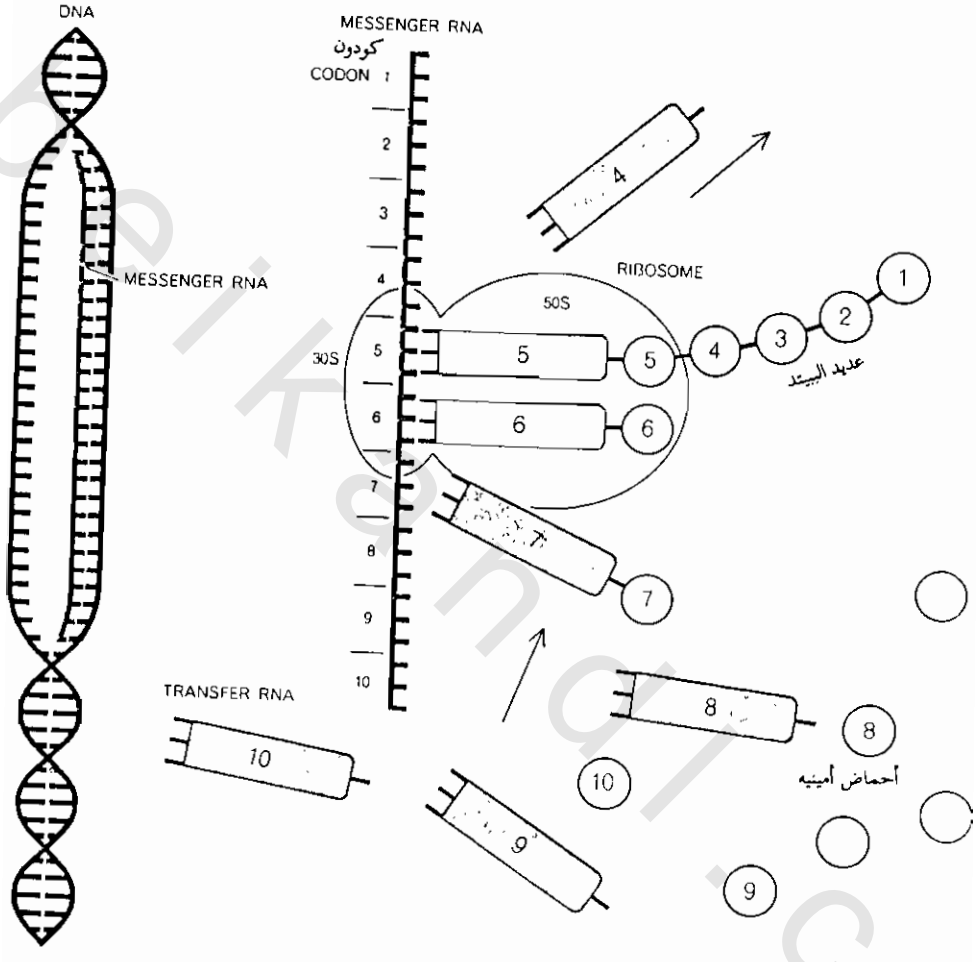


(شكل ١٣٢) : تركيب tRNA الخاص بالحامض الأمينى سيرين. يوضح مكان ألتصاق مركب السيتوكينين IPA.

(شكل ١٢٨). وفى حالة tRNA للحامض الامينى ارجينين وفالين وجليسين وفينيل ألانين لا يتكون أو لا يحتاج إلى مركب سيتوكينينى. .أما أهمية المركب السيتوكينينى لـ tRNA فأنه لابد من وجوده لكى يحدث ارتباط بين مضاد الكودون tRNA anticodon والجزء المخصص له على كودون mRNA. ولفهم أو شرح ذلك سنشرح بطريقة مختصرة طريقة تكوين البروتين.

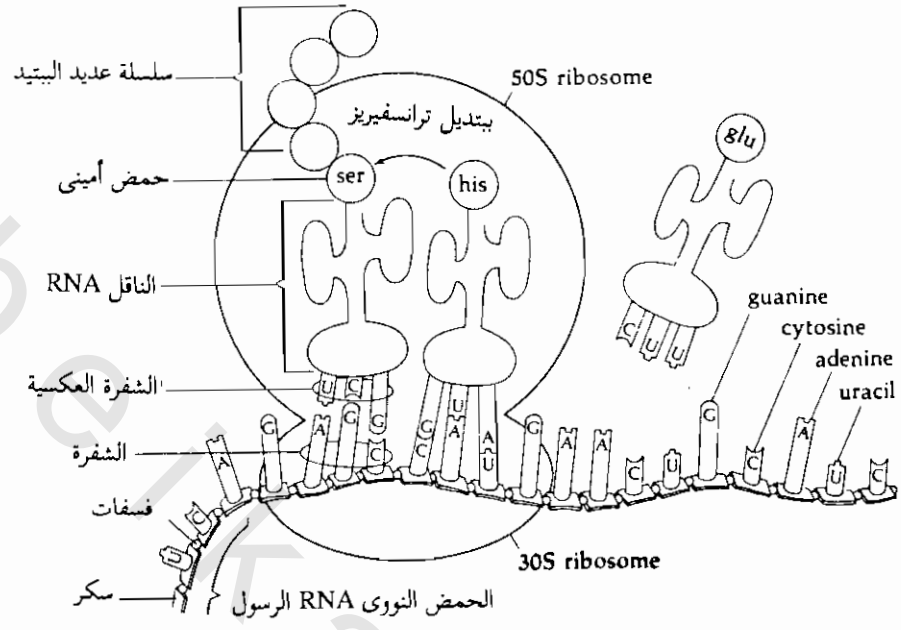
فمن المعروف أن mRNA يتكون من DNA ثم ينفصل عن DNA ويرتبط بالريبوسومات ribosomes حيث يخترق الـ sub unit الصغيرة لكل ريبوسوم وهو يخترق بذلك عديد من الريبوسومات مسبباً ربطها ببعض وتسمى عديد الريبوسومات polyribosomes (شكل ١٣٣) واختراق mRNA للريبوسومات كما يحدث لاختراق الفتلة فى العقد أو السبحة.

أما عن tRNA فهى تختلف باختلاف الاحماض الامينية ، وكل حامض أمينى له tRNA خاص به و tRNA يتكون أساساً من ارتباط قواعد نيتروجينية نووية مثل الادينين واليوراسيل والجوانين والسيتوسين. وترتبط هذه القواعد لتكون شكل tRNA وهو فى مجموعة شكل له أذرع عديدة كما فى الشكل. وكما فى الرسم يكون له قاعدة تتكون من ثلاث قواعد، وتسمى هذه القواعد بالـ anticodon ، وهذه الثلاث قواعد ترتبط بالثلاث قواعد الأخرى المكونة والموجودة على mRNA . وهذه الثلاث قواعد الموجودة على mRNA تسمى بالـ codon (شكل ١٣٤) و mRNA يتكون أيضاً من قواعد مرتبطة ببعضها الا أنه خيطى الشكل وكل ثلاث قواعد متتابعة تسمى بالـ codonو tRNA يحمل فى قمته الطرفية الحامض الأمينى الخاص به، وبعد ذلك يتحرك الريبوسوم على الخيط mRNA ليحل على codon آخر مناسب لـ tRNA آخر. وفى هذه الحالة يحدث ربط بين الحامض الامينى للـ tRNA الأول والحامض الامينى للـ tRNA الثانى بواسطة رابطة ببتيدية peptide linkage ثم يتحرك الريبوسوم مرة أخرى على mRNA ليستقبل tRNA ثالث ويكون فيه توافق وارتباط



(شكل ١٣٣) : خطوات تكوين mRNA وعديد الببتيد.

أشتقاق mRNA من DNA ثم تكوين عديد الريبوسومات ثم تخليق سلسلة عديد الببتيد فى وجود tRNA.



(شكل ١٣٤) : تخليق عديد الببتيد لتكوين البروتين.

بين الـ anticodon والـ codon وينتج عن لك حامض أميني ثالث وهكذا تتكرر العملية مرات عديدة ليتكون سلسلة من الاحماض الامينية مرتبطة ببعضها ليتكون منها بعد ذلك مركب البروتين.

وبعد تحرك الريبوسوم على mRNA وبعد تسليم tRNA الحامض الاميني الخاص به وتكوين رابطة ببيتدية فأنه ينفصل عن mRNA ويصبح حر فى سائل الخلية ليرتبط مرة أخرى بالحامض الاميني الخاص به ويرتبط مرة ثانية بالـ mRNA فى وجود الريبوسوم. وهكذا بتكرار هذه العملية باستمرار ولمرات عديدة لجميع أنواع tRNA فينتج عن ذلك تكوين عديد الببتيد polypeptide ومنه يتكون البروتين.

وأمكن أثبات حدوث هذا التخليق بالتفصيل فى خلايا البكتريا وبوضوح تام. الا أنه فى حالة النباتات الراقية يتعذر اثباتها بطريقة حاسمة، الا أنه فى بعض النباتات مثل

القمح أمكن اثبات بعض هذه الخطوات ولكن من الواضح أن ميكانيكية تأثير وعمل السيتوكينينات فى النباتات الراقية (الزهرية) تماثل تماماً ما سبق شرحه بالرغم من عدم اثباتها بالتفصيل فى هذه النباتات.

طرق الكشف عن السيتوكينينات:

توجد طرق حيوية تستخدم فيها أجزاء نباتية وطرق كيماوية .

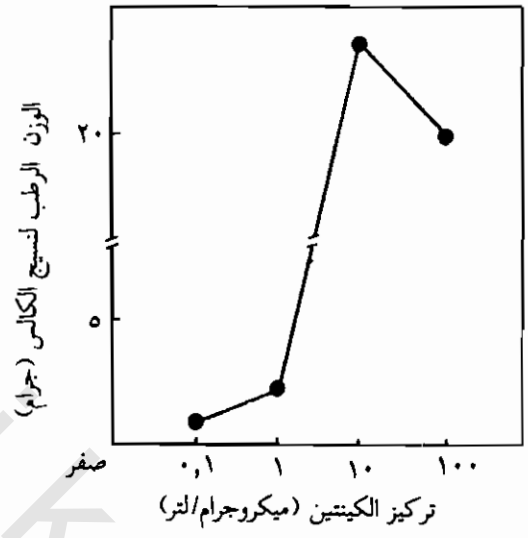
اولاً : الطرق الحيوية Bioassay ومنها مايأتى

١ ـ إختبار نخاع التبغ Tobacco Pith Test

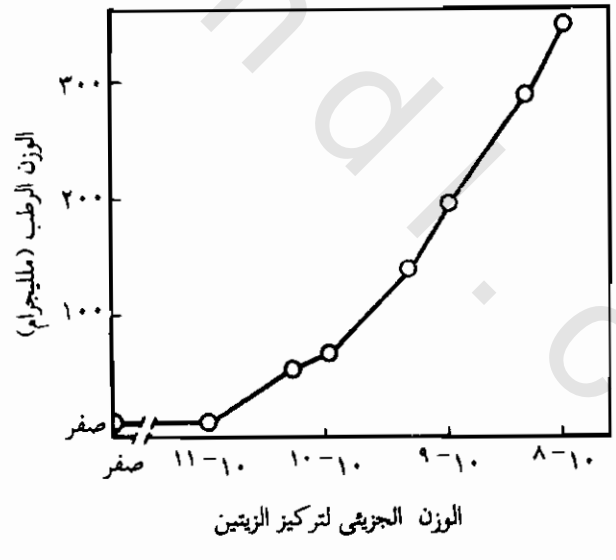
تعتبر هذه الطريقة هى الأساس فى أكتشاف الكينتين وأيضاً الأدنين والأدنين ريبوسيد. حيث أن كل تجارب سكوج وميللر Skoog and Miller وآخرون لأكتشاف السيتوكينينات تجرى بهذه الطريقة.

يسبب السيتوكينين إنقسام خلايا نخاع ساق التبغ وأيضاً نسيج كالس فلقات فول الصويا ولذلك يزداد الوزن الجاف والرطب لهذه الأنسجة. يمكن رسم العلاقة بين تركيز الزيتين وأيضاً الكينتين ووزن النسيج بعد مدة تتراوح بين أسبوعين إلى شهر حيث يزداد وزن النسيج بزيادة التركيز . يتراوح التركيز فى حالة الزيتين بين $١٠^{-٨}$ إلى $١٠^{-١١}$ من الوزن الجزيئى وفى حالة الكينتين بين ١ ـ ١٠ ميكروجرام لكل لتر (شكل ١٣٥ و ١٣٦).

يتم زراعة نسيج كالس نخاع الدخان على بيئة تركيبية صناعية فى المعمل فى ظروف معقمة . تتكون البيئة الأساسية basal medium من العناصر المغذية الكبرى والصغرى myoinositol وسكروز بتركيز ٣ ٪ وبعض فيتامينات B وهى البيريدوكسين pyridoxin وحامض النيكوتنيك nicotinic acid والثيامين thiamine وأوكسين نفثالين حامض الخليك وآجار ١ ٪ ويتم ضبط pH البيئة على رقم ٥,٨ . يتم تجزيىء نسيج الكالس إلى أجزاء وكل جزء يزن ٣ ملليجرام. ويوضع فى الدورق المخروطى الواحد المحتوى على البيئة أربعة قطع من الكالس. توضع الدوارق المخروطية فى درجة حرارة ٢٥°م فى ضوء فلورسنت. وبعد شهر يتم وزن قطع الكالس ورسم منحنى.



(شكل ١٣٥) : تأثير تركيز الكينتين على نمو كالس التبغ



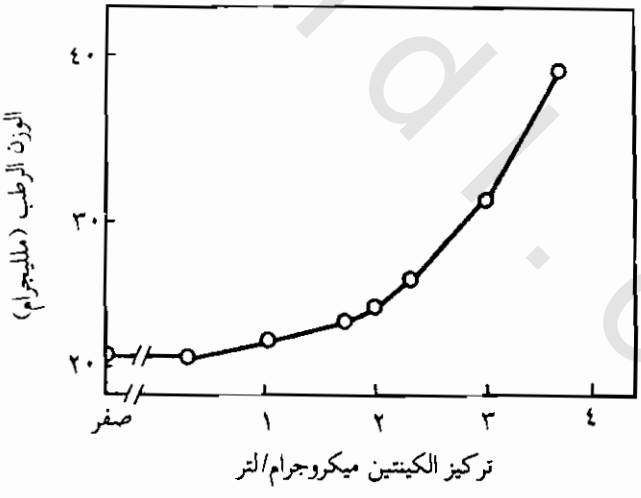
(شكل ١٣٦) : تأثير تركيز الزيتين على نمو نسيج كالس فول الصويا.

يمكن إجراء نفس الطريقة فى حالة نسيج كالس فلقات فول الصويا .

٢ ـ إختبار فلقات الفجل Radish Cotyledon Test

عند إستئصال الفلقات من بذور الفجل وتعويمها floated على الماء فأنها تنتفخ بدرجة بسيطة جداً ولكن بإضافة السيتوكينين للماء فأن الفلقات تكبر فى الحجم بدرجة كبيرة . يتناسب كبر الحجم مع تركيز السيتوكينين طردياً .

تنبت بذور الفجل على ورق ترشيح مبلل فى الظلام على درجة حرارة ٢٥ درجة مئوية. بعد يومين يتم إختيار فلقات البادرات المتجانسة فى الحجم . يتم فصل الفلقات عن محور الجنين ثم يتم تعويم الفلقات فى ماء مقطر. يستعمل محلول منظم من فوسفات البوتاسيوم له درجة pH ٦ . تستعمل تركيزات مختلفة من السيتوكينين فى محلول منظم أو تركيزات من المحلول المجهول المراد إختياره وذلك أيضاً فى محلول منظم. توضح المحاليل فى أطباق بترى وفى كل طبق يوضع عشره فلقات متساوية الحجم. توضع الأطباق فى ضوء فلورسنت مدة التجربة. بعد ثلاثة أيام تأخذ الفلقات ويتم وزنها. يتناسب الوزن الرطب طردياً مع تركيز السيتوكينين (شكل ١٣٧) .



(شكل ١٣٧) : تأثير الكينتين على الوزن الرطب لفلقة الفجل

تفضل هذه الطريقة عن السابقة لأنها أسهل وتحتاج إلى وقت أقل. ولكن من أحد المآخذ أنها غير متخصصة تماماً حيث أنها تستجيب للجبريللينات بدرجة خفيفة.

٣ ـ إختبار قرص ورقة زانثيم Xanthium Leaf Disk Test

تتحول الأوراق أو أقراص الأوراق عند تعويمها على الماء floated on water بعد فترة إلى اللون الأصفر نتيجة لفقد الكلورفيل . يصحب ذلك هدم RNA والبروتين.

تعتبر التغيرات السابقة من مظاهر مرحلة الشيخوخة. عند إضافة السيتوكينين للماء فإنه يحدث تأخير لمرحلة الشيخوخة وتستمر الورقة محتفظة بلونها الأخضر لمدة أطول. يتناسب كمية الكلورفيل مع تركيز السيتوكينينات تناسب طردى.

تتنبت بذور زانثيم وبعد مرحلة البادرة وتكوين النبات العادى تأخذ الأوراق وتغمر أعناقها فى ماء مقطر فى كأس ثم توضع فى الظلام ثلاثة أو أربعة أيام. تستعمل تركيزات مختلفة من السيتوكينينات أو من المحلول المجهول المراد إختباره.

يوضع كل تركيز فى طبق بترى به ورقة ترشيح . يتم عمل أقراص من الأوراق بين العروق بواسطة ثاقب فلين. يوضع فى كل طبق أربعة أقراص من الأوراق على ورقة الترشيح . يجب ملامسة السطح السفلى للأقراص لورقة الترشيح . توضع الأطباق فى الظلام لمدة يومين على درجة حرارة ٢٥ درجة مئوية. تؤخذ الأقراص وتغلى أقراص كل معاملة على حده فى كحول إيثيل تركيزه بين ٩٦٪ إلى ٨٠٪ وذلك لأستخلاص الكلوروفيل. يتم تقدير تركيز الكلورفيل بواسطه جهاز تقدير الألوان على طول موجة ٦٦٠ نانو متر. يتناسب تركيز الكلورفيل تناسب طردى مع تركيز الكينتين (شكل ١٣٨).

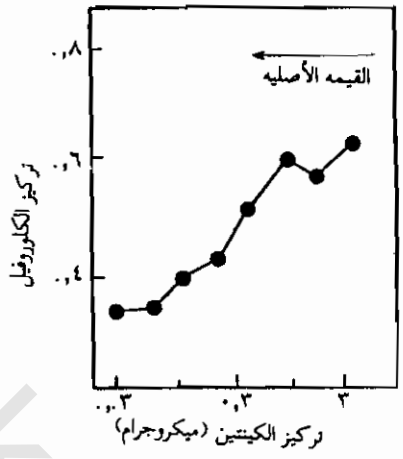
توجد أختبارات حيوية أخري كثيرة وتبني هذه الأختبارات علي أحد أربعة تأثيرات هامة للسيتوكينينات وهي

١ ـ تنشيط إنقسام الخلايا.

٢ ـ تأخير الشيخوخة.

٣ ـ تنشيط إستطالة أو تمدد أو كبر حجم الخلايا.

٤ ـ تنشيط تخليق الصبغات.



(شكل ١٣٨) : تأثير تركيز الكينتين على فقد الكلوروفيل فى أوراق نبات *Xanthium* المعرضة للظلام.

وهذه الأختبارات والزمن اللازم لإجرائها موضحة فى الجدول (جدول رقم ٩).

(جدول ٩) : أسماء بعض الأختبارات الحيوية لتقدير السيتوكينينات

نوع الأختبار الحيوى Bioassay	الزمن بالدقائق	أقل تركيز يمكن تقديره ($ug\ 1^{-1}$)
Tobacco pith callus	٢١	أقل من ١
Soybean callus	٢١	١
Carrot phoem	٢١	٢/١
Barley leaf senescence	٢	٣
Oat leaf senescence	٤	٣
Radish leaf disk expansion	١	٢
Radish cotyledon expansion	٣	١٠
Cucumber greening	١	١
Amaranthus betacyanin	٢	٥

عامة يفضل فى جميع الأختبارات الحيوية السابقة أن يتم تنقية المستخلص النباتى بواسطة طريقة paper chromatography وعند مناطق Rf الخاصة بالسيتوكينين يتم إختبارها بالأختبارات الحيوية. يتم تقدير وتأثير السيتوكينين لمناطق مختلفة لها Rf مختلفه بالأختبار الحيوى. ثم يتم جمع هذه التأثيرات المختلفة وتكون عبارة عن التأثير الكلى للسيتوكينين. يقارن التأثير الكلى بتأثير سيتوكينين تركيبى مثل الكينتين حيث يتم إختبار تركيزات معروفة عديدة وتحديد درجة تأثيرها عند كل تركيز ويتم عمل منحنى قياسى لهذه القراءات. ومن هذا المنحنى القياسى يمكن حساب التركيز الكلى للسيتوكينين فى المستخلص النباتى المراد تقديره.

ومن عيوب الطرق الحيوية أن كميات كبيرة من السيتوكينين تفقد أثناء الإستخلاص والتنقية وأن كفاءة السيتوكينين أثناء الإختبار هى عبارة عن الفرق بين كفاءته وكفاءة المركبات الطبيعية المثبطة للسيتوكينين أى أنه يمكن أن يكون تركيز السيتوكينين كبير ولكن كفاءته ونشاطه ضعيف لزيادة تركيز المثبطات الطبيعية وبذلك تكون النتائج مضللة. أيضاً لايوجد تجانس مطلق فى النباتات أو الأجزاء التى تستخدم فى الإختبار حيث توجد إختلافات بيولوجية وكذلك لابد من تكرار هذه التجارب كثيراً للحصول على نتائج معتمدة.

ثانياً : الطرق الكيماوية:

ونتيجة لهذه الثلاثة عيوب فى الطرق الحيوية المذكورة سابقاً فيفضل الإعتماد على الطرق الكيماوية وأهمها الطريقتين الآتيتين:

١- طريقة Radio-immunoassay

يمكن ربط السيتوكينين كيماوياً chemically linked على مركب بروتين حامل a carrier protein مثل ألبيومين سيرم الأبقار bovine serum albumin بواسطة طرق عديدة. يمكن إستخدام هذا السيتوكينين فى إنتاج أجسام مضادة وذلك بحقنه فى الأرانب. تستخلص الأجسام المضادة من دم الأرانب وحيث توجد الأجسام المضادة فى سيرم الدم ولذلك يسمى سيرم الدم المحتوى على الأجسام المضادة بإسم

antiserum. ولذلك يمكن قياس تركيز السيتوكينين فى مستخلص النبات الخام plant extract بواسطة الأجسام المضادة الموجودة فى antiserum حيث أن هذه الأجسام لها قدرة فائقة على الإرتباط بمركب السيتوكينين دون أى مركبات أخرى فى المستخلص الخام للنبات . تستخدم حالة الإرتباط التنافسى competitive binding بين السيتوكينينات الموجودة فى المستخلص النباتى وبين السيتوكينينات المشعة المضادة إلى مستخلص النبات فى الإرتباط بالأجسام المضادة ويستخدم ذلك التنافس فى الإستدلال على تركيز السيتوكينين فى المستخلص النباتى وذلك بإستخدام منحنى قياسى standard curve مناسب.

تفضل هذه الطريقة عن الطرق الأخرى لأنها سريعة ودقيقة ورخيصة وذلك فى حالة توفر الأجسام المضادة antiserum للسيتوكينين المطلوب تقديره.

يمكن أن يسبب وجود بعض المركبات الموجودة فى المستخلص تداخل فى التقدير ولذلك يفضل أيضاً فى هذه الطريقة أستعمال أضافى لجهاز HPLC - high performance liquid chromatography.

٢ ـ طريقة (GC / MS) Gas chromatography - Mass spectrometry

تستخدم الحالتين GS و MS أى فى تقدير كمى لكثير من مركبات السيتوكينين. وفى حالة إستخدام جهاز mass spectrometer وذلك بعمل ضبط focusing للجهاز لتقدير أيون معين أو قليل من أيونات معينة تشتق derived من المركب المراد تقديره أى السيتوكينين فى هذه الحالة وبذلك يمكن قياس هذا المركب بدقة حتى فى وجود خليط من مركبات كثيرة أو عينة غير نقية. وفى حالة إستعمال مركب قياسى standard داخلى مناسب suitable internal standard يمكن تقدير الفقد فى المركب أثناء خطوات التنقية الأولية وبذلك يمكن أن تكون هذه الطريقة أساسية لتقدير السيتوكينينات فى مستخلص النبات.

يتم أجراء هذه الطريقة بأضافة كمية معلومة من مركب قياسى يسمى مركب قياسى داخلى internal standard إلى مستخلص النبات الخام crude plant extract.

لابد أن يكون هذا المركب القياسى الداخلى مشابه تماماً أو كلما أمكن ذلك للمركب المطلوب تقديره وأن يكون له ميزه أخرى أنه يمكن تمييزه بسهولة عن المركب المطلوب تقديره عند عمل التقدير النهائى final analysis . يمكن أن يكون المركب القياسى عبارة سيتوكينين مشع فيه الأشعاع عبارة عن ذرة إيدروجين مشعة أى ديوتيريم deuterium أو تكون ذرة نيتروجين مشعة وهى^{15}N أى ن١٥ وبذلك يمكن التمييز بينه وبين السيتوكينين الداخلى بواسطة الوزن الجزيئى. وبعد تنقية مناسبة يتم تحويل المادة إلى مشتقات متطايرة volatile derivativesويتم فحصها بواسطة GC - MS . يتم ضبط الجهاز للتمييز بين الأيون من عينة السيتوكينين العادية وبين الأيون من السيتوكينين المشع أى المركب القياسى. يعتبر أيون المركب الأخير أثقل من أيون مركب السيتوكينين العادى لأنه مشع higher mass isotope. يمكن حساب تركيز السيتوكينين الموجود فى العينة أى فى المستخلص بواسطة المعادلة الآتية.

تركيز السيتوكينين فى العينة =

amount كمية المركب القياسي المضافة x intensity تركيز أيون سيتوكينين العينة.

---

intensity تركيز أيون المركب القياسي.

يستعمل فى هذا الأختبار منحنى قياسى يوضح العلاقة بين نسبة التركيز الناتجة من قياس الجهاز observed intensity ratio وبين نسبة التركيز المحسوبة. تكون النسبة هى عبارة عن النسبة بين السيتوكينين الغير مشع إلى السيتوكينين المشع .

تعتبر هذه الطريقة مكلفة لأرتفاع ثمن الأجهزة المستعملة وأيضاً تحتاج إلى وقت طويل وذلك بمقارنتها بالطريقة السابقة ولكنها لازالت أدق الطرق على الأطلاق.

التأثيرات المختلفة للسيتوكينينات على النبات

توجد تأثيرات مختلفة كثيرة للسيتوكينينات على النبات وأهمها ما يأتى:

١ ـ أنقسام الخلايا Cell Division

يعتبر أهم تأثير للسيتوكينينات هو إنقسام الخلايا ، ولكن أتضح من التجارب أنه لابد وجود أوكسين فى تجارب كالس نخاع ساق التبغ. أتضح أن أضافة الأوكسين منفردا فى البيئة يسبب كبر حجم الخلايا فقط دون أنقسام والعكس صحيح فإن أضافة السيتوكينين منفرداً فى البيئة لا يسبب إنقسام الخلايا . عند أضافة الأوكسين والسيتوكينين للبيئة يحدث أنقسام سريع للخلايا وينمو نسيج الكالس ويكبر فى الحجم إلى درجةكبيرة. ومما سبق يتضح أن السيتوكينين والأوكسين لازمين معاً لحدوث إنقسام الخلايا. يوجد تناسب طردى بين تركيز السيتوكينين ونمو نسيج الكالس فى البيئة مع توفر الأوكسين. يتضح من ذلك أن وجود كل من السيتوكينين والأوكسين معاً يسببان إنقسام الخلايا فى المرستيمات القمية وخلايا الكمبيوم . يعتقد فى وجود تفاعل بينها interaction وغير معروف طبيعة التفاعل ويعتقد أن كل منهم ينشط الاخر . يعتقد أن السيتوكينين يزيد سرعة تخليق DNA و mRNA بينما يزيد الأوكسين سرعة تخليق RNA الريبوسومى. أستعمال السيتوكينين يسبب أنقسام الخلايا حتى فى الخلايا البالغة مثل الخلايا البرانشيمية فى القشرة والنخاع. ثبت أيضاً أن البكتريا وبعض البروتوزوا تنقسم فى وجود السيتوكينين.

٢ ـ أستطالة الخلايا Cell Enlargement

يؤثر السيتوكينين على الأستطالة العرضية للخلايا أى تستطيل الخلايا بالعرض أما الأستطالة الطولية للخلايا فيتحكم فيها الأوكسينات والجبريللينات. تسبب المعاملة بالسيتوكينينات كبر فى حجم الخلايا فى أقراص أوراق النبات العادية وأيضاً الأوراق الفلقية لبذور الفجل. يعتقد أن السيتوكينين لازم لكبر مساحة النصل حيث أنه فى حالة إزالة القمة النامية للجذور وهى مكان تخليق السيتوكينين تفشل الأوراق فى الفرد leaf expansion. كما وجد أن معاملة الأوراق بالسيتوكينين فى هذه الحالة

تسبب فرد الأوراق أى تحل المعاملة بأضافة السيتوكينين محل القمة النامية للجذور. معاملة النباتات العادية بالسيتوكينيات تثبط النمو الطولى للجذر والساق وتسبب زيادة سمك هذه الأجزاء. أى أنها تقلل من النمو الطولى وتنشط النمو العرضى ولذلك يزداد قطر أقراص أوراق النبات.

أوراق النبات النامية فى الظلام تكون مطوية غير منبسطة وتعريضها للضوء يسبب فردها وبسطها expansion. يمكن فرد الأوراق المطوية folded بمعاملتها بالسيتوكينين حتى فى وجود الظلام. أى أن السيتوكينين يحل محل الضوء فى هذه الحالة.

٣ ـ تكوين الشكل الظاهرى للنبات Morphogenesis

يسمى تكوين الشكل الظاهرى للنبات أو لأى عضو من أعضائه بال- morphogenesis. أعتقد عالم النبات القديم Julius Sachs عام ١٨٨٠ أن تكوين أعضاء النبات مثل الساق والجذور والأوراق أى morphogenesis نتيجة لتكون مركبات خاصة معينه لكل عضو دون الآخر أى أن الجذور يلزمها مركب أو مركبات معينة وأيضا الساق يلزمه مركبات معينة تختلف عن الجذور وأن الأوراق يلزمها مركبات معينه تختلف عن الجذور والسيقان وهكذا. إلا أن تجربة Skoog and Miller عام ١٩٥٧ أثبتت عكس ذلك تماما حيث ثبت أن تكوين الجذور والسيقان يحدث نتيجة للتفاعل interaction بين الأوكسين والسيتوكينين وأن النسبة بين تركيزى هذين المركبين هى التى تتحكم فى تكوين الجذور أو السيقان . وفى هذه التجربة وفى ظروف معقمة تم وضع نسيج نخاع ساق الدخان على بيئة آجار مغذى nutrient agar (تتكون هذه البيئة من بيتون peptone ومستخلص لحم وماء آجار agar) وقد خلطت هذه البيئة بتركيزات مختلفة من كل من إندول حامض الخليك indole acetic acid الذى يساعد على إستطالة وكبر خلايا النبات وكينيتين kinetin الذى يساعد على إنقسام خلايا النبات. وقد وجد أن هذين المركبين يتحكمان فى تكوين الجذر والساق تبعا لتركيزاتهما فعند خلط بيئة الآجار المغذى بهذه المركبات ووضع النسيج على البيئة وفحص النسيج النباتى بعد عدة أسابيع وجد

أن خلط البيئة بأندول حامض الخليك وكينتين بنسبة ١٥ : ١ نتج عنه تكوين نسيج كالس. وبتغيير النسبة يمكن تكوين جذور فقط أو سيقان فقط . فزيادة تركيز أندول حمض الخليك يشجع تكوين المجموع الجذرى وزيادة تركيز الكينيتين يشجع تكوين المجموع الخضرى (شكل ٨٣).

وجد أن معاملة أوراق البيجونيا بالكينتين تسبب تكوين براعم على حواف الأوراق وأيضا معاملة العقل الساقية لنبات البنفسج الأفريقى تنشط تكوين البراعم على العقل.

٤- تكوين البلاستيدات الخضراء Development of Plastids

فى حالة كالس نخاع ساق التبغ لا تتكون البلاستيدات الخضراء فى الضوء أو فى الظلام. تتكون البلاستيدات الغير مكتملة فى وجود الضوء ولا تتحول إلى بلاستيدات عادية إلا بعد إضافة السيتوكينين للبيئة. تتكون بدائيات البلاستيدات proplastids وتكون عديمة الجرانا عند إضافة السيتوكينين إلى البيئة فى وجود الظلام. وفى الحالة الأخيرة عند إحلال الظلام بالضوء تتكون بلاستيدات خضراء عادية. يتضح من ذلك أن تكوين البلاستيدات الخضراء فى خلايا نسيج الكالس نتيجة للتفاعل interaction بين الضوء والسيتوكينينات. وحتى الآن غير معروف إمكانية أو مدى حدوث ذلك فى حالة النبات السليم العادى. بمعنى آخر هل يمكن تعميم ما حدث فى كالس التبغ على النباتات العادية. حتى الآن لايمكن الإجابة بدقة على هذا السؤال.

٥ - الأزهار وتحديد جنس الزهرة Flowering and Sex Expression

لا يعتبر للسيتوكينين دور فى تنشيط الأزهار ، وهذه القاعدة العامة لها شواذ قليلة حيث يمكن أن تؤثر المعاملة بالسيتوكينينات على أزهار نبات *Wolfia microscopica* ونبات *Lemna paucicostata*.

يمكن أن يؤثر فى بعض الحالات على جنس الزهرة ومثال ذلك فى الجنس *Vitis* يمكن أن توجد أزهار وحيدة الجنس مذكره ونتيجة المعاملة بالسيتوكينين تتكون مبايض الأزهار وبذلك تصبح الزهرة خنثى.

٦ ـ تكوين الثمار والبذور Development of Fruits and Seeds

بعد حدوث الأخصاب يكون نمو المبيض فى الفترة الأولى نتيجة لأنقسام الخلايا فقط وبعد هذه المرحلة يصبح نمو المبيض نتيجة كبر حجم أو أستطالة الخلايا. ولذلك فإن نمو المبيض وتحوله إلى الثمرة يكون فى المراحل الأولى على الأقل راجع إلى السيتوكينينات خاصة وأنه أمكن إثبات ذلك . فقد وجد أن الثمار أثناء تكوينها تحتوى على تركيز عال من السيتوكينينات وخاصة فى المراحل الأولى أثناء إنقسام الخلايا ومثال ذلك القطن والتفاح والموز ألخ. أمكن إثبات ذلك بطريقة أخرى حيث وجد أن أنسجة الثمار الصغيرة لا تنمو على البيئات الصناعية إلا فى وجود السيتوكينين. وأيضاً فى حالة الأجنة فإن المراحل الأولى من نمو الجنين على البيئة لا يمكن أن تحدث إلا بعد إضافة سيتوكينين للبيئة أو محاليل تحتوى على السيتوكينينات مثل لبن جوز الهند أو مستخلص الخميرة yeast extract.

يعتبر المكان الرئيسى لتخليق السيتوكينينات فى النبات هو القمم النامية للجذور ولكن يمكن أن تكون الثمار الصغيرة أثناء تكوينها وأيضاً الأجنة مركز لتخليق هذه المركبات. حيث وجد أن الأزهار تتحول إلى الثمار بالرغم من أزالة القمم النامية للجذور كما فى الطماطم والتبغ.

٧ ـ تأخير الشيخوخة Delay of leaf Senescence

عند حدوث الشيخوخة للورقة يحدث إنخفاض فى محتوى الكلوروفيل والبروتين و RNA ثم تسقط الورقة أو تجف على النبات.

من المعروف أن الكينيتين له تأثير هام فى أنه يضاد الشيخوخة فعند نزع ورقة من نبات الدخان وتركها فأن المحتوى البروتينى داخل الورقة يقل تركيزه ويزداد تركيز النيتروجين الذائب ونتيجة لذلك يحدث ضعف فى الورقة وتترهل وتدخل فى مرحلة الشيخوخة وفى النهاية تموت.

وفى حالة نبات *Xanthium* وعند نزع ورقة من هذا النبات ووضع عنقها فى محلول به كينيتين فأن هذه الورقة تبقى محتفظة بحيويتها لمدة طويلة وذلك بالمقارنة بورقة لم تعامل بمركب الكينيتين حيث تدخل فى مرحلة الشيخوخة وتموت سريعا.

وفى تجربة أخرى عند معاملة نصف الورقة بالكينيتين والنصف الآخر لايعامل بالكينيتين ثم قطع هذه الورقة إلى نصفين فيلاحظ أن نصف الورقة المعامل بالكينيتين يظل محتفظ بحيويته لمدة طويلة ولايدخل فى مرحلة الشيخوخة ثم الموت إلا بعد فترة طويلة والعكس صحيح فى النصف الغير معامل.

وفى تجربة أخرى عند معاملة جزء دائرى من الورقة بالكينيتين وترك الأجزاء الأخرى غير معاملة فإن الجزء الدائرى بعد فصله من الورقة يظل محتفظ بحيويته لمدة ولايدخل فى مرحلة الشيخوخة ثم الموت إلا بعد فترة طويلة والعكس صحيح فى باقى الورقة.

من التجارب السابقة يتضح أن الكينيتين مضاد للشيخوخة. وقد وجد بالفعل أن المناطق التى يوجد بها الكينيتين من الورقة تنجذب إليها السكريات والأحماض الأمينية والعناصر من أجزاء الورقة إلى الجزء المحتوى على الكينيتين وذلك يدل على أن فى هذه المنطقة نشاط بيوكيماوى ملحوظ. وقد إستدل على ذلك بإستعمال سكريات مشعة وأحماض أمينية (شكل ١٣٩) وعناصر مشعة فنجد أن كل هذه المركبات المشعة تنجذب وتتجه ناحية الجزء المعامل بالكينيتين.

وقد وجد أن مركبات أخرى مثل zeatin وبنزيل أدينين benzyl adenine لها نفس تأثير الكينتين فى منع الإنخفاض السريع فى تركيز الكلوروفيل والبروتين و RNA.

مماسبق يتضح أيضاً أن السيتوكينينات يكون لها دور فى المحافظة على البروتين فى الأجزاء المعاملة بها حيث نجد أن هذه الأجزاء تعيش حية لفترة طويلة. وقد وجد بالفعل فى هذه الأجزاء أنه يوجد توازن بين كمية البروتين وبين كمية النيتروجين الذائب، فى حين أن الأجزاء غير المعاملة يكون فيها نسبة البروتين منخفضة والنيتروجين الذائب تركيزه مرتفع وذلك فى الأوراق المنزوعه من النبات . أى أن السيتوكينينات تؤخر الشيخوخة لأنها تمنع التدهور السريع وذلك لأنها تمنع الإنخفاض السريع فى تركيز الكلوروفيل والبروتين و RNA (شكل ١٣٩).

(شكل ١٣٩) : تأثير المعاملة بالكينتين على الورقة Radioautograms

أ،ب تأثير المعاملة بالكينيتين على الورقة حيث أن الأجزاء الخضراء معاملة بالكينيتين وفى أ الجزء السفلى يسار معامل بالجليسين المشع،

جـ ورقة تبغ كونت جذور على عنق الورقة وتم معاملة منتصف الورقة بواسطة ألفا أمينو بيوتريك مشع (البقعة الغامقة). ثم تم إنتقال ألفا أمينو بيوتريك إلى الجذور وفيها يتم تخليق السيتوكينين حيث ينتقل الأخير من الجذور إلى الورقة عن طريق العروق (الأجزاء الغامقة).

والظاهرة المستخدمة والمستعملة لاستخدام السيتوكينينات على نطاق طبيعى اقتصادى هى أن السيتوكينينات مضادة للشيخوخة وبذلك يمكن أن تطيل فى عمر الثمار والنباتات الورقية لمدة طويلة أثناء النقل والتسويق وقد أمكن تطبيق ذلك فى حالة البينزيل أدينين benzyladenine فأنه يستعمل لرش أو لغمر محاصيل الخضروات فيه لمدة معينة حيث أنه يطيل من عمر هذه الخضروات بصورة غضة ومثال لذلك البروكولى والكرفس والأسبرجس. الا أنه وجد أن السيتوكينينات لها تأثير على

الأحماض النووية فقد يكون لها تأثير سام phytotoxicity على الانسان أو الحيوان ولذلك فى الدول المتقدمة تجرى تجارب فى هذا الموضوع لاختبار تأثير المعاملة بهذه النباتات من حيث سميتها للأنسان والحيوان حتى يصرح لها بالأستعمال.

٨ ـ كمون البذور Dormancy

يمكن أن تسبب المعاملة بالسيتوكينينات إنبات البذور فى بعض الحالات. فقد وجد فى حالة بذور الخس صنف Grand rapids أن الضوء لازم لإنبات هذه البذور وأن الضوء الأحمر هو المؤثر على الأنبات دون ألوان الطيف الضوئى الأخرى. وجد أن البذور المعاملة بالكينتين يمكن أن تنبت فى الظلام، وفى هذه الحالة فإن الكينتين يحل محل الضوء الأحمر أو الضوء العادى . يؤثر الكينتين أيضاً على إنبات بذور التبغ و white clover.

وجد أن الكينتين يسبب إنبات بذور نبات *Striga*. يعتبر هذا النبات زهرى متطفل على بعض النباتات وفى مصر يتطفل على نبات القصب. هذا النبات عديم الجذور ولذلك فأنه يلتصق بجذور النبات العائل. لا تنبت بذور هذا النبات إلا فى وجود النبات العائل وتعليل ذلك أن جذور هذا النبات تفرز إفرازات تسبب إنبات هذه البذور، وأن أفرازات جذور النبات العائل تحتوى على مركبات منها السيتوكينينات تنشط إنبات هذه البذور.

وقد وجد أن السيتوكينينات التركيبية تنشط إنبات بذور هذا النبات مثل الكينتين و benzyladenine.

٩ ـ السيادة القمية Apical Dominance

توجد ظاهرة السيادة القمية فى النباتات ذوات الفلقتين. وملخص هذه الظاهرة أن البرعم الطرفى ينمو بنشاط بينما يمنع البراعم الابطية والموجودة أسفله لمسافة ما على النبات من النمو، ومن المعروف أن هذا راجع لتأثير الاوكسينات بتركيز عالى فى البراعم الابطية أسفل البرعم الطرفى يمنع نموها حيث أن هذه البراعم تحتوى على

الاوكسينات الخاصة بها وعلى أوكسينات اضافية منقولة اليها من البرعم الطرفى. ومن المعروف أن زيادة الاوكسين عن تركيز معين تمنع نمو البراعم وقد وجد أنه فى حالة اصابة نبات الصفصاف بطفيل معين يسبب مرض للنبات معروف باسم مرض مكنسة الساحرة witches broom disease حيث نجد فى هذه الحالة أن العقد فى الساق متقاربة جداً والسلاميات قصيرة جداً ولذلك فأن الأفرع الجانبية تكون متقاربة جداً وتأخذ شكل المكنسة ولا يوجد أى وجود لظاهرة السيادة القمية. وقد وجد أن السبب فى ذلك هو أن هذا الطفيل الذى يصيب الأشجار يفرز مركب سيتوكينينى وهذا المركب يضاد فى عمله antagonise عمل الاوكسين ويبطل مفعوله فنجد أن البراعم الابطية تنمو بشدة وينتج عنها مرض شكل المكنسة .

وجد أن البكتريا *Corynebacterium fascians* تسبب أيضاً مرض مكنسة الساحرة فى كثير من النباتات. حيث تفقد هذه النباتات ظاهرة السيادة القمية وتنمو البراعم الأبطية القريبة من البرعم القمى مع تقارب العقد وقصر السلاميات ، وقد وجد أن مركب السيتوكينين isopentenyl adenine يوجد فى أفرازات هذه البكتريا.

١٠ ـ فتح الثغور Stomatal aperture

يؤثر السيتوكينين بدرجةبسيطة على فتحة الثغر حيث أنه يسبب زيادة فى فتحة الثغر بدرجة بسيطة فى سلخ البشرة المعامل بالسيتوكينين وذلك فى بعض النباتات مثل *Commelina* ، و *Vicia* و *Tridax* و *Kalanchoe daigremontiana*. وفى حالة نبات *Anthephora pubescens* يكون أتساع فتحة الثغر بدرجة ٥٠ ٪ .

١١ ـ تكوين صبغة بيتاسيانين Synthesis of betacyanin

تحتاج بادرات *Amaranthus* إلى الضوء لتكوين صبغة betacyanin ولكنها يمكن أن تتكون فى الظلام عند معاملتها بالسيتوكينين. أى أن للسيتوكينين دور هام فى تكوين الصبغة.