مثل: *Lilium*، و *Ribes*، *Narcissus*. وفى النوع *Theobroma cacao* تصل الأنبوبة اللقاحية إلى البويضة ويحدث الإخصاب. ولكن الجنين يدهور ويضمحل فى المراحل الأولى من تكوينه عندما يكون التلقيح غير متوافق (عن Singh ١٩٩٣).

وللاطلاع على الطبيعة الجزيئية لتفاعلات عدم التوافق بنوعية الجاميطى والاسبوروفيتى .. يراجع Hiscock وآخرون (١٩٩٥).

طرق التعرف على عوامل عدم التوافق

توجد أربع طرق رئيسية للتعرف على عوامل عدم التوافق فى النباتات، هى:

١ - إجراء كل التلقيحات الممكنة بين مجموعة من السلالات التى يعرف التركيب الوراثى لبعضها، ثم تحسب عدد البذور التى تنتج من كل تلقيح؛ حيث تعطى التلقيحات المتوافقة عددًا كبيرًا، بينما تكون البذور قليلة جدًّا - أو معدومة - فى التلقيحات غير المتوافقة. ويستدل من ذلك .. على درجة القرابة الوراثية (من حيث آليلات S) بين السلالات المختلفة. كما يستدل من السلالات المعلومة التركيب الوراثى على التركيب الوراثى للسلالات المجهولة، ويعاب على هذه الطريقة أنها تتطلب فترة زمنية طويلة لإجرائها.

٢ - إجراء كل التلقيحات الممكنة - كما فى الطريقة السابقة -، ثم عمل قطاعات فى أجزاء مختلفة من أقلام الأزهار الملقحة. بعد يوم - أو يومين - من إجراء التلقيحات؛ حيث تُرى أعداد كبيرة من الأنابيب اللقاحية فى أقلام أزهار التلقيحات المتوافقة. بينما تكون الأنابيب اللقاحية قليلة جدًّا - أو معدومة - فى التلقيحات غير المتوافقة، ويستدل من ذلك على التركيب الوراثى للسلالات المجهولة التركيب، كما فى الطريقة السابقة. وبرغم أن هذه الطريقة سريعة .. إلا أنها تتطلب جهدًا كبيرًا فى عمل القطاعات وفحصها (Frey ١٩٧٢).

٣ - الطريقة السيرولوجية Serological Method:

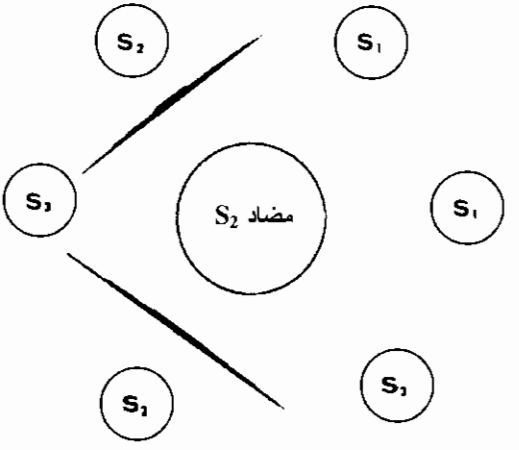
تجرى الطريقة السيرولوجية بجمع ١٠٠٠-٢٠٠٠ ميسم من كل من السلالات التى يراد دراسة القرابة الوراثية بينها، ويفضل أن يكون بعضها معلوم التركيب الوراثى.

تهرس مياسم كل سلالة فى محلول ملحى (٠,٨٪ كلوريد صوديوم)، ثم تجرى عملية استخلاص للأنتيجينات الموجودة بها. ويحقن مستخلص الأنتيجينات فى أرانب التجارب على مراحل، على أن يخصص أرنب لكل سلالة. ينزف جزء من دم الأرنب بعد أربعة أسابيع من بداية الحقن، ثم يحصل منه على مضاد السيرم antiserum، وهو الذى يحتوى على الأجسام المضادة antibodies التى أفرزها الأرنب كإجراء وقائى ضد الأجسام الغريبة (الأنتيجينات) التى أدخلت فى دمه.

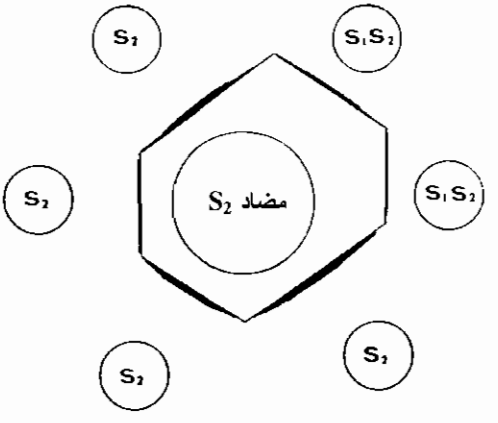
ولدراسة العلاقة بين أى تركيب وراثى معلوم وآخر مجهول .. يُجْرى اختبار سيرولوجى فى طبق بترى، توجد به طبقة رقيقة من آجار نقى nobel agar؛ بتركيز ١٪. وتُصنَع فى الآجار حفرة وسطية كبيرة فى وسط الطبق، وست حفر جانبية صغيرة حولها؛ بواسطة ثاقبات فلين. أو بواسطة ثاقبات خاصة لهذا الغرض. ويوضع ٠,١٥ مل من مضاد السيرم المعلوم فى الحفرة الوسطية، ويوضع ٠,٠٣ مل من كل من مستخلصات الأنتيجينات المجهولة فى الحفر الجانبية. يكفى ١٠ مياسم - فقط - لتحضير كل من هذه المستخلصات المجهولة التركيب الوراثى.

تحفظ الأطباق - بعد ذلك - فى حضان على درجة حرارة ثابتة (حوالى ٣٧°م)؛ حيث يلاحظ - بعد ساعات قليلة - ظهور خط ترسيب précipitation band بين بعض الحفر الجانبية والحفرة الوسطية، ويكون ذلك دليلاً على اشتراكهما فى نفس آليلات عدم التوافق (شكل ٨-٢). ويكون عدم ظهور خط الترسيب بين إحدى الحفر الجانبية والحفر الوسطية دليلاً على عدم وجود أية قرابة وراثية بينهما فى آليلات عدم التوافق. وبذا .. يمكن الاستدلال على التركيب الوراثى المجهول من التركيب الوراثى المعلوم. ودراسة القرابة بينهما.

هذا .. وتختلف خطوط الترسيب فى موقعها بين الحفر الجانبية والحفر الوسطية باختلاف آليلات عدم التوافق، وباختلاف تركيز كل من مستخلص الأنتيجين، ومضاد السيرم (شكل ٨-٣). وعندما تلتحم نهايات خطوط الترسيب التى تتكون بين الحفرة الوسطية وحفر جانبية متجاورة .. فإن ذلك يعد دليلاً على اشتراك الحفر الجانبية فى نفس آليل - أو آليلات - عدم التوافق (شكل ٨-٤).



شكل (٨-٢): اختبار سيرولوجى تظهر فيه خطوط ترسيب بين الحفرة الوسطية التى تحتوى على مضاد السيرم S_2 والحفر الجانبية التى تحتوى على مستخلص أنيتجينات نفس العامل S_2، أما الحفر الجانبية التى تحتوى على مستخلص الأنتيجينات S_1 أو S_3 فلا تظهر خطوط ترسيب بينها وبين الحفرة الوسطية (عن Wallace & Nasrallah ١٩٦٨).



شكل (٨-٣): اختبار سيرولوجى يختلف فيه موقع خطوط الترسيب بين الحفرة الوسطية والحفر الجانبية بسبب اختلاف تركيز الأنتيجين S_2 فى الحفر الجانبية، حيث يكون التركيز أعلى فى التركيب الوراثى الأصيل عما فى التركيب الخليط S_1S_2. ينتج التركيب الأخير كلا الأنتيجينين S_1، و S_2. ينتشر أنتيجين S_2 فى الآجار من الحفر الجانبية التى تحتوى على تركيز مرتفع بسرعة أكبر، فيتقابل مع مضاد S_2 فى موقع أقرب إلى الحفرة الوسطية، مما يحدث مقابل الحفر الجانبية التى تحتوى على تركيز منخفض من الأنتيجين S_2 (التى يوجد بها تركيب وراثى خليط).

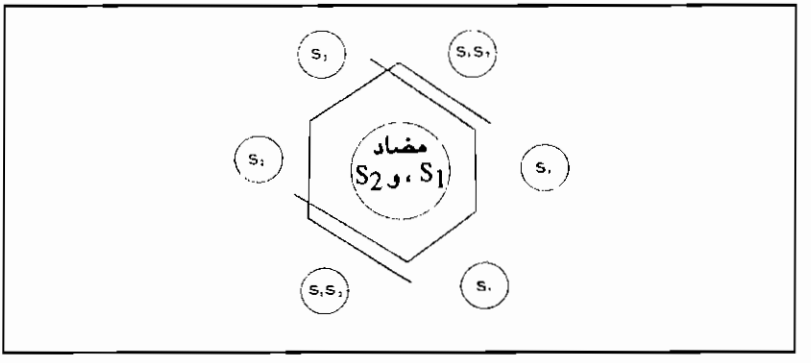
ويلاحظ أن جميع مياسم النوع النباتى الواحد تشترك فيما بينها فى عدد من الأنتيجينات الأخرى. غير تلك التى تنتجها آليلات عدم التوافق؛ وعليه فإن مستخلص أنتيجينات أية سلالة، يعطى خط ترسيب سميكًا مع مضاد سيرم أية سلالة أخرى، وإن لم يكونا مشتركين فى آليلات عدم التوافق. ويظهر خط الترسيب السميك هذا - الخاص بالأنتيجنات العامة المشتركة بين جميع مياسم النوع الواحد - كدائرة بين الحفرة الوسطية والحفر الجانبية (شكل ٨-٥). ويؤدى التخلص من الأجسام المضادة لهذه الأنتيجينات من مضاد السيرم، الذى توجد به .. إلى اختفاء هذه الحلقة السميكة. التى تظهر فى الاختبار السيرولوجى. ولا تبقى - حينئذ - إلا خطوط الترسيب الخاصة بآليلات S المشتركة (شكل ٨-٢)، وهو ما يجعل الاختبار أكثر وضوحًا. ويتم التخلص من الأجسام المضادة للأنتيجينات العامة فى جميع المياسم؛ وذلك بخلط مضاد سيرم سلالة ما مع ضعف حجمه من مستخلص أنتيجينات مياسم سلالة أخرى، لا تشترك معها فى آليلات عدم التوافق فى أنبوبة اختبار، لمدة ساعة على درجة ٣٧°م، ثم يخزن المخلوط لمدة يوم فى الثلاجة. وبعدها يُرشَّح. ويستعمل الراشح كمضاد سيرم معامل (يسمى مضاد سيرم ممتصًا absorbed antiserum). ولمزيد من التفاصيل عن الاختبارات السيرولوجية - للتعرف على عوامل عدم التوافق - يراجع Wallace & Nasrallah (١٩٦٨).

هذا .. ويمكن استعمال مياسم الأزهار مباشرة؛ كبديل لمستخلص الأنتيجينات. ويجرى الاختبار بوضع ١-٣ مياسم فى الحفر الجانبية. وتكون خطوط الترسيب فى هذه الحالة مقوسة كما فى شكل (٨-٦).

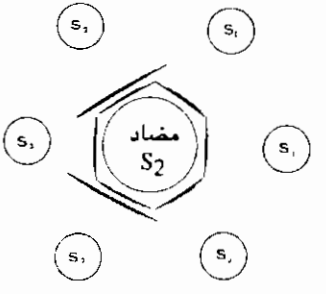
٤ - طريقة الصبغ اللاصف (الفلورى) Fluorescent Staining:

تعتمد طريقة الصبغ الفلورى على إجراء كل التلقيحات الممكنة بين مجموعة من السلالات التى يعرف التركيب الوراثى لبعضها، ثم تقطف الأزهار بعد يوم - أو يومين - من التلقيح. ويفصل القلم والميسم عن بقية الزهرة، ويصبغان بصبغة أزرق الأنيلين aniline blue. ويهرس القلم والميسم - بعد ذلك - تحت غطاء شريحة الفحص الميكروسكوبى. ويفحصان مباشرة فى ميكروسكوب. تعتمد الرؤية فيه على الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Microscope، حيث يحدث استشعاع لصبغة أزرق الأنيلين. التى تتجمع فى حبوب اللقاح والأنابيب اللقاحية؛ وعليه .. فإن حبوب اللقاح والأنابيب اللقاحية تبدو واضحة. بينما تكون بقية أنسجة الميسم والقلم معتمة. وكما فى

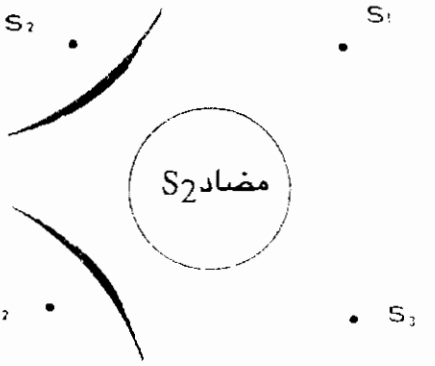
الطريقة الثانية .. فإنه تُرى أعداد كبيرة من الأنابيب اللقاحية فى أقلام أزهار التلقيحات المتوافقة، بينما تكون الأنابيب اللقاحية قليلة جدًّا – أو معدومة – فى التلقيحات غير المتوافقة. ويستدل من ذلك .. على التركيب الوراثى للسلالات المجهولة والعلاقة بين مختلف السلالات. استعمل Crehu (١٩٦٨) هذه الطريقة فى دراسة عوامل عدم التوافق فى كل من الكيل، والكرنب، والقنبيط. وقد استعملها Hal & Verhoeven (١٩٦٨) كذلك فى دراسة العلاقة بين ٦٠ سلالة مرباة تربية داخلية inbred lines من كرنب بروكسل، وتمكنا خلال موسم واحد من دراسة العلاقة بين ١٥ آليلاً للعامل S، وتحديد علاقة السيادة بينها، والتعرف على التركيب الوراثى لكل سلالة. هذا .. وتعتبر تلك هى أبسط الطرق لدراسة عوامل عدم التوافق. ولمزيد من التفاصيل عنها .. يراجع Dickson & Wallace (١٩٨٦).



شكل (٨–٤): اختبار سيرولوجى تلتحم فيه نهايات خطوط الترسيب التى تشترك فى نفس عوامل عدم التوافق.



شكل (٨–٥): اختبار سيرولوجى استعمل فيه مضاد سيرم غير ممتص، ترى فيه دائرة ترسيب حول الحفرة الوسطية، تمثل التفاعل بين الأنتيجينات العامة المشتركة بين جميع المياسم وأجسامها المضادة، أما خطا الترسيب الآخران الظاهران بالشكل .. فهما نتيجة للتفاعل بين الأنتيجين S_2 ومضاده.



شكل (٨-٦): خطوط الترسيب المقوسة التى تظهر فى الاختبارات السيرولوجية التى يستعمل فيها مياسم الأزهار مباشرة بدلاً من مستخلص الأنتيجينات.

العوامل المؤثرة على شدة حالة عدم التوافق

تتأثر حالة عدم التوافق فى النباتات بعدة عوامل؛ بعضها وراثى، وبعضها بيئى. وأهمها ما يلى:

١ - التضاعف:

لا يؤثر التضاعف - كثيرًا - على حالة عدم التوافق الاسبوروفيتى؛ لأن هذا النظام لعدم التوافق لا يتوقف على التركيب الوراثى لحبة اللقاح. وإنما على التركيب الوراثى للنبات الذى أنتج حبة اللقاح (الطور الاسبوروفيتى). ولا تغير مضاعفة عدد الكروموسومات من طبيعة العلاقة بين آليلات عدم التوافق؛ فلو كان التركيب الوراثى للنبات الثنائى هو $S_1 > S_2$ .. فإن مضاعفة عدد الكروموسومات يغيره إلى $S_1S_1S_2S_2$، ويبقى الآليل S_1 سائدًا على S_2 سواء أكان ذلك فى حبوب اللقاح، أم فى الميسم. ولكن تتعقد العلاقة - كثيرًا - بين آليلات عدم التوافق، إن كان النبات الرباعى خليطًا فى جميع آليلات S؛ كأن يكون تركيبه الوراثى $S_1S_2S_3S_4$.

وفى المقابل .. فإن التضاعف يضعف حالة عدم التوافق الجاميطى؛ لأن النبات المتضاعف من S_1S_1 إلى $S_1S_1S_2S_2$ ينتج ثلاثة أنواع من حبوب اللقاح الثنائية هى S_1S_1، و S_1S_2، و S_2S_2، وتكون حبوب اللقاح الخليطة (S_1S_2) قادرة على النمو على أى

ميسم؛ لأن كل آليل منهما يضعف تأثير الآليل الآخر. أما حبوب اللقاح الثنائية الأصيلة .. فإنها تبقى كما هى، غير قادرة على الإنبات على مياسم الأزهار، التى تحمل نفس آليلات عدم التوافق.

٢ – الجينات المحورة:

تؤثر الجينات المحورة على التفاعلات الآليلية، وعلى شدة حالة عدم التوافق.

٣ – عمر الزهرة:

تضعف حالة عدم التوافق فى البراعم الصغيرة. كما سبق بيانه تحت موضوع التلقيح البرعمى. وتزيد حدة حالة عدم التوافق – تدريجيًا – إلى أن تصل إلى أعلى مستوى فى الوقت المناسب للتلقيح.

٤ – مرحلة الإزهار:

وجد Johnson (١٩٧١) أن حالة عدم التوافق الذاتى فى كرنب بروكسل. تكون فى أعلى مستوياتها خلال الفترة من وسط مرحلة الإزهار إلى نهايتها.

٥ – درجة الحرارة السائدة:

سبق أن أوضحنا أن خفض درجة حرارة الأزهار عند التلقيح يساعد – أحيانًا – على إجراء التلقيح الذاتى للنباتات غير المتوافقة. كما وجد Johnson (١٩٧١) كذلك أن رفع درجة الحرارة فى مرحلة متأخرة من الإزهار يؤدى إلى زيادة معدل التوافق الذاتى فى كرنب بروكسل؛ حيث صاحب ذلك زيادة فى عدد الأنابيب اللقاحية النابتة فى القلم، بعد ٢٤ ساعة من التلقيح.

طرق إكثار السلالات غير المتوافقة ذاتيًا

إن الفائدة الوحيدة للسلالات غير المتوافقة ذاتيًا – بالنسبة للمربى – هى استعمالها كآباء عند إنتاج الهجن التجارية؛ حيث تؤدى زراعة خطوط متجاورة من سلالتى الأبوين، إلى أن تلقح كل منهما الأخرى؛ لأن التلقيح الذاتى لأى منهما غير ممكن؛ وبذا .. فإن البذور التى تحصد من أية سلالة من سلالتى الآباء .. تكون بذورًا هجينًا.