مستعدة للتلقيح. ويجرى التلقيح بقطع ميسم زهرة حديثة التفتح. محملاً بحبوب اللقاح. ووضعه على ميسم الزهرة المخصية.

الأراولة

تنتخب نورة متوسطة الانفراج (النورة رأس head). ويقص توييج أزهارها الشعاعية (الخارجية) من أعلى لإظهار الأقلام. يختار عدد مناسب من الأزهار الشعاعية (وهى أزهار مؤنثة)، وتزال بقية الأزهار الشعاعية. وجميع الأزهار القرصية الداخلية (وهى أزهار خنثى). تكيس النورة بعد ذلك، وتترك إلى حين استطالة أقلام الأزهار المتبقية فيها. ويكون ذلك فى ظرف أيام قليلة. ويجرى التلقيح - حينئذ - بفرشاة، توجد بها حبوب لقاح، جمعت من نورات متفتحة. سبق تكييسها وهى فى طور البرعم.

حنك السبع

تجرى التلقيحات على نورة واحدة أو نورتين بكل نبات. تقصف القمة النامية لهذه النورات وتزال أزهارها الكبيرة. ويترك بكل منها من ٧-١٠ براعم زهرية غير متفتحة. تخصى من ٢-٣ أزهار من كل نورة يوميًا عندما تبلغ حجمًا مناسبًا للتلقيح، وذلك بنزع الكأس والطلع - معًا - من أسفل بملقط. ثم تغطى النورة بكيس من الجلاسين. ويجرى التلقيح بعد ٢-٣ أيام من الخصى حينما تكون الأزهار مستعدة للتلقيح. ويمكن تلقيح الأزهار السفلى بالنورة. وخصى الأزهار العليا فى نفس اليوم. ويتم التلقيح بإمرار متك زهرة حديثة التفتح على ميسم الزهرة المخصية ثم يعاد تكييسها (Emsweller وآخرون ١٩٣٧).

تخزين حبوب اللقاح وحيويتها

يتطلب الوضع - أحيانًا - تخزين حبوب اللقاح. إما لغرض حفظ الجيرمبلازم. وإما لكى يمكن إجراء التهجينات اللازمة بين أصناف لا تزهر فى وقت واحد. أو بين نباتات نامية فى مناطق جغرافية بعيدة عن بعضها. وتسلك حبوب اللقاح مسلك البذور فى قدرتها على الاحتفاظ بحيويتها فى أثناء التخزين. وطبيعة استجابتها لمختلف المؤثرات البيئية.

تقسم النباتات - من حيث قدرة حبوب لقاحها على الاحتفاظ بحيويتها في أثناء التخزين - إلى ثلاث فئات كما يلي:

١ - نباتات تحتفظ حبوب لقاحها بحيويتها لفترات طويلة؛ كما في العائلتين: الوردية، والبقولية.

٢ - نباتات تحتفظ حبوب لقاحها بحيويتها لفترات متوسطة؛ كما في العائلتين الزنبقية، والثومية.

٣ - نباتات تحتفظ حبوب لقاحها بحيويتها لفترات قصيرة؛ كما في العائلة النجيلية.

تأثير العوامل البيئية في حيوية حبوب اللقاح المخزنة

تتأثر حيوية حبوب اللقاح المخزنة بالعوامل البيئية التالية:

١ - الرطوبة النسبية:

يؤدى نقص الرطوبة النسبية إلى زيادة فترة احتفاظ حبوب اللقاح المخزنة بحيويتها، وتنطبق هذه القاعدة حتى حد أدنى معين للرطوبة النسبية، يختلف باختلاف الأنواع النباتية، ويتراوح من ٨-٢٥٪. وتتسبب الرطوبة النسبية الأقل من الحد الأدنى المناسب للنوع النباتي إلى فقدان حبوب اللقاح لحيويتها. وربما حدث ذلك نتيجة للأكسدة الذاتية للمواد الدهنية التي توجد بها. وتعرض الرطوبة النسبية الأعلى من ٦٠٪ حبوب اللقاح للإصابة بالنموات الفطرية والبكتيرية. ويزداد الضرر الواقع على حبوب اللقاح عند تذبذب الرطوبة النسبية بين الارتفاع والانخفاض عما لو كانت ثابتة. ويجب رفع رطوبة حبوب اللقاح التي خزنت في رطوبة منخفضة تتراوح بين ١٠٪، و ٣٠٪ - قبل استعمالها في التلقيحات - بتركها في رطوبة نسبية تبلغ ٨٠٪ لمدة يوم كامل.

٢ - درجة الحرارة:

تزداد فترة احتفاظ حبوب اللقاح المخزنة بحيويتها، كلما كانت الحرارة أقرب إلى درجة التجمد. كما أمكن تخزين حبوب اللقاح في درجة حرارة تراوحت بين -١٨٠°م، و -١٩٠°م دون أن يحدث لها أي ضرر. وخزنت حبوب لقاح النوعين *Pyrus malus*، و *P. communis* لمدة ٣٢٨٧ يومًا في حرارة تراوحت من -١٧°م إلى -٣٧°م دون أن تفقد حيويتها. كذلك أمكن حفظ حبوب اللقاح بالتجفيد freeze drying.

٣ – العوامل البيئية الأخرى:

تزداد فترة احتفاظ حبوب اللقاح المخزنة بحيويتها؛ بخفض تركيز الأكسجين. وزيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون في هواء المخزن. إلا أن التعرض للضوء – خاصة الأشعة فوق البنفسجية – يحدث أضرارًا لحبوب اللقاح المخزنة (عن Johri & Vasil ١٩٦١، و Harrington ١٩٧٠، و Roberts ١٩٧٥).

الظروف المناسبة لتخزين حبوب اللقاح

أمكن تخزين حبوب اللقاح في كل من *Brassica napus*، و *B. oleracea*، و *B. campestris* لمدة تزيد عن العام في مخزن جاف على حرارة –٢٠°م. وقد كانت نسبة التلقيحات التي نتج عنها قرون ناضجة باستعمال ذلك اللقاح أفضل – في بعض الحالات – مما في حالة استعمال حبوب لقاح طازجة، ولكن كان عدد البذور/خردلة متقاربًا (Brown & Dyer ١٩٩١).

وأدى تخزين حبوب لقاح الفلفل في النيتروجين السائل على حرارة –١٩٦°م إلى انخفاض متزايد في نسبة الإنبات على بيئة صناعية بزيادة فترة التخزين، حيث انخفض الإنبات بنسبة ١٧٪ بعد ١٨ شهرًا، وبنسبة ٣٧٪ بعد ٤٢ شهرًا. وقد احتفظت حبوب اللقاح المخزنة بقدرتها الطبيعية على إحداث الإخصاب دون التأثير معنويًّا على نسبة عقد البذور (Alexander وآخرون ١٩٩١).

ويقرر Barabás & Kovács (١٩٩٧) أن الحفظ في النيتروجين السائل على –١٩٦°م يعد أفضل وسيلة لتخزين حبوب اللقاح الفاقدة جزئيًّا لرطوبتها (partially dehydrated)، ويمكن اعتبار ذلك الإجراء إحدى وسائل حفظ الجيرمبلازم.

كما أمكن حفظ حبوب لقاح اليام لمدة سنتين بحالة جيدة بتخزينها على –٨٠°م (Ng & Daniel ٢٠٠٠).

أسباب تدهور حيوية حبوب اللقاح عند التخزين

من الأسباب المحتملة لتدهور حيوية حبوب اللقاح عند التخزين ما يلي:

١ – استنفاذ المواد الغذائية التي توجد بحبة اللقاح في التنفس.

٢ – توقف نشاط بعض الإنزيمات.

٣ – الجفاف.

٤ – تراكم نواتج أيضية ثانوية.

٥ – حدوث تغيرات فى المواد الدهنية بالأغشية الخلوية لحبة اللقاح.

وتبدو حبوب اللقاح المخزنة – أحيانًا – كما لو كانت ميتة. إلا أنها تستعيد حيويتها إذا وضعت فى رطوبة مرتفعة لعدة أيام. وتتطلب حبوب اللقاح المخزنة تركيزات أعلى من السكريات لكى تنبت. وإذا كانت نسبة إنباتها ٣٥٪ بعد انتهاء فترة التخزين .. فإنها تنبت بصورة طبيعية فى الحقل.

طرق اختبار حيوية حبوب اللقاح

تختبر حيوية حبوب اللقاح ومدى قدرتها على إخصاب البويضات فى التهجينات بثلاث طرق رئيسية. هى كما يلى:

١ – بإجراء التلقيحات فى أزهار مخصية. ثم تقدير عدد أنابيب اللقاح النابتة فى قلم الزهرة. أو بتقدير عدد البذور التى تعقد فى الثمار الناضجة المتكونة. يعيب تلك الطريقة احتياجها لوقت طويل لإجرائها. فضلاً عن أن عقد البذور قد يتأثر بعوامل أخرى عديدة.

٢ – استنبات حبوب اللقاح فى بيئات صناعية. وتقدير نسبة الإنبات ونمو الأنابيب اللقاحية. تتطلب هذه الطريقة وقتًا أقل كثيرًا مما تتطلبه الطريقة الأولى. إلا أن قيمتها الفعلية فى التنبؤ بأداء حبوب اللقاح يتوقف على الاختيار المناسب لبيئة الاستنبات. ودرجة الحرارة.

٣ – الاختبارات الهستولوجية لحبوب اللقاح:

تعتمد الاختبارات الهستولوجية إما على قدرة النواة الخضرية بحبة اللقاح على أن تُصبغ فيها مكونات معينة بصبغات خاصة. وإما على نشاط إنزيمات معينة.

وقد استخدم المركب iodine-potassium iodide فى صبغ النشا. والـ aniline blue فى صبغ النشا وعديدات التسكر الأخرى. والـ phyloxin-methyl green فى صبغ الجدر الخلوية. والـ safranin. والـ acetocarmine فى صبغ الكروماتين والرنا.

أما النشاط الإنزيمى فإنه يتضمن – غالبًا – اختزال مجموعة التترازوليم tetrazolium لإعطاء الفورمازانات formazans الملونة غير الذائبة، والتحلل المائى للـ fluorescin diacetate لإنتاج الـ fluorescin (عن Abdul-Baki ١٩٩٢).

ومن بين طرق الصبغ السريعة التى استخدمت فى التعرف على حيوية حبوب اللقاح، ما يلى:

أ – اختبار أملاح التترازوليم Tetrazolium Salts:

فعلى سبيل المثال .. استخدم Norton (١٩٦٦) عددًا من أملاح التترازوليم، لاختبار حيوية حبوب لقاح البرقوق، ووجد أن أكثرها فاعلية هو: 3(4.5-dimethyl thiazolyl 1-2) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide، الذى يعرف بالرمز MTT. وكان الارتباط عاليًا، وموجبًا (r=٠.٩٩) بين نسبة الإنبات فى البيئة الصناعية، ونسبة حبوب اللقاح الملونة فى الاختبار.

ب – اختبار الصبغ بالـ malachite green:

توصل Alexander (١٩٦٩) إلى طريقة للتمييز بين حبوب اللقاح الحية والميتة بوضعها فى محلول يتكون من مركبات، تضاف إلى بعضها بالترتيب والكميات التالية:

الكمية	المركب
١٠ مل	كحول إثيلى
١ مل	صبغة **malachite green** ١٪ فى ٩٥٪ إيثانول
٥٠ مل	ماء مقطر
٢٥ مل	جلسرين
٥ جم	فينول
٥ جم	كلورال هيدريت **chloral hydrate**
٥ مل	مركب **acid fuchsin** ١٪ فى الماء
٠,٥ مل	صبغة **orange G** ١ ٪ فى الماء
١–٤ مل	حامض خليك ثلجى

يُرج المخلوط جيدًا بعد كل إضافة، ويخزن فى زجاجة ملونة. ويفيد وجود حامض الخليك الثلجى فى عمل حد فاصل واضح بين الجدر الخلوية التى تصبغ باللون

الأخضر، والبروتوبلازم الذى يصبغ باللون الأحمر. وتتوقف كمية الحامض التى يجب إضافتها على سمك جدر حبوب اللقاح التى يراد اختبار حيويتها؛ فتكون ١، و ٢، و ٣ مل فى حالة حبوب اللقاح الرقيقة، والمتوسطة، والسميكة الجدر، على التوالى. وتكون ٤ مل عند اختبار حبوب اللقاح. وهى مازالت داخل المتوك. ويمكن إسراع عملية الصبغ بتدفئة الشريحة على اللهب بالنسبة لحبوب اللقاح ذات الجدر الرقيقة. أما حبوب اللقاح ذات الجدر السميكة .. فإنها تترك فى المحلول لمدة ٢٤-٤٨ ساعة على حرارة ٥٠°م. تصبغ حبوب اللقاح الحية باللون الأحمر، بينما تأخذ حبوب اللقاح الميتة لونًا أخضر .. ويمكن اتباع هذه الطريقة فى صبغ حبوب اللقاح، وهى داخل المتوك إن كانت المتوك صغيرة الحجم.

جـ - اختبار الصبغ بال Fluorescein Diacetate:

تتميز هذه الطريقة عن الطرق السابقة بأنها لا تعتمد على وجود أو غياب السيتوبلازم، لأن وجوده لا يعنى بالضرورة أن حبة اللقاح كاملة الخصوبة. كما يتضح من اختبارات الإنبات فى البيئات الصناعية. وتعتمد هذه الطريقة على مدى سلامة الغشاء البلازمى الخارجى Plasmalemma، حيث تسمح الأغشية غير السليمة بدخول صبغة الـ Fluorescein Diacetate، لتتحلل إلى Fluorescein فى السيتوبلازم. وتتراكم - داخليًا - مما يسمح برؤيتها لقدرتها على الاستشعاع. وقد استخدمت هذه الطريقة بنجاح فى اختبار حيوية أكثر من ٣٠ نوعًا نباتيًا، منها البصل، والطماطم.

تتميز الطريقة ببساطتها، ففى الطماطم .. أذيب ٢ مجم من الصبغة فى ١٠٠ مل أسيتون. ثم خلطت نقطة من محلول الصبغة مع نقطة من محلول ٠.٥ مولار سكروز على شريحة مجهرية، ثم أضيفت إليها حبوب اللقاح. ويفضل ترك نقطة محلول الصبغة لمدة دقيقة واحدة؛ لكى يتبخر الأسيتون قبل إضافة محلول السكروز، أو معلق حبوب اللقاح فى محلول السكروز (Peterson & Taber ١٩٨٧).

وعادة .. لا تتطلب الاختبارات الهستولوجية لحبوب اللقاح سوى ٢٠-٣٠ دقيقة، إلاّ أن مادة الصبغ كثيرًا ما تؤثر سلبيًا على حبوب اللقاح، الأمر الذى أمكن تجنبه فى الطريقة التالية.

د – توصل Abdul-Baki (١٩٩٢) إلى طريقة لتقدير حيوية حبوب اللقاح جمع فيها بين اختبارى الاستنبات فى بيئة صناعية والصبغ بالـ fluorescin diacetate (اختصارًا: FDA) وكانت كما يلى:

استنبت حبوب لقاح الطماطم فى بيئة تتكون من:

0.29 M sucrose
1.27 mM $Ca(NO_3)_2$
0.16 mM H_3BO_3
1 mM KNO_3

وبعد ضبط الـ pH عند ٥.٢ أضيفت صبغة FDA بتركيز ٠.٠٠١٪. وبهذه الطريقة أمكن تقدير حيوية حبوب اللقاح فى خلال ٣٠ دقيقة بحساب نسبة الحبوب الفلورية فى عينة منها. كما سمحت هذه الطريقة بتقدير نسبة الإنبات فى البيئة ونمو الأنابيب اللقاحية فى خلال ساعة ونصف الساعة، ولم تكن لبيئة الاستنبات أو للصبغة المستعملة أى تأثيرات ضارة على حيوية حبوب اللقاح أو نمو الأنابيب اللقاحية. وقد وجد ارتباط عالٍ بين نسبة حبوب اللقاح الفلورية ونسبة الإنبات الكلى لحبوب اللقاح؛ بما يعنى أن استشعاع حبوب اللقاح يعد دليلاً جيدًا على حيويتها حبوب اللقاح.

أمكن ملاحظة النواة الذكرية والأنثوية الخضرية بسهولة فى حبوب لقاح الأسبرجس بصبغها بمحلول كلوريد الحديديك المشبع بعد إضافته إلى المثبت Carnoy's I بمعدل ٣٠ ميكرولتر/مل (Ziauddin وآخرون ١٩٩٧).

اختبارات استنبات حبوب اللقاح

تجرى اختبارات استنبات حبوب اللقاح إما فى البيئات الصناعية *in vitro* لتقدير حيويتها، وإما على مياسم الأزهار *in vivo* لتقدير حيويتها. أو لدراسة حالات عدم التوافق.

اختبارات الاستنبات فى البيئات الصناعية

يتأثر إنبات حبوب اللقاح فى البيئات الصناعية بعوامل كثيرة. نذكر منها ما يلى:

أ – السكريات:

تعد السكريات مواد غذائية ضرورية لإنبات حبوب اللقاح، ونمو الأنابيب اللقاحية. ويجب أن يكون تركيز السكريات فى البيئة الصناعية مقاربًا لتركيزها فى حبة اللقاح لكى يكون الإنبات جيدًا. ويتناسب الضغط الأسموزى للبيئة طرديًا مع نسبة إنبات حبوب اللقاح وطول الأنابيب اللقاحية.

ب – البورون:

يؤثر البورون فى إنبات حبوب اللقاح ونموها أكثر من أى هرمون معروف، أو فيتامين أو مركب كيميائى. يشجع البورون امتصاص السكريات، وتمثيلها، ويتحد معها ليكوّن sugar-borate complexes، كما يزيد البورون استهلاك الأكسجين، ويدخل فى تمثيل المواد البكتينية اللازمة لجدر الأنابيب اللقاحية النامية. يفضل أن يكون تركيز البورون فى البيئات الصناعية ١٥٠ جزءًا فى المليون. ويستخدم حامض البوريك – غالبًا – كمصدر للبورون. ويبدو أن حبوب لقاح معظم الأنواع النباتية تفتقر – طبيعيًا – إلى البورون (Vasil ١٩٦٤).

جـ – المركبات الكيميائية الأخرى:

تساعد بعض الهرمونات، والفيتامينات، والكاروتينات، ومضادات الحيوية، والأملاح العضوية – فى كثير من الأحيان – على زيادة نسبة إنبات حبوب اللقاح فى البيئات الصناعية. ولحامض الجبريلليك تأثير كبير فى زيادة طول الأنبوبة اللقاحية. ومن المحتمل أن حبوب اللقاح تحتوى بطبيعتها على كميات كافية من بعض الهرمونات ومنظمات النمو؛ مما يجعل إضافتها إلى البيئات الصناعية غير مجدٍ.

د – التأثير الحيوى لحبوب اللقاح وأعضاء الزهرة الجنسية:

تؤدى المعاملة بمستخلصات حبوب اللقاح، أو البويضات، أو أقلام الأزهار ومياسمها إلى تشجيع إنبات حبوب اللقاح فى البيئات الصناعية. كما يؤدى تجمع حبوب اللقاح مع بعضها إلى زيادة طول الأنابيب اللقاحية. ويبدو أن ذلك مرده إلى إفراز بعض المواد المنشطة للنمو من حبوب اللقاح ذاتها.

هـ – درجة الحرارة:

تنمو حبوب لقاح معظم الأنواع النباتية فى حرارة ٢٠–٣٠°م، ويبلغ الـ Q_{10} حوالى

٢,٠. تتسبب درجات الحرارة الأعلى من ٣٠°م في انفجار الأنابيب اللقاحية واتخاذها أشكالاً غير طبيعية.

و – الـ pH:

تنمو حبوب اللقاح في مدى واسع من الـ pH، ويتراوح المجال المناسب من ٥,٥-٦,٥. ولا يتغير pH البيئات كثيرًا بعد نمو الأنابيب اللقاحية فيها لمدة ساعتين.

هذا .. ويكون منحنى نمو الأنابيب اللقاحية sigmoid (الشكل المعروف باسم حرف S) تمامًا. ولا يتغير بتغير درجة الحرارة، أو المواد الغذائية. وتظهر بالأنابيب اللقاحية لغطاة البذور حركة دورانية للسيتوبلازم cytoplasmic streaming تتناسب سرعتها وسرعة نمو الأنابيب اللقاحية.

هذا .. وقد كانت أفضل بيئة لاستنبات حبوب لقاح البازنجان – في إحدى الدراسات – هي التي تكونت من ١٪ آجار، و ١٢٪ سكرور، و ٣٠٠ جزء في المليون حامض بوريك H_3BO_3، و ٣٠٠ جزء في المليون نترات الكالسيوم $CaNO_3$. ويجرى الفحص بعد ٢-٣ ساعات من التحضين على ٢٥°م، حيث لا يحدث أي انفجار لحبوب اللقاح خلال تلك الفترة. وتأكدت صلاحية تلك الطريقة بمقارنة نتائجها مع نتائج اختبار الحيوية بالصبغ بالـ triphenyltetrazolium caloride (Guler وآخرون ١٩٩٥).

اختبارات الاستنبات في مياسم الأزهار

يستفاد من اختبارات استنبات حبوب اللقاح في مياسم وأقلام الأزهار في دراسات نسبة الإنبات، وعدم التوافق. وقد توصل Martin (١٩٥٩) إلى طريقة سهلة وسريعة لفحص الأزهار الملقحة لمعرفة درجة نمو الأنابيب اللقاحية في أقلام الأزهار بعد ١-٢ يوم من التلقيح، وهي كما يلي: تثبت أقلام ومياسم الأزهار في مخلوط يتكون من الفورمالين، وحامض الخليك، والكحول الإيثيلي ٨٠٪ بنسبة ١:١:٨، على التوالي. ثم تُلين في محلول صودا كاوية قوى (٨ عيارى)، ثم تصبغ في محلول ٠,١٪ من صبغة أزرق الأنيلين aniline blue المذابة في محلول ٠,١ عيارى من K_3PO_4 تهرس الأقلام والمياسم – بعد ذلك – بواسطة أغطية الشرائح المجهرية، وتفحص باستعمال مجهر تعتمد إضاءته على الأشعة فوق البنفسجية بطول موجة ٣٥٠ مللي ميكرونًا، ويجرى

الفحص فى حجرة مظلمة. يظهر الكالوز calluse الذى يوجد بجدر حبوب اللقاح والأنابيب اللقاحية بلون أخضر زاهٍ مصفر. بينما تظهر أنسجة القلم بلون أزرق رمادى؛ وبذا .. يمكن دراسة الإنبات. ومدى نمو الأنابيب اللقاحية فى أنسجة القلم.

هذا .. ويستدل من دراسات Fernandez-Munoz وآخرين (١٩٩٤) التى أجريت على عديد من أصناف وسلالات الطماطم المنزرعة وأنواعها البرية. والتى عرضت خلال فترة تطور وتكوين الأزهار لحرارة تقل عن ١٠°م ليلاً .. يستدل منها على وجود ارتباطات إيجابية ومعنوية بين أزواج القياسات التالية: بين عدد البذور بالثمرة، وعدد الأنابيب اللقاحية عند قاعدة القلم؛ وبين نسبة عقد الثمار الطبيعية، ونسبة حبوب اللقاح التى تصبغ بالـ acetocarmine؛ وبين نسبة حبوب اللقاح التى تصبح فلورية بعد صبغها بالـ FDA، ونسبة حبوب اللقاح التى تنبت فى البيئة الصناعية. وقد كان عدد الأنابيب اللقاحية فى قاعدة القلم أكثر القياسات ارتباطاً مع عدد البذور بالثمرة. ورغم دقة هذا القياس فإنه يتطلب جهدًا كبيرًا لإجرائه. وقد كان اختبار الصبغ بالأسيتوكارمن أفضلها كاختبار سريع ودقيق لحيوية حبوب اللقاح، ولكنه لم يكن مفيدًا – وكذلك اختبار الصبغ بالـ FDA – مع التراكيب الوراثية التى كانت حبوب لقاحها قليلة الحيوية.

ولمزيد من التفاصيل عن فسيولوجيا حبوب اللقاح بوجه عام .. يراجع Johri & Vasil (١٩٦١)، و Linskens (١٩٦٤).