zinnia، والعائق delphinum، والـ impatiens، والزنبق (السوسن) lily، وزنبق النهار day lily (Hancock ١٩٩٧).

طرق إحداث التضاعف الذاتى فى النباتات

أمكن إنتاج نباتات متضاعفة من الذرة، بتعريضها لدرجات حرارة مرتفعة، كما عرف فى الذرة – أيضًا – جين يجعل النبات قادرًا على إنتاج جاميطات متضاعفة، وهو الجين as (asynaptic) الذى يمنع التقارن الكروموسومى فى أثناء الانقسام الاختزالى.

هذا .. إلا أن مضاعفة الكروموسومات تجرى – عادة – بإحدى طريقتين، هما:

١ – إنتاج نباتات متضاعفة من نسيج الكالوس Callus Tissue:

يلزم لإنتاج نباتات متضاعفة بهذه الطريقة قطع فرع نباتى، ثم معاملة السطح المقطوع بمنظم النمو إندول حامض الخليك (IAA) فى اللانولين. وتؤدى هذه المعاملة فى بعض النباتات إلى تكون كتلة من نسيج الكالوس على السطح المقطوع، قد تنمو منها أفرع جديدة. تكون بعض هذه الأفرع رباعية التضاعف، وتنتج – لدى إكثارها خضريًا – نباتات كاملة رباعية. وقد اتبعت هذه الطريقة بنجاح فى الطماطم والتبغ.

٢ – إنتاج نباتات متضاعفة بالمعاملة بالمركبات الكيميائية:

استخدم عديد من المركبات الكيميائية فى مضاعفة كروموسومات الأنواع النباتية، وكان من أمثلتها الإيثر، والكلوروفورم، وأكسيد النتروز nitrous oxide، وكلورال هيدريت Chloral hydrate، وأسينافثين acenapthene، وإيثيل كلوريد الزئبق ethyl-mercury-chloride. إلا أن أكثر المركبات استعمالاً وأهمها فى مضاعفة الكروموسومات كان الكولشيسين colchicine، وهو ما سنتناوله بشئ من التفصيل. وقد أعقب اكتشافه – وهو مركب طبيعى – تخليق طرز أخرى صناعية منه؛ مثل الكولشيم Colchium، والكالسيميد Calcemid.

الشروط التى يجب توفرها فى النباتات التى تربى بالتضاعف

يفضل توفر الشروط التالية فى المحاصيل التى تربى بالتضاعف:

١ – أن يكون عدد الكروموسومات فيها قليلاً.

٢ – أن تزرع لأجل الأجزاء الخضرية.
٣ – أن تكون خلطية التلقيح.
٤ – أن تكون معمرة.
٥ – أن تكون قادرة على التكاثر الخضرى.

كما يجب أن تشمل مضاعفة الكروموسومات عددًا كافيًا من النباتات من سلالات ثنائية مختلفة ممثلة للصنف، بهدف استعادة أكبر قدر ممكن من التباينات الوراثية للصنف الأصلى فى الصنف الجديد (عن Agrawal ١٩٩٨).

الكولشيسين واستعمالاته فى مضاعفة الكروموسومات

كان الكولشيسين هو المركب الرئيسى المستخدم فى إحداث التضاعف الكروموسومى فى النباتات منذ أكثر من خمسين عامًا ولا يزال كذلك، وهو يستخرج من نبات *Cochium autumnale* الذى يحتوى على المركب بنسبة ٠,٤٪ من وزنه الجاف. ونتناول – فيما يلى – دراسة الكولشيسين من عدة جوانب.

كيفية إحداث الكولشيسين للتضاعف

يُحدث الكولشيسين تأثيره بمنع تكوين خيوط المغزل فى أثناء انقسام الخلية، وهو ما يمنع هجرة الكروموسومات إلى قطبى الخلية. ويؤدى ذلك إلى تكوين نواة جديدة تحتوى على ضعف العدد الأصلى من الكروموسومات. ونظرًا لأن عدد الكروموسومات يستمر فى التضاعف مع كل انقسام جديد مادام تأثير الكولشيسين باقيًا، لذا .. فإن المعاملة بالمركب يجب أن تتوقف بعد انقضاء الفترة اللازمة لإحداث التضاعف المطلوب. هذا .. علمًا بأن الخلايا الرباعية التضاعف – وأحيانًا الثمانية التضاعف – هى التى يمكن أن تستمر فى الانقسام والنمو.

طرق إضافة الكولشيسين للأنسجة النباتية

يضاف الكولشيسين للأنسجة النباتية فى إحدى الصور التالية:

١ – محلول مائى: يتراوح تركيز المحلول المائى عادة من ٠,٠٥٪–٠,٤٪.
٢ – محمَّل فى الجلسرين: يستعمل لذلك ٧.٥ مل جلسرينًا، و ٢.٥ مل ماءً، و ٦–

٨ نقاط من المادة المبللة سانتوميرز santomerse، ثم يضاف الكولشيسين بالتركيز المطلوب.

٣ – محمل فى الآجار: يضاف الكولشيسين إلى الآجار الساخن قبل تصلبه.

٤ – محمل فى مستحلب اللانولين: يحضر مستحلب اللانولين بإضافة ٢٠ مل ماء إلى ١,٥ جم حامض استياريك stearic acid، و ٠,٥٣ مل مورفولين morpholine مع التسخين إلى أن يتم ذوبان حامض الاستياريك، على ألا ترتفع درجة حرارة المخلوط عن ١٠٠°م. يحرك المخلوط بساق زجاجية إلى أن يأخذ مظهر الصابون فى اللون والقوام، ثم يضاف إليه ٨ جم لانولين lanolin مع استمرار التسخين والتلقيب إلى أن يذوب اللانولين، وحتى يصبح قوام المستحلب سميكًا نسبيًا، ثم يترك ليبرد، ويضاف إليه الكولشيسين بالتركيز المطلوب.

طرق المعاملة بالكولشيسين

تجرى المعاملة بالكولشيسين بإحدى الطرق التالية:

١ – معاملة البذور:

تنقع البذور التى يُراد معاملتها فى محلول مائى من الكولشيسين بتركيز ٠,٠٥٪–١,٥ لمدة ١–٦ أيام، علمًا بأن البذور البطيئة الإنبات تحتاج إلى مدة أطول. ويجب أن تنتهى المعاملة قبل أن تباشر البذور بالإنبات، وتغسل البذور جيدًا بعد المعاملة.

٢ – معاملة البادرات:

تعامل القمم النامية للبادرات الصغيرة بنجاح أكبر من معاملة البذور، وتستمر المعاملة لمدة ٣–٢٤ ساعة. يراعى عدم وصول الكولشيسين إلى جذور البادرات نظرًا لحساسيتها الشديدة له. وتجرى المعاملة بإحدى طريقتين كما يلى:

أ – إذا استنبتت البذور على ورق ترشيح فى أطباق بترى، وكانت جذور البادرات تتخلل ورق الترشيح بشكل جيد .. فإن المعاملة تجرى بقلب أطباق بترى بما عليها من بادرات، حتى تنغمس القمم النامية للنباتات فى محلول مائى من الكولشيسين.

ب – بلف جذور مجموعة من البادرات بقطن مبلل بالماء، ثم قلبها فى كأس به محلول مائى من الكولشيسين بنفس الطريقة السابقة، وتفضل هذه الطريقة؛ لأن

الجذور تبقى رطبة ولا تتعرض للجفاف. هذا .. وتغسل البادرات بالماء بعد انتهاء المعاملة.

٣ – معاملة النباتات الكبيرة:

تعامل الفروع الصغيرة، والبراعم الإبطية، والقمم النامية للسيقان الكبيرة بإحدى الطرق التالية:

أ – غمر القمة النامية فى محلول مائى من الكولشيسين.

ب – وضع قطعة قطن مبللة بمحلول الكولشيسين بين أوراق البرعم النامى، مع تكرار المعاملة يوميًا لمدة ٢–٦ أيام.

جـ – رش البراعم بمحلول الكولشيسين عدة مرات يوميًا. أو قد يضاف إلى البرعم الإبطى نقطة واحدة من محلول مائى من الكلولشيسين بتركيز ٠,٥٪. ياضف إليه زيت معدنى بنسبة ١٪.

د – إضافة الكولشيسين محملاً فى الجلسرين بواسطة فرشاة.

هـ – دهان القمة النامية بالكولشيسين فى مستحلب من اللانولين.

و – معاملة القمة النامية بالكولشيسين المحمل فى الآجار، مع إضافته إما بفرشاة، وإما فى نصف كبسولة توضع منكسة على البرعم.

هذا .. ويتباين كثيرًا كلا من التركيز المناسب من الكولشيسين وطريقة المعاملة – حسب المحصول – كما يلى:

١ – القطن:

تعامل القمة النامية للبادرات فى مرحلة الورقة الحقيقية الرابعة إلى الخامسة بتركيز ٠,٠٨٪ كل ١٢ ساعة.

٢ – الحمص:

تعامل البذور المستنبتة فى مرحلة بداية بزوغ الجذير بتركيز ٠,٢٥٪ كل ٣٠ دقيقة.

٣ – الفلفل:

تعامل البذور بتركيز ٠,١٪ لمدة ٨ أيام.

٤ – السمسم:

تعامل البراعم الخضرية بتركيز ٠,٤٪ بالرش مرتان فى اليوم الأول، وتكرر المعاملة فى اليومين الثالث والخامس.

٥ – البرسيم المصرى:

تعامل النموات الخضرية وهى بعمر ٤ أيام بتركيز ٠,١٪ لمدة ٨ ساعات (عن Agrawal ١٩٩٨).

يراعى عند استعمال الكولشيسين أنه مركب شديد السمية؛ فلا يجب أن يلامس الجلد فترة طويلة؛ كما أنه مرتفع الثمن، ويتلف من التخزين الطويل؛ لذا .. يجب ألا تحضر منه إلا الكمية اللازمة فقط حسب الحاجة. وتذاب الكمية المطلوبة من الكولشيسين فى قطرات من الكحول، ثم يضاف الماء ببطء لأن سرعة إضافته تجعل الكولشيسين يترسب من المحلول ثانية. ويمكن تخزين محلول الكولشيسين فى الثلاجة لأسابيع قليلة، لكنه لا يخزن مجمدًا (Avery وآخرون ١٩٤٧، و Egisti & Dustin ١٩٥٥، و Hayes وآخرون ١٩٥٥، و North ١٩٧٩).

وقد أجريت محاولات لاستبدال الكولشيسين بمركبات أخرى أقل تكلفة وسمية؛ فمثلاً .. قارن Li وآخرون (١٩٩٩) تأثير الكولشيسين بتأثير كل من المركبين:

- الإيثال فلورالين ethalfluralin، وهو داى نيتروأنيلين dinitroanilin، يسمى كيميائيًا N-ethyl-N-2-methyl-2-propenyl)-2,6-dinitro-4-trifluoromethyl)benzanine.
- الأورايزلين oryzaline، وهو – كذلك – داى نيترو أنيلين، يسمى كيميائيًا (3,5-dinitro-N4,N4-dipopylsulfanilamide).

وجد الباحثون أن الكولشيسين كان فعالاً فى إحداث التضاعف عندما استخدم بتركيز ١٠٠٠ ميكرومول مع التعريض له لمدة ٣٠ يومًا، بينما أحدث الإيثال فلورالين التضاعف فى ٥٠٪ من النباتات المعاملة عندما تعرضت له النباتات بتركيز ٥٠ ميكرومول لمدة ٩ أيام فقط، أما الأورايزلين فكان قليل الكفاءة.

ونظرًا لأن الكولشيسين شديد السمية للإنسان ومرتفع الثمن كثيرًا عن الإيثال فلورالين، فإن الأخير يمكن أن يكون بديلاً جيدًا للكولشيسين فى إحداث التضاعف.

ولمزيد من التفاصيل عن الكولشيسين واستعمالاته .. يراجع Egisti & Dustin (١٩٥٥).