البذور عند إجراء التلقيح بعد الخصى مباشرة، كما كانت البذور المنتجة أكبر حجمًا عند تأخير التلقيح. هذا وقد استُعمل فى التلقيحات مخلوط من حبوب اللقاح جُمعت فى اليوم السابق لعملية التلقيح (Jankulovski وآخرون ١٩٩٧).

يؤدى التلقيح الناجح للأزهار إلى زيادة المبايض فى الحجم فى خلال ٤–٥ أيام. وتتراوح نسبة نجاح التلقيح – عادة – بين ٥٠٪، و ٧٠٪ حسب ظروف النمو، ولكن النسبة قد تصل إلى ١٠٠٪ مع ذوى الخبرة عند إجرائهم للتلقيحات فى الظروف المناسبة للعقد. وعادة.. تكون نسبة عقد الأزهار القاعدية فى العنقود الزهرى أعلى مما الأزهار الطرفية.. ولذا.. يُوصى بتلقيح الثلاث أو الأربع أزهار القاعدية – فقط – من كل زهرة، مع قطع الأزهار المتبقية لتوفير الغذاء للأزهار الملقحة. هذا.. وأفضل الظروف لنجاح العقد هى حرارة ٢٢–٢٨°م ورطوبة نسبية ٧٠٪–٨٠٪ (Gupta ٢٠٠٠).

تداول حبوب اللقاح

جمع حبوب اللقاح

يتطلب الأمر أحيانًا جمع حبوب اللقاح بكميات كبيرة؛ كما هى الحال عند إنتاج الهجن التجارية، أو عند استخدام صنف أو سلالة معينة فى تلقيح عدد كبير من الأصناف؛ ففى حالات كهذه.. تجمع حبوب اللقاح من الصنف أو السلالة المستخدمة كأب باستعمال جهاز خاص – يعمل ببطارية – يسمى هزاز vibrator ، يهتز فيه قضيب معدنى بترددٍ عال لدى تشغيل الجهاز. ويؤدى لمس عنق الزهرة بطرف القضيب – أثناء تشغيل الجهاز – إلى سقوط حبوب اللقاح من الزهرة. وتجمع حبوب اللقاح – آنذاك – فى كبسولة جيلاتينية. تغطى الكبسولة بمجرد الانتهاء من جمع الكمية المطلوبة من حبوب اللقاح، ثم تثبت الكبسولات الممتلئة بحبوب اللقاح فى فتحات مناسبة تصنع لهذا الغرض فى قطعة من الاستيروفوم، لكى يسهل تداولها. تُجرى التلقيحات بسهولة – بعد ذلك – بغمس ميسم الزهرة المخصية فى الكبسولة المحتوية على حبوب اللقاح، ثم هزها برفق لإسقاط حبوب اللقاح الزائدة. ويعطى Villareal & Lai (١٩٧٨) طريقة تصنيع

الهزاز (الذى يسمى أيضًا جامع حبوب اللقاح pollen grain collector) من الخامات البسيطة.

ويفضل لجمع حبوب اللقاح بكميات كبيرة قطف الأزهار المذكرة المتفتحة فى الصباح الباكر، وتُفصل مخاريطها السدائية فى المختبر، حيث تجمع فى كيس رقيق من السوليفان، وتجفف تحت لمبة ١٠٠ وات توضع على ارتفاع ٣٠ سم فوق الكيس لمدة ٢٤ ساعة؛ حيث تكون الحرارة حوالى ٣٠°م. وبعد التجفيف تُوضع المخاريط السدائية فى فنجان بلاستيكى، ويغطى الفنجان بغربال ذى فتحات دقيقة، ثم يُحكم عليه الإغلاق بفنجان آخر يُستعمل كغطاء. يُرج الفنجان المغطى بقوة؛ مما يؤدى إلى خروج حبوب اللقاح من المتوك، حيث تُجمع فى الفنجان المستعمل كغطاء. ويلى ذلك تغطية الفنجان المحتوى على حبوب اللقاح بالبارفين، ويُوضع فى مجفف يحتوى على سيليكاجل، ويُحفظ فى مجمدة على -١٢°م (Gupta ٢٠٠٠).

تخزين حبوب اللقاح

أمكن تخزين حبوب لقاح الطماطم – مع حفظ حيويتها بشكل جيد – لمدة ثلاثة أسابيع؛ بوضعها داخل كبسولات جيلاتينية فى الثلاجة، مع الحذر من وصول الرطوبة إليها (Angell & Robbins ١٩٦٨).

وفى دراسة خزنت فيها حبوب لقاح الطماطم فى درجات حرارة صفر، أو ١٠°، أو ٢٠°م، وفى رطوبة نسبية منخفضة (على كلوريد الكالسيوم)، أو مرتفعة (فى الجو العادى).. وجد أن فترة احتفاظ حبوب اللقاح بحيويتها تزداد مع انخفاض كل من درجة الحرارة والرطوبة النسبية. ففى هذه الظروف.. احتفظت حبوب اللقاح بحيويتها بصورة جيدة لمدة ستة شهور. ويمكن زيادة فترة التخزين بجمع حبوب اللقاح فى الأوقات التى تسود فيها حرارة معتدلة، ورطوبة نسبية منخفضة. وقد نجحت حبوب اللقاح المخزنة لمدة سنة فى إحداث عقد بثمار سلالات طماطم عقيمة الذكر، إلا أنها كانت بكرية (McGuire ١٩٥٢).

هذا.. ويمكن لحبوب لقاح الطماطم أن تحتفظ بحيويتها كاملة لمدة لا تقل عن ١٢ شهرًا فى حرارة –٣٠ °م وهى جافة، إلاّ أن حيويتها تتدهور جوهريًّا إذا زادت فترة التخزين تحت تلك الظروف عن ٢٤ شهرًا، ويكون ذلك مصاحبًا بتدهور فى قدرة حبوب اللقاح على تمثيل البولى أمينات polyamines لدى إعادة ترطيبها؛ حيث تفقد قدتها على تحفيز نشاط الإنزيمين arginine decarboxylase، و S-adenosylmethionine decarboxylase، كما تفقد قدرتها على تمثيل البروتين (Song & Tachibana ٢٠٠٧).

كذلك وجد أن حبوب لقاح الطماطم يمكن تخزينها فى النيتروجين السائل على –١٩٦ °م لمدة ٢٢ شهرًا على الأقل، دون أن تفقد حيويتها، شريطة تعديل محتواها الرطوبى قبل بدء التخزين إلى ما بين ٦,٥٪، و ٩,٥٪، وإعادة ترطيبها بعد انتهاء التخزين (Karipidis وآخرون ٢٠٠٧).

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.

استخدم Al-Ahmadi (١٩٧٧) – لاختبار إنبات حبوب لقاح الطماطم – بيئة صناعية تحتوى على ٥٪ سكروزًا فى محلول مائى من حامض البوريك بتركيز ١٠٠ جزء فى المليون، وتتلخص خطوات تقدير نسبة الإنبات فيما يلى:

أ- توضع قطرة من البيئة المجهزة لهذا الغرض فى منخفض بعمق ٠,٨ مم فى شريحة زجاجية خاصة.

ب- تستعمل إبرة تشريح فى نقل حبوب اللقاح إلى البيئة. يحتفظ بحبوب اللقاح على طرف الإبرة التى تطرق بلطف فوق قطرة البيئة. يجب الحذر عند إجراء ذلك؛ نظرًا لأن حبوب اللقاح التى تتجمع معًا تتحرك بسرعة نحو حافة البيئة.

ج-توضع الشرائح بعد ذلك داخل أكياس بلاستيكية. مع إبقاء الرطوبة النسبية مرتفعة بداخلها باستعمال ورق ترشيح مبلل تكون أطرافه مغمورة فى الماء.

د- تقدر نسبة الإنبات بعد ذلك بتسجيل عدد حبوب اللقاح التى باشرت فى الإنبات، والعدد الكلى لحبوب اللقاح فى حقلين منفصلين تحت الميكروسكوب (الـ binocular). وقد اعتبر الباحث أن حبوب اللقاح نابتة عندما زاد طول الأنبوبة اللقاحية فيها على ٠,٠٧مم، واستخدم ميكرومتر عينى ocular micrometer لقياس أطوالها. هذا .. ويمكن استخدام البيئات الصلبة لتحقيق نفس الهدف. ولمزيد من التفاصيل فى هذا الشأن.. يراجع Gentile & Santner (١٩٧١).

وقد كانت أفضل البيئات نصف الصلبة لاختبار إنبات حبوب لقاح الطماطم تحتوى على ١٠٪ (وزن/حجم) سكروز، و١٥,١٪ (وزن/حجم) بوليثيلين جليكول ٦٠٠٠، و١,٥٪ (حجم/وزن) آجار، مع إمكان تزويدها بأى من الكورستين quercetin بمعدل ٥ مجم/لتر، أو الميريستين myricetin بمعدل ٥ مجم/ لتر (Karapanos وآخرون ٢٠٠٦).

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).

تعتبر طرق اختبار حيوية حبوب اللقاح التى تعتمد على الإنبات الفعلى لهذه الحبوب – كالطريقة التى سبق شرحها – من أفضل الطرق التى تتبع فى هذا الشأن، وتعد وسطًا بين الاختبار الفعلى لحبوب اللقاح باستخدامها فى تلقيح الأزهار، والاختبارات السريعة التى تعتمد على الأصباغ الحيوية vital staining. فمن ناحية.. يتطلب اختبار التلقيح وقتًا طويلاً وجهدًا كبيرًا، فضلاً على أنه لا يعطى نتائج دقيقة عن نسبة حبوب اللقاح التى تحتفظ بحيويتها فى العينة المختبرة. ومن ناحية أخرى.. فإن طريقة الصبغ تعطى – غالبًا – نتائج مبالغًا فيها عن الحيوية الحقيقية لحبوب اللقاح.

تعد صبغتا الأسيتوكارمن acetocarmine، وأزرق القطن cotton blue أكثر الصبغات التقليدية التى استخدمت لاختبار حيوية حبوب لقاح الطماطم. وتسمح هاتان الصبغتان بالتمييز الواضح بين حبوب اللقاح التى تحتوى على سيتوبلازم وتلك التى تخلو منه. هذا.. إلا أن حبوب اللقاح التى تحتوى على سيتوبلازم لا تكون بالضرورة كاملة الحيوية، كما تؤكد ذلك اختبارات الإنبات فى البيئات الصناعية.

ج– اختبار الصبغ بالـ Fluoroscein 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 Fluoroscein Diacetate، لتتحلل إلى Fluoroscein 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.. أُذيب 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 سلبيًّا 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.