العوامل المؤثرة في تخفيض درجة اسمرار الأجزاء النباتية للكاكي الياباني صنف هاشيا بزراعة الأنسجة النباتية

لينا بندر[1]، وسيم محسن[1]، خليل المعري[2]

ملخص

إنّ التماوت للأجزاء النباتية المزروعة بالأنسجة بنسب كبيرة هي العقبة الرئيسية في إكثار الكاكي الياباني صنف "Hachyia"، لمعرفة العوامل المؤثرة على اسمرار القمم النامية والبراعم الجانبية المزروعة داخل الانابيب للكاكي الياباني صنف هاشيا. فقد تمّ تجريب حفظ العينات بشروط حرارة 4 °م والنقع بمحلول الـ PVP (polyvinyl pyrrolidone) وتخفيض تركيز الأزوت بوسط الزراعة. فكانت المعاملة الأفضل هي زراعة العقل الجانبية بوسط MS (1/2N) بعد نقعها بمحلول الـ PVP لمدة 18 ساعة، حيث سجلت نسبة بقاء 90%.

الكلمات الدالة: الاسمرار، الكاكي الياباني صنف "Hchyia"، في الانابيب، القمم النامية، البراعم الجانبية.

المقدمة

تعدّ الكاكي فاكهة هامة اقتصادياً في العديد من الدول المتوسطية والأسيوية ،إذ أنّها تحتل المرتبة الرابعة في اليابان (Yonemori, 1997).

يضم الجنس *Diospyros* حوالي 400 نوع تنتشر في المنطقة المدارية لآسيا، افريقية ووسط أمريكا الجنوبية، وانتشرت فيما بعد في المناطق المعتدلة. يعدّ النوع *Diospyros kaki* Persimmon الأكثر انتشاراً (Yonemori *et al*., 2000; FAOSTAT. 2012).

تعدّ شجرة الكاكي من أشجار الفاكهة ذات المستقبل الواعد في سوريا كونها متأخرة بالإزهار حتى نهاية نيسان وأول أيار مما يجنبها خطر تكون الصقيع المبكر، وهي قادرة على تحمّل انخفاض درجات الحرارة إلى حدود تصل من c° 8- إلى 20- وتعدّ هذه الشجرة متحملة للجفاف، إضافة لكونها تحتل موقع الفاكهة الطازجة الرئيسية في سوق الفاكهة السورية في الفترة الممتدة من الخريف لبداية الشتاء أي قبل تداول الحمضيات وبعد انتهاء فترة تواجد الثمار الصيفية في هذه الأسواق (Dairi *et al*., 1991).

ونتيجة لتغير أنظمة الإنتاج التقليدية للكاكي السريع في جميع أنحاء العالم في السنوات العشر الأخيرة، فقد طُوّرت أنظمة جديدة لإنتاج الكاكي في المناطق شبه الاستوائية من العالم. حيث يزرع الكاكي بكثافة عالية باستخدام أشجار مكاثرة خضرياً تمّ الحصول عليها باستخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية كما أشار (George *et al*., 2003).

بدأت الدراسات على الكاكي الياباني في الأنابيب الزجاجية في اليابان منذ عام 1989، حيث تناولت إحدى هذه الدراسات الإكثار الخضري الدقيق لهذه الشجرة، بهدف الحصول على عدد كبير من النباتات على مدار العام إذا أخذنا بعين الاعتبار أنّ فترة النشاط للشجرة بالطبيعة تقتصر على المدة من بداية شهر شباط لآخر شهر حزيران الأمر الذي شجع الباحثين على اكثار الكاكي الياباني بطريقة زراعة الانسجة (Fukui *et al*., 1990). كما بين العالم الايطالي (Delia *et al*., 2008) إن الصنف

[1] طالبة دراسات عليا ماجستير

[1] الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- مركز البحوث العلمية الزراعية في السويداء- ص. ب 461. wasimmo6@yahoo.com

[2] قسم علوم البستنة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، دمشق، سورية.

تاريخ استلام البحث 2016/10/26 وتاريخ قبوله 2017/4/20.

©2018 عمادة البحث العلمي/ الجامعة الأردنية. جميع الحقوق محفوظة.

(*Diospyros kaki* cv.Tipo) تم إنتاجه باستخدام الإكثار الخضري الدقيق؛ إذ ساهمت هذه الطريقة بإيجاد حل لهذا الصنف نظراً لأنه من الأصناف صعبة الإكثار بالطرائق التقليدية، وهذا قد ساهم في رفع عبء استيراد هذه الفاكهة عن إيطاليا.

يلاحظ في بعض النباتات وخاصة الخشبية منها مثل الكاكي الياباني بصفات غير مرغوبة كالاسمرار أو الاسوداد للأجزاء المأخوذة منها عند إجراء جروح فيها مما يشكل عائقاً أمام نموها وتطورها عند زراعتها داخل الانابيب(Pierik, 1986, Xiupu *et al*.,1999, Zhcn, 2013).

إنّ أكسدة المركبات الفينولية الناتجة عن إجراء جروح على الجزء النباتي تؤدي إلى موته وفشل إكثاره بزراعة الأنسجة (Pierik, 1986, North *et al*.,2010). ويتم تصنيف الاسمرار إلى نوعين حيث تتراكم في النوع الأول الفينولات المفرزة من الجزء النباتي المزروع في وسط الزراعة وفي الثاني تتجمع هذه المركبات ضمن أنسجة الجزء النباتي. والاسمرار سابق الذكر هو الاسمرار القاتل Lethal browning in, ويلاحظ في العديد من الأنواع الاستوائية وشبه الاستوائية ومنها الكاكي الياباني (Laukkanen *et al*.,1999; Ahmad *et al*., 2013).

وقد فسّر Pierik, 1986, Ziv and Halevy, 1983, (Laukkanen *et al*., 1999) النكروز والتّماوت الذي يصيب الجزء النباتي المزروع بالأنسجة بسبب حدوث أكسدة للمركبات الفينولية وينتج عنها كيتونات سامة. وقد أشار Pierik(1986) لإمكانية التخفيف من ظاهرة الاسمرار بعدة طرائق: كالتخفيف من تركيز الأملاح بوسط الزراعة، وإضافة الـ (PVP) polyvinyl pyrrolidoneلوسط الزراعة بتركيز 250− 1000 mg/l. حيث استخدم العديد من الباحثين الـ PVP للتخفيف من تأثير الاسمرار على العقل القمية والجانبية المزروعة بالأنسجة للكاكي الياباني(Ai and Luo, 2005; Niu, 2010). كما يعد حفظ الأجزاء النباتية بشروط الحرارة c° 4 طريقة بسيطة وغير مكلفة وفعالة بالتقليل من الأضرار التي يسببها الاسمرار على هذه الأجزاء. إضافة لأن نقع هذه الأجزاء بمحلول يحوي مضادات أكسدة هو من أسرع وأسهل الطرق للتخفيف من سمية الفينولات المفرزة والمسببة لهذه الظاهرة (Ziv and Halevy, 1983; Jartoodeh et al., 2013).

إنّ هدف هذه الدراسة تحديد الأسلوب الأفضل لتجاوز التأثيرات السلبية لظاهرة الاسمرار في الكاكي الياباني صنف Hachyai والتي تشكل عاملاً معيقاً لعملية إكثار الكاكي بالأنسجة.

مواد البحث وطرائقه:

مواد البحث: أجري البحث في مخبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لمركز السويداء للبحوث العلمية الزراعية خلال عامي (2015 /2014) حيث استخدمت في تنفيذ التجارب غراس بعمر سنتين مزروعة بالبيت البلاستيكي.

الزراعة الأولية Intial culture:

أخذت نموّات طرفية بطول 30 cm من غراس بعمر سنتين موجودة بالبيت البلاستيكي الخاص بمركز السويداء للبحوث العلمية الزراعية وذلك خلال الفترة الممتدة من نيسان إلى أيلول.

تجهيز الأجزاء النباتية والتعقيم السطحي:

جمعت طرود من المادة النباتية بطول 30. cm إذ تمّ قص الفروع وإزالة الأوراق وقسمت إلى مجموعة من الأجزاء النباتية بطول (0.5-1 cm) باستثناء الأجزاء النباتية التي طبق عليها تجربة النقع بمحلول الـ PVP حيث نقعت قبل الغسيل، ثم غسلت تحت الماء الجاري لمدة ساعة مع إضافة سائل منظف كمادة تعمل على إزالة ما هو عالق بها من أحياء مجهرية أو غبار، ثمّ غمرت بالمبيد الفطري ميكزوميت بتركيز (2.0 g/L) لمدة ربع ساعة وبعدها غسلت بالماء المقطر ثلاث مرات.عقمت الأجزاء النباتية بعد ذلك حيث غمرت في الكحول 70% لمدة دقيقة، وعزلت العينات تحت جهاز العزل الجرثومي (Laminar Air Flux Hood) ثم عقمت في محلول هيبوكلوريت الصوديوم (كلوركس التجاري يحوي المادة الفعالة بنسبة 5.25 %) بتركيز 20% لمدة 15 دقيقة مع إضافة نقطة توين20 لكل 100 ml محلول، ثم غسلت 3 مرات بماء مقطر معقم.

وسط الزراعة:

تم استخدام وسط الزراعة الأولية Murashige and skoog (1962) منخفض تركيز الأملاح المعدنية للنصف 1/2 MS وأضيف إلى الوسط المغذي العناصر التالية: 1 mg/l Thiamine-HCl, 100 mg/l Myo-inositol, Agar 7g/l , PVP poly vinyl pyrrolidone 0.6g/l وضبط pH المحلول على 5.8.

زرعت عقل القمية والجانبية في مرطبانات بطول 11 سم وقطر 5.5 سم يحتوي كل منها على 15 مل من الوسط الغذائي MS 1/2 خالٍ من الهرمونات.عقمت الأوساط المغذية على درجة حرارة ^{O}C 121 وتحت ضغط 1.04 kg/cm^2 1.04 في جهاز التعقيم (Autoclave) لمدة 20 دقيقة.

شروط غرف النمو:

حفظت الزراعات بفترة ضوئية 16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام وعلى درجة حرارة (23± 2) درجة مئوية باستثناء تجربة تأثير البرودة فقد حفظت الزراعات بعد الزراعة بدرجة حرارة مقدارها 4 درجة مئوية فقد حفظت بشروط البرودة حسب الجدول رقم (2).

درجات الاسمرار وموعد أخذ القراءات:

تمّ تقسيم درجات الاسمرار الملاحظة إلى أربع درجات حسب الجدول رقم (1) وقد سجّل كل من نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة العقل المتفتحة ومقدار الاستطالة المتشكلة ودرجة الاسمرار الملاحظة بعد 4 أسابيع من الزراعة بالتجارب المدروسة كافة.حيث تمّ وضع الجدول رقم (1) كمقياس لدرجة الاسمرار حسب ملاحظاتنا.

الجدول رقم (1) درجات الاسمرار الملاحظة أثناء زراعة الأجزاء النباتية داخل الانابيب

درجة الاسمرار	0	1	2	3
الدلائل الظاهرة على الجزء النباتي	الجزء النباتي خالي من الاسمرار	ظهور الاصفرار على الجزء النباتي	امتداد الاسمرار حتى منتصف الجزء النباتي	الاسمرار يمتد على كامل الجزء النباتي

وتمّ بهذا البحث دراسة أهم العوامل المؤثرة في اسمرار الكاكي المزروع باستخدام طرائق زراعة الأنسجة النباتية.

- تأثير موعد أخذ الأجزاء النباتية حيث زرعت 40 برعماً جانبياً بكل شهر من الفترة الممتدة من شهر نيسان إلى شهر أيلول. لدراسة العلاقة بين أشهر السنة ونسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة العقل المتفتحة ومقدار الاستطالة المتشكلة ودرجة الاسمرار الملاحظة حيث زرعت في الوسط MS 1/2 مضاف لهPVP بتركيز 0.6g/l .
- تأثير معاملة البرودة حيث درست مجموعة من المعاملات التي تبيّن تأثير الحفظ بدرجة حرارة 4 ^{O} م على نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة العقل المتفتحة ومقدار الاستطالة المتشكلة ودرجة الاسمرار الملاحظة موضحة بالجدول رقم (2).

الجدول رقم (2): المعاملات المدروسة لتحديد تأثير الحفظ بدرجة حرارة 4 c° على المؤشرات المقاسة لظاهرة الاسمرار

رمز المعاملة	مدة الحفظ بدرجة حرارة 4 c°
شاهد	بدون حفظ بدرجة حرارة 4 c°
1	لمدة 24 ساعة
2	لمدة 3 أيام
3	لمدة 7 أيام

تأثير معاملة النقع بمحلول تركيزه 0.6 g/l من الPVP حيث درست مجموعة من المعاملات التي تبيّن تأثير النقع على نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة العقل المتفتحة ومقدار الاستطالة المتشكلة ودرجة الاسمرار الملاحظة والموضحة بالجدول رقم (3).

الجدول رقم (3): المعاملات المدروسة لتحديد تأثير النقع بمحلول الـ PVPعلى المؤشرات المقاسة لظاهرة الاسمرار.

رمز المعاملة	مدة النقع بمحلول الـ PVP
1	3 ساعات
2	18 ساعة
3	48 ساعة
4	96 ساعة

- تأثير معاملة تخفيف تركيز الأزوت حيث درست مجموعة من المعاملات التي تبيّن تأثير تخفيف تركيز الأزوت في تركيب كل من الوسطين المستخدمين سواء بتركيزه الكامل (MS (1/2 N)) أو بنصف قوة التركيز((1/2 MS(1/2 N)) على نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة العقل المتفتحة ومقدار الاستطالة المتشكلة ودرجة الاسمرار الملاحظة والموضحة

بالجدول رقم (4).

الجدول رقم (4): المعاملات المدروسة بتجربة لتحديد تأثير الفترة الضوئية على المؤشرات المقاسة لظاهرة الاسمرار

رمز المعاملة	تركيب الوسط المستخدم بكل معاملة
C1	MS
C2	1/2 MS
C3	(1/2 N) MS
C4	(1/2 N)1/2 MS

التحليل الإحصائي:

سجلت نتائج التجارب الستة المدروسة في جداول وحُللت باستخدام البرنامج الإحصائي Genestat. إذ قورنت متوسطات 40 عقلة جانبية (مكرر) بتجربة تأثير موعد أخذ الأجزاء النباتية في مقدار الاستطالة المتشكلة وأخذت لكل شهر، و20 عقلة قمية (مكرر) و20 عقلة جانبية (مكرر) لكل معاملة نقع بمحلول الـ PVP، وقورن بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01. وحللت النتائج بطريقة التصميم العشوائي البسيط.

النتائج والمناقشة:

التجارب التي أجريت للتخفيف من تأثير ظاهرة الاسمرار على الكاكي الياباني صنف "Hachyia":

تأثير موعد أخذ الأجزاء النباتية في الحد من تأثير ظاهرة الاسمرار:

تبيّن من خلال دراسة الجدول رقم (5) وجود علاقة بين أشهر السنة ونسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة الأجزاء المتفتحة ومتوسط الاستطالة. حيث يبيّن الجدول رقم (5) حيث تفوّق شهرا نيسان وأيار بنسبة بقاء 95%، 90% على الترتيب بالمقارنة مع باقي أشهر الفترة المدروسة من عام 2014 (تموّز– آب– أيلول) كونها الأشهر التي انخفض فيها متوسط عدد الأجزاء المتبقية على قيد الحياة 57.5%, 20% ,7.5 في حين انخفض متوسط عدد الأجزاء المتبقية على قيد الحياة في شهري آب وأيلول لتسجل 20 % ,7.5 % على التوالي.

كما نبين من نتائجنا ان سجّل شهري نيسان وأيار أدنى نسبة اسمرار20%، 25% على الترتيب بالمقارنة مع باقي أشهر الفترة المدروسة (تموّز– آب– أيلول) كونها الأشهر التي ارتفعت نسبة الاسمرار فيها 57.5% ,95 % ,100 في حين ارتفعت نسبة الاسمرار في شهري آب أيلول لتسجل 95%، 100% (جدول 5) وهذا يتفق مع العديد من الدراسات السابقة ان تحديد الفترة التي يكون إفراز الفينولات بحدوده الدنيا من أهم الوسائل للحد من ظاهرة الاسمرار بزراعة الأنسجة (Baydar, 2006; Amine and Meziani, 2015) الامر الذي يتفق مع نتائجنا. من جهة اخرى اظهرت دراستنا إن النتائج التي توصّل إليها هذا البحث تختلف مع ما ذكره (Xiupu et al., 1999) أنّ شهر شباط هو الموعد الأفضل لجمع الأجزاء النباتية بالكاكي الياباني (Diospyros kaki cv. linn) وذلك بسبب الاختلاف بين المنطقة الجغرافية التي نفذّ فيها البحث المشار إليه في الصين ودراستنا الحالية، إلا أنها تتوافق مع ما أشار (Poudyal et al., 2008) والذي يبيّن زيادة افراز المركبات الفينولية بالعقل القمية والجانبية المزروعة من ثلاثة أصناف للإجاص بأشهر الصيف مقارنة مع أشهر الربيع وذلك مع ارتفاع درجة الحرارة.

أمّا نسبة الأجزاء المتفتحة فكانت سجلت النسبة الأعلى في شهري نيسان وأيار حيث سجلت 90 % ,70 %. ثم انخفضت بشكل كبير بشهر حزيران لتسجل 5 %. وانعدم تفتح النموات بباقي أشهر الفترة المدروسة (تموّز– آب– حزيران) (جدول 5). من جهة اخرى كان أعلى متوسط للاستطالة المتشكلة في الاجزاء النباتية التي تم الحصول عليها في شهري نيسان وأيار 0.2 cm, 0.1. (جدول 5).

يمكن أن نستنتج إنّ شهري نيسان وأيار هما الموعد الأفضل لأخذ الأجزاء النباتية اللازمة لتأسيس الزراعات الأولية بالكاكي الياباني صنف "Hachyia" من أجل الحصول على مادة نباتية سليمة وذات نسبة اسمرار منخفضة لأن الاسمرار قد يعتبر عاملاً محدداً لإكثار الكاكي بزراعة الأنسجة النباتية في حال تراكمه بالأنسجة بدرجات كبيرة.

الجدول رقم (5): تأثير موعد أخذ الأجزاء النباتية على نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة الأجزاء المتفتحة ومتوسط الاستطالة بعد 4 أسابيع من الزراعة.

موعد الزراعة	نسبة البقاء %	نسبة الاسمرار %	نسبة الأجزاء المتفتحة %	متوسط الاستطالة
شهر نيسان	95	20	90	0.2 [a]
شهر آيار	90	25	70	0.1 [b]
شهر حزيران	77.5	37.5	5	0.02 [c]
شهر تموّز	57.5	57.5	0	0 [c]
شهر آب	20	95	0	0 [c]
شهر أيلول	7.5	100	0	0 [c]
LSD				0.04
Cv				9.2

ملحوظة :الاحرف المتشابهة بحرف واحد على الأقل في العمود نفسه يشير إلى أن الفروق غير معنوية عند مستوى المعنوية 0.01.

تأثير معاملة البرودة على المؤشرات المرتبطة بظاهرة الاسمرار

تبيّن من خلال دراسة الجدول رقم (6) أنّ لمعاملة البرودة دوراً إيجابياً بالتخفيف من ظاهرة الاسمرار حيث أدت لزيادة نسبة البقاء مع زيادة مدة الحفظ بالبراد, ولقد تفوّقت المعاملة الثالثة (7 أيام برودة) عند استخدام العقل الجانبية والقمية بشكل معنوي بالمقارنة مع باقي المعاملات المدروسة.

أظهرت العقل الجانبية استجابة أكبر من العقل القمّية بنسب البقاء، حيث كانت بالمعاملة 3 الأفضل وكانت نسبة البقاء 80 % عند استخدام العقل الجانبية و50 % عند استخدام العقل القمّية؛ وتوافقت نتائج هذا البحث مع أشار إليه (Giordani *et al*., 2002) من أنّ حفظ النمّوات بالبراد لمدة سبعة أيام بعد الزراعة ساهم بشكل واضح بالحد من الاسمرار بالكاكي الياباني من جهة, بينما اختلفت النتائج مع ما أشار إليه (Junlian *et al*., 2007) بأنّ أربعة أيام بشروط البرودة للعقل القمّية كانت كافية. ويرجع ذلك لاختلاف الصنف المدروس والذي له دور كبير باختلاف غزارة الفينولات التي يفرزها كما أوضح (Baydar., 2006) وقد بينت نتائج هذا البحث بأنّ الحفظ لمدة سبعة أيام أكثر فعالية بحالة الصنف "Hachyia".

وبالنسبة لدرجة الاسمرار فقد كانت مرتفعة وبالدرجة الثالثة في معاملة الشاهد ومعاملة رقم 1 و 2 وانخفضت درجة الاسمرار للدرجة الثانية في المعاملة 3 (الشكل1) وذلك عند استخدام العقل القمّية، أمّا في حال استخدام العقل الجانبية فكانت درجة الاسمرار كبيرة (درجة ثالثة) في المعاملة الشاهد ثمّ انخفضت إلى الدرجة الثانية في المعاملة رقم 1 ثمّ انخفضت إلى الدرجة الأولى في المعاملتين رقم 2 و3 (الشكل 2)

وقد تدرجت نسبة البقاء عند استخدام العقل القمية في الشاهد, المعاملة 1,المعاملة 2، المعاملة 3 لتسجل 5%، 10%، 35%، 50%. أمّا عند استخدام العقل الجانبية فسجلت % 35، % 40، 55%، % 80.

وكانت نسبة الاسمرار أخفض ما يمكن بالمعاملة رقم 3 حيث سجلت % 85 عند استخدام العقل القمية و75% عند استخدام العقل الجانبية. ثم سجلت بالمعاملة 2 والمعاملة 1و الشاهد % 90، % 100، 100% عند استخدام العقل القمية و% 85، % 85، % 95 عند استخدام العقل الجانبية. ولم يلاحظ تفتح نموات لأنّ المركبات الفينولية تلعب دوراً مانعاً للنمو في العقل المزروعة بالأنسجة

الجدول رقم (6) : تأثير الحفظ بدرجة حرارة 4 Cº على نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة الأجزاء المتفتحة ومتوسط الاستطالة للعقل القمية والجانبية للكاكي الياباني

المعاملات	القمم النامية				البراعم الجانبية			
	نسبة البقاء %	نسبة الاسمرار %	نسبة البراعم المتفتحة %	درجة الاسمرار	نسبةالبقاء %	نسبة الاسمرار %	نسبة البراعم المتفتحة %	درجة الاسمرار
شاهد	5	100	0	3	35	95	0	3
لمدة 24 ساعة	10	100	0	3	40	85	0	2
لمدة 3 أيام	35	90	0	3	55	58	0	1
لمدة 7 أيام	50	**85**	0	2	80	**75**	0	1

الشكل (1): الاسمرار يغطي نصف سطح العقلة القمية بعد الحفظ بالبراد لمدة 7 يوم

الشكل (2): الاصفرار يغطي سطح العقلة الجانبية بعد الحفظ بالبراد لمدة ثلاثة أيام.

تأثير النقع بمحلول الـ PVP على المؤشرات المرتبطة بظاهرة الاسمرار:

تبيّن من خلال دراسة الجدول رقم (7) أنّ معاملة النقع بمحلول PVP 0.6 g/l أثبتت فعالية في التخفيف من الاسمرار، حيث تفوّقت المعاملة رقم 2 عند زراعة العقل القمّية والعقل الجانبية، أمّا نسبة البقاء الأقل فسجلت في

الشاهد عند استخدام العقل القمّية. (الشكل 3 و 4)

وقد تمّ تقسيم العقل الجانبية والقمّية بشكلها النهائي قبل معاملة النقع لأن جرح الجزء النباتي يعدّ إجهاد يقود لإنتاج الفينولات مما يؤكد ضرورة ذلك لجعل المعاملة فعالة بشكل أكبر وهذا بالتوافق مع ما توصل اليه (Mustafa *et al.*, 2013).

وبدراسة نسبة البقاء سجل الشاهد والمعاملة رقم 4 النسبة الأقل بالمقارنة مع المعاملة رقم 1، والمعاملة رقم2، والمعاملة رقم 3 وذلك عند استخدام العقل القمية والجانبية. وقد جاءت نسب الاسمرار المسجلة لتؤكد هذه النتائج فكانت عالية بحالة الشاهد والمعاملة 4 وأقل بالمعاملات رقم1، رقم2، رقم3. ولم يلاحظ أي تفتح بالعقل القمية باستثناء المعاملة رقم 2، والمعاملة رقم 3 اللتين سجلتا % 55، 30%.

الجدول رقم (7): تأثير النقع بمحلول الـ PVP على نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ودرجة الاسمرار ومتوسط الاستطالة للقمم النامية للكاكي الياباني

المعاملات	العقل القمية				
	نسبة البقاء %	نسبة الاسمرار %	درجة الاسمرار	نسبة العقل المتفتحة %	مقدار الاستطالة المتشكلة
شاهد	5	100	3	0	0 [b]
3 ساعات	40	60	0	0	0[b]
18 ساعة	80	20	0	55	0.3 [a]
48 ساعة	60	40	0	30	[b]30.1
96 ساعة	25	75	0	0	0 [b]
LSD					0.14
Cv					7.5

ملحوظة : الاحرف المتشابهة بحرف واحد على الأقل في العمود نفسه يشير إلى أن الفروق غير معنوية عند مستوى المعنوية 0.01.

الشكل (3): العقل القمية خالية من الاسمرار بعد أربعة أسابيع من نقعها بمحلول الـ PVP لمدة 18 ساعة

تبيّن من خلال دراسة الجدول رقم (8) أنّ معاملة النقع بمحلول PVP 0.6 g/l أثبتت فعالية في التخفيف من

الاسمرار، حيث تفوّقت المعاملة رقم 2 عند زراعة العقل القمّية والعقل الجانبية، أمّا نسبة البقاء الأقل فسجلت في الشاهد عند استخدام العقل الجانبية.

أمّا عند استخدام العقل الجانبية فقد لوحظ بالمعاملة رقم 1، والمعاملة رقم 2، والمعاملة رقم 3 التي سجلت 40%، 100%، 60 % على التوالي.

عند دراسة نسبة البقاء سجل الشاهد والمعاملة رقم 4 النسبة الأقل بالمقارنة مع المعاملة رقم 1، والمعاملة رقم2، والمعاملة رقم 3 وذلك عند استخدام العقل الجانبية.

الجدول رقم (8): تأثير النقع بمحلول الـ PVP على نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ودرجة الاسمرار ومتوسط الاستطالة للبراعم الجانبية للكاكي الياباني

المعاملات	العقل الجانبية				
	نسبة البقاء %	نسبة الاسمرار %	درجة الاسمرار	نسبة العقل المتفتحة %	مقدار الاستطالة المتشكلة
شاهد	35	100	3	0	0 c
3 ساعات	70	30	0	40	0.17 b
18 ساعة	90	10	0	100	0.44 a
48 ساعة	80	20	0	60	0.2 b
96 ساعة	40	85	0	0	0 c
LSD					0.12
Cv					18.1

ملحوظة : الاحرف المتشابهة بحرف واحد على الأقل في العمود نفسه يشير إلى أن الفروق غير معنوية عند مستوى المعنوية 0.01.

اتفوقت المعاملة رقم 2 (48 ساعة نقع) على باقي المعاملات المدروسة معنوياً من حيث متوسط الاستطالة، حيث سجلت عند استخدام العقل القمية 0.3 cm والعقل الجانبية 0.44 cm. وعند زراعة العقل الجانبية جاءت المعاملة رقم 1 والمعاملة رقم 3 بالمرتبة الثانية حيث سجلت 0.17 سم، 0.2 سم وانعدم تفتح النموات بالشاهد والمعاملة رقم 4. ولم يلاحظ أي فروق معنوية بين الشاهد والمعاملات رقم 1 ورقم 3 ورقم 4 عند استخدام العقل القمية.

وفي ما يرتبط بنوع الجزء النباتي فقد كانت استجابة العقل الجانبية أفضل من العقل القمية من حيث المؤشرات المدروسة كافة ففي المعاملة الأفضل سجلت العقل القمية نسبة بقاء % 80، نسبة اسمرار 20%، نسبة التفتح % 55، مقدار استطالة 0.3 سم. أمّا عند استخدام العقل الجانبية فكانت نسبة البقاء % 90، ونسبة الاسمرار % 10، نسبة التفتح % 100، ومقدار الاستطالة 0.44 cm.

وبالنسبة لدرجة الاسمرار المسجلة بعد 30 يوم من الزراعة فقد لوحظ أنّ العقل القمية والجانبية المتبقية على قيد الحياة خالية من الاسمرار مقارنة مع الشاهد غير المنقوع الذي سجل درجة اسمرار في الدرجة الثالثة وهذا ما يؤكد ضرورة تطبيق معاملة النقع بمحلول الـ PVP قبل الزراعة لتخليص الأجزاء النباتية من المركبات الفينولية.

حيث توافقت نتائجنا مع ما ذكروه، حيث تقاربت النتائج بهذه التجربة والتي أكدت فعالية معاملة النقع بمحلول الـ PVP لمدة 18، 48 ساعة للتقليل من الاسمرار مع ما أشار إليه(Kaitlin and Rochelle, 2013) حيث بيّن أنّ فعالية النقع لمدة 20, 48 ساعة بمحلول ال PVP بتركيز 0.5 g/l

في العقل الجانبية للكاكي الياباني.

وأشار (Xiupu *et al.*, 1999) إنّ تخفيف الاسمرار بالعقل القمّية للكاكي الياباني كانت عند النقع بمحلول الـ PVP مدة 24 ساعة نقع, كما فسّر (Idris *et al.*, 2006) الزيادة بنسبة الأجزاء النباتية المتأثرة بالاسمرار والمتماوتة مع زيادة مدة النقع بمضاد الأكسدة عن حد معين بتراكم لكمية أكبر من الفينولات في محلول النقع الأمر الذي يؤدي لزيادة تركيزها وإحداثها ضرر في الأنسجة النباتية المنقوعة هذا يتوافق مع ما توصل إليه هذا البحث حيث انخفضت نسبة النباتات المتبقية على قيد الحياة في المعاملة 4 أي مع زيادة مدة النقع حتى 96 ساعة.

ولكون العقل الجانبية أكثر استجابة لمعاملات التخفيف من الاسمرار من العقل القمّية فقد تمّ الاكتفاء بزراعة العقل الجانبية للحصول على النموات التي استخدمت بمرحلة الإكثار والاستطالة وهذا يتوافق مع كون العقل الجانبية التالية للعقل الجانبية بالإجاص أقل إفراز للفينولات من العقل الجانبية الواقعة بعد العقل القمّية وهي أقل إفراز للفينولات من العقل القمّية وقد تكون زيادة إفراز الفينولات وتركمها ضمن الأنسجة التي تصاب بالاسمرار المميت كلما كانت الأنسجة أقل عمراً وغضة أكثر بسبب الزيادة في حساسية الجدر الخلوية كلما كانت أكثر حداثة (Jartoodeh *et al.*, 2013).

الشكل (4): العقل الجانبية خالية من الاسمرار بعد أربعة أسابيع من نقعها بمحلول الـ PVP لمدة 18 ساعة

تأثير تخفيف تركيز النتروجين في الوسط المستخدم على المؤشرات المرتبطة بظاهرة الاسمرار:

تبيّن من خلال دراسة الجدول رقم(9) أنّ للتخفيف من تركيز النتروجين بوسط الزراعة دوراً إيجابياً بالتقليل من تأثير الاسمرار بحالة العقل الجانبية حيث تحسّنت نسبة البقاء وانخفضت نسبة الاسمرار بالمعاملتين C_3 وC_4 بالمقارنة مع المعاملةC_1, وهذا توافق مع تخفيض (Kochanová *et* Fukui *et al.*,1989, *al.*,2011) لتركيز الأزوت باستخدام وسط MS (1/2 N) لتجاوز الاسمرار عند زراعة العقل الجانبية للكاكي الياباني. أمّا عند استخدام العقل القمية فقد سجلت المعاملة C4 نسبة البقاء الأعلى ونسبة اسمرار أقل , وهذ يتوافق مع ما توّصل له (Fukui *et al.*, 1989) لأن الوسط 1/2MS (1/2N) هو الوسط الأفضل للتخفيف من تأثير الاسمرار عند دراسته لتأثير عدة أوساط على الاسمرار بالكاكي الياباني يليه الوسط MS (1/2N) وقد اتجه للوسط الثاني لتوفير احتياجات نموات الكاكي الياباني من النتروجين.

أمّا بالنسبة لنوع الجزء النباتي المستخدم فسجلت العقل الجانبية نسب بقاء % 15, % 35,% 55, 70% في المعاملات المدروسة C1, C2, C3, C4 بالمقارنة مع نسب بقاء أقل سجلت عند استخدام العقل القمية (0, 5, 20, 50%).

وقد ارتفعت نسبة الاسمرار بالمعاملات C1, C2, C3, حيث سجلت 100%, 100%, 95 % بالعقل القمية والجانبية بالمقارنة مع المعاملة C4 التي سجلت % 65 بالعقل الجانبية و% 50 بالعقل القمية.

وقد تحسنت درجة الاسمرار مع تخفيض تركيز النتروجين بالوسط حيث ترافق التماوّت مع درجة اسمرار الثالثة في المعاملتين C_1, C_2. بينما في المعاملة C_3 أصبحت درجة الاسمرار عند مستوى الدرجة الأولى (الشكل 5) لتكون العينات في المعاملة C_4 خالية بشكل كامل من الاسمرار بكل من العقل القمية والجانبية الدرجة 0 أي انخفضت درجة الاسمرار في الأجزاء النباتية تدريجياً مع انخفاض تركيز الآزوت في الوسط المزروعة فيه.

وقد تفوّقت المعاملة رقم 4 على المعاملات رقم 1 و2 و3 عند استخدام العقل القمية والجانبية كأجزاء نباتية بنسبة

اسمرار أقل. ولم يلاحظ تفتّح أي نموات بالمعاملات المدروسة كافة ويعود ذلك بالمعاملات رقم 1 و2 و3 بسبب تثبيط الإفرازات الفينولية لنموها. ورغم كون الأجزاء النباتية المزروعة في المعاملة رقم 4 خالية من الاسمرار إلا أنّ الوسط احتوى كمية أقل من احتياجاتها للتفتح والتطور (Fukui *et al.*, 1992).

كما أشار (Ibrahim *et al.*, 1999) أنّ لإضافة بعض العناصر المعدنية بتراكيز عالية لوسط الزراعة دور بزيادة إفراز الفينولات وبالتالي زيادة تأثير ظاهرة الاسمرار على الجزء النباتي المزروع, حيث تبيّن أنّ التراكيز العالية من الأمونيوم تزيد من الحموضة وتقلل من امتصاص البوتاسيوم بالتالي تزيد إفراز الفينولات مما يفسر الاتجاه للتخفيض من تركيز هذه العناصر بالوسط ومنها الأزوت للتخفيف من تأثير ظاهرة الاسمرار.

الجدول (9): تأثير تخفيض تركيز النتروجين في الوسط على نسبة البقاء ونسبة الاسمرار ونسبة التفتح للعقل ودرجة الاسمرار بعد انقضاء 30 يوم من الزراعة في المعاملات المدروسة

المعاملات	العقل القمية				العقل الجانبية			
	نسبة البقاء %	نسبة الاسمرار %	نسبة العقل المتفتحة %	درجة الاسمرار	نسبة البقاء %	نسبة الاسمرار %	نسبة العقل المتفتحة %	درجة الاسمرار
C1	0	100	0	3	15	100	0	3
C2	5	100	0	3	35	100	0	3
C3	20	90	0	1	55	95	0	1
C4	50	65	0	0	70	50	0	0

الشكل (5): ظهور الاسمرار بالدرجة الأولى على العقل الجانبية بعد زراعتها بوسط MS (1/2N)

التوصيات والمقترحات

إنّ المعاملة الأفضل للتخفيف من تأثير الاسمرار عند زراعة الكاكي الياباني صنف "Hachyia" بالأنسجة هي جمع العقل الجانبية خلال شهري نيسان وأيار ونقعها بمحلول الـ PVP لمدة 18 ساعة حيث يمكن لهذه النتائج أن تقلل من تكلفة الاكثار الخضري الدقيق لشجرة الكاكي الياباني لأن ظاهرة الاسمرار أو تشكل المركبات الفينولية أثناء الإكثار الدقيق تعتبر عاملا محداً للاستمرار بتطبيق بروتوكول الإكثار

الدقيق، ومن هنا تأتي أهمية نتائج هذا البحث في إيجاد أفضل الشروط اللازمة للتخلص من ظاهرة الاسمرار التي تصيب نبات الكاكي أثناء إكثاره باستخدام طرائق زراعة الأنسجة النباتية.

المراجع

المراجع الأجنبية

Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M., Maryam, R. M. and Iqbal, M., 2013. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 13(4): 539-547.

Ai, P. and Z. Luo., 2005. Cryopreservation of dormant vegetative buds and genetic stability analysis of regenerated plantlets in Persimmon. *Acta Hort*, 685: 85-92.

Amine Mazri, M. and R, Meziani., 2015. Micropropagation of Date Palm: a review. Cell Dev. Biol, 4: 160- 165.

Bander, L., W. Mohsen. and K. Almaarri., in press. Micropropagation of Japanese persimmon (Diospyros kaki Thun.) cv. 'Hachyia' by plant tissue culture.Damascus, *Univ. J. Agric. Sci.*

Baydar, N., 2006. Phenolic compositions of Grepevine shoot tips collected in different months and their effects on the explants browning. *Biol. Biol. Equip*, 5: 55- 64.

Board, N., 2010. Growing persimmons in China. *Tropical, Subtropical Fruits & Flowers Cultivation*, 7(11): 372- 373.

Chia, C., L. Clark., S. Hashimoto. and O. Evans., 1914. Persimmon. Hawaii institute of tropical agriculture and human resources University of Hawaii at Manoa, 89 (3): 968.

Dairi, M., W. assouad. and A. Maroff., 1991. Etude des differences entre les fruits A graines et les fruits parthenocarpiques de la varitete Hachiya du Plaqueminier (*Diospyros kaki* L.). Res. J. Aleppo. *Univ. Agric. Sci. Ser*, 16: 15- 38. Aleppo– Syria.

Fukui ,H., M. Sugiyama. and M. Nakamura., 1989. Shoot tip culture of Japanese Persimmon. *Soc. Hort. Sci*, 58(1): 43-47.

Fukui, H., K. Nishimoto, I. Murase. and M. Nakamura.. 1990. Annual changes in res ponsiveness of shoot tip cultures to cytokinin in Japanese Persimmon. *Hortic. J*, 59(2): 271- 274.

Fukui, H., K. Nishimoto. and M. Nakamura., 1992. Varietal differences in rooting ability of *in vitro* subcultured Japanese persimmon shoots. *Hortic. J.*, 60: 821- 825.

George, A. P., R. J. Nissen, A. Mowat. and R. J. Collins., 2003. Innovative production systems for non-astringent Persimmon. *ISHS Acta Horticulturae*, 13(4): 601.

Giordani, E., Garcés, A., Perria, R. and Bellini, E., 2002. Tissue culture of European accessions of persimmon: Callusing and proliferation. Options Méditerranéennes. Série A: Séminaires Méditerranéens (CIHEAM), pp. 93-97.

Ibrahim, I. A., A. A. Abo- El- Soaud, N. R. El- sherbeny. and E. I. Baker., 1999. Effect of nutrient media on the growth and development of Date palm grown *in vitro* and *ex- vitro*. Proceedings of the 1 st International conference on Plant tissue culture and Its' Application, 1999, Egypt: 209- 217. September: 12- 14. 1999.

Idris, T. I., M. El Fatih, M. M. Abdelghaffar. and E. Said., 2006. Enhanement of growth and control of browning of tissue culture of Guava (*Psidium Guajava* L.). *J. Sc. Tech.*, 7(1): 235- 243.

Jartoodeh, S. V., G. Davarynejad, A. Tehranifar, H. Kaveh. and H. Akbari Bisheh., 2013. Reducing browning problem in micropropagation of three pear cultivars; Sebri, Shekari and Natanz. *Curr. Opin. Agric*, 2(1): 25- 27.

Kochanová, Z., N. Onus. and J. Brindza., 2011. Adventitious shoot regeneration from dormant buds of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. Hachiya. *J. Agrobiol*, 28(2): 113-118.

Laukkanen, H., H. Haggman, S. Kontunen-Scoppia. and A. Hohtola., 1999. Tissue browning of *in vitro* culture of

Scot pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Pak. J. Bot*, 10(6): 337-343.

Murashige, T. and F. Skoog., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Annu. Rev. Plant Biol*, 15: 473- 497.

Niu, Y.L., Y. F. Zhang, Q. L. Zhang. and Z. R. Luo., 2010. A preliminary study on cryopreservation protocol applicable to all types of Diospyros kaki thumb. *Biol. Biol. Eq*, 10(24): 103- 113.

North, J. J., A. P. Ndakidemi. and C. P. Laubscher., 2010. The potential of developing an *in vitro* method for propagating Strelitziaceae. *Afr. J. Biotechnol*, 9(45): 7583-7588.

Pierik, R. L. M., 1986. *In vitro* culture of higher plants. Martinus. Nijhoff. Pub., Netherlands, p. 341.

Poudyal, B. K., G. Du, Y. Zhang, J. Liu. and Q. Shi., 2008. Studies on browning problem and phenols content on shoots of Yali, Aikansui and Abbe Fetel pears for *invitro* culture. *Front. Agric. China*, 2(3): 321-330.

Xiupu, Z., M. Kong. and X. Guo., 1999. Studies on the methods to prevent explant from browning in tissue culture of Diospyros kaki, J. *Henan Agric. Univ*, 21: 1205- 1207.

Yonemori, K., 1997. Persimmon industry and research activities in Japan. *Acta Hortic*, 43(6): 21- 32.

Yonemori, K., A. Sugiura. and M. Yamada., 2000. Persimmon genetics and breeding. *Afr. J. Agric. Sci., Plant Breeding Reviews*, 19: 191- 225.

Zhcn, M., 2013.*In vitro* conservation and cloning of SODs of Persimmons (Diospyros spp.) germ plasm resources in Fujian Province. *Agric. Sci. Res. Paper*, 4: 60- 64.

Ziv, M. and A. H. Halevy., 1983. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitziareginae*. *Hortic. Sci*, 18(4): 434- 436.

http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor.

Factors Affecting the Reduction of Browning in *in vitro* Grown Explants of Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) Cv. Hachyia

Lina bander[1], Wasim Mohsen[2], Khalil Almaarri[3] *

ABSTRACT

The major problem in mass micropropagation of Diospyros kaki cv. Hachyia is the high mortality rate, which occurs due to lethal browning. This study aims to investigate the factors that might reduce the browning of Diospyros kaki cv. Hachyia shoot tips and lateral buds. The experiments consisted of explants exposure to cold storage at 4ºC, soaking in polyvinyl pyrrolidone (PVP) solution, and reducing Nitrogen concentration in the media. The results revealed that the most effective treatment to reduce phenolic exudation was culture explants on (1/2N) MS and soaking lateral buds in PVP for 18h, where the survival rate reached 90%.

Keywords: Browning, Diospyros kaki cv. Hachyia, in vitro, shoot tips, lateral buds.

[1] MA. Student.
[2] General Commission for Scientific Agricultural Research, Center for Agricultural Scientific Research in Sweida, B. O. Box 461.
[3] Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Damascus, Syria.
Received on 26/10/2016 and Accepted for Publication on 20/4/2017.