

تأثير المعاملة بالشيتوزان في بعض الصفات الفيزيولوجية لأوراق الحامض
سانتا تيريزا *Limon Feminello Santa Teresa* ودورها في تخفيف الإصابة
بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات *Phyllocnistis citrella*

بتول احمد⁽¹⁾* وسوسن سليمان⁽¹⁾ ومحمد احمد⁽¹⁾

(1) . كلية الزراعة جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

(* للمراسلة: م. بتول احمد. ، البريد الإلكتروني: batoulandjanalma@gmail.com).

تاريخ الاستلام: 2023/02/3 تاريخ القبول: 2023/05/2

الملخص:

تمت دراسة تأثير رش أشجار الليمون الحامض سانتا تيريزا عمرها (4 سنوات) في محافظة طرطوس قرية بيت زينة بالشيتوزان تراكيز (200,300,400 ppm)، خلال 2021 و 2022 في نشاط أنزيم الكاتلاز، ومحتوى الأوراق من حمض الساليسليك، والكالسيوم، والقياسات الشكلية للورقة، وانعكاس ذلك على حياتية حشرة حافرة أنفاق الحمضيات من حيث طول العذراء، ومتوسط عدد البيض حقلياً. أظهرت النتائج أن المعاملة بالشيتوزان بالتركيزين (300 و 400 ppm) قد خفضت نشاط أنزيم الكاتلاز إلى $0.24-0.27 \text{ mmol.min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{FW}$ ، ومحتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني إلى ($1.230-2.516 \text{ nmol g}^{-1}\text{FW}$)، كذلك حسنت المعاملة بالشيتوزان تركيز 300ppm محتوى الأوراق من حمض الساليسليك إلى (20.505 $\mu\text{g/mg}$)، والمعاملة 400ppm محتواها من الكالسيوم 7.1% وزادت ثخانة الورقة 2.033 ملم، وخفضت مساحة السطح المتضرر إلى 15.69%، كذلك خفضت المعاملتان 300-400ppm طول العذراء 2.1 ملم مقارنة مع الشاهد 2.77 ملم، في حين خفضت المعاملة بالشيتوزان بالتركيز 200ppm متوسط عدد البيض حقلياً 7 بيضة مقارنة مع الشاهد 18 إلى بيضات، وزادت مساحة الورقة إلى 44.49 سم² مقارنة مع الشاهد 27.54 سم².

الكلمات المفتاحية: شيتوزان، ليمون سانتا تيريزا، أنزيمات مضادة للأكسدة، حمض الساليسليك، كالسيوم، صفات مورفولوجية للأوراق، حافرة أنفاق أوراق الحمضيات.

المقدمة:

تتنتمي الحمضيات (*Citrus*) إلى العائلة *Rutaceae*، والتي تتضمن البرتقال والحامض والجريب فروت... وتعتبر المنطقة الاستوائية وتحت الاستوائية الموطن الأصلي لها (Webber.,1967)، وتعد من الزراعات الهامة عالمياً، وتستهلك ثمارها ذات القيمة الغذائية العالية والنكهة المحببة إما طازجة أو كعصير، ويساهم عصيرها في الوقاية من الريبو المزمن وأمراض الشرايين التاجية وغيرها (Abd-Ghafar et al., 2010).

تصاب الحمضيات بالعديد من الآفات كذبابة الفاكهة والبق الاسترالي وحشرة حافرة أنفاق الأوراق *Phyllocnistis citrella* (*Lepidoptera: Gracillariida*)، وتسبب هذه الأخيرة أضراراً اقتصادية بالغة سواء في البساتين أو الحدائق المنزلية، ويحدث ضررها البالغ في المشاتل حيث تتغذى الحشرة على خلايا تحت البشرة مشكلة أنفاقاً متعرجة على سطح الورقة المصاب بالآفة في

طبقة الميزوفيل، التي تعتبر منطقة التمثيل الضوئي (Achor *et al.*, 1997; Beattie, 2004)، مما يؤدي إلى خلل في التطور الطبيعي للورقة (Garcia Marí *et al.*, 2002)، الذي ينعكس سلباً على كفاءة التمثيل الضوئي (Schaffer *et al.*, 1997).

يمر النبات بعدة مراحل عند تعرضه لهجوم بآفة ما، تنشط من خلالها آليات الدفاع الذاتي، وتعتبر مرحلة التحفيز أولى مراحل الدفاع وهي مرتبطة بتعرض النبات للممرض مما يؤدي لإطلاق العديد من الجزيئات البيوكيميائية التي تحفز بدء آليات الدفاع النباتية (Boller and Felix 2009)، وتبدأ المرحلة الثانية كنتيجة لنشاط مستقبلات المحفزات النباتية، والتي تنظمها جزيئات رسل كيميائية محددة، وتتضمن هذه الرسل عناصر كيميائية مثل الـ Ca^{++} أو جزيئات غير عضوية (مثل أكسيد النترينك)، أو جزيئات عضوية (نيكليوتيدات حلقيّة مثل cGMP) (Ma *et al.* 2009)، وتنظم (تخفض أو تحفز) عمل هذه الجزيئات المرسلية منظمات نمو نباتية محددة مثل السيتوكينينات أو الأوكسينات أو الإيثيلين أو البولي أمينات، وينشط هذا التفاعل والتكامل بين هذه الجزيئات المرسلية ومنظمات النمو مسارات جزيئية محددة تدخل في دفاعات النبات، ويعتبر مسار حمض الساليسيليك (SA)، وحمض الجاسمونيك (JA) من أهم هذه المسارات، ويرتبط عمل هذان المساران فغالباً عندما ينشط أحدهما يتشبث الآخر، ينشط مسار الـ SA في المقاومة المكتسبة (SAR)، ضد مسببات الأمراض الحيوية والحشرات التي لا تسبب أضراراً مميتة للعائل، في حين ينشط مسار الـ JA آليات الدفاع النباتية ضد الحشرات ومسببات الأمراض المميتة والجروح (Gen-Ichiro *et al.* 2011)، وتعتبر مضادات الأكسدة والجذور الحرة الشديدة التفاعلية (ROS) من أهم الآليات الدفاعية النباتية، ويتم إنتاج الـ ROS بشكل مستمر في النبات، بعضها شديد السمية، وتتدخل آليات أنزيمية وغير أنزيمية للتخلص منها. في ظل الظروف الطبيعية الخالية من الاجهادات يكون تشكل والتخلص من الـ ROS متوازناً، ولكن تحدث الاجهادات المختلفة خلافاً في هذا التوازن، مما يؤدي لزيادة تخليق الـ ROS، والتي تؤدي دوراً هاماً فهي جزيئات إشارة للتحكم في العمليات المختلفة (كدفاع النبات ضد مسببات الأمراض، وموت الخلايا المبرمج، وضبط سلوك الثغور)، يتم إنتاج الـ ROS في الكلوروبلاست، والميتوكوندريا، والبيروكسيزوم (- حيث يوجد تدفق الكتروني مكثف-)، أو خلال عمليتي التمثيل الضوئي والتنفس (Krieger, 2005).

تتعلق الـ ROS (O_2^- , H_2O_2 , OH^-)، عند هجوم الممرض كإشارات تعتبر جزء من المنظومة الدفاعية النباتية، وينتج عنها زيادة إنتاج اللجنين الذي يقوي الجدر الخلوية فيعيق تقدم الممرض، وتزيد بلمرة الجدر الخلوية مما يزيد مقاومتها الميكانيكية، وتحفيز المسار الذي يضمن الاستجابة شديدة الحساسية والمقاومة المكتسبة SAR (Mittler *et al.*, 2004; Davletava *et al.*, 2005).

لكن تكون هذه الجذور الحرة ذات أذية مدمرة للنبات عند اختلال التوازن، ومن أجل ذلك طور النبات آلية كنس تنظم التوازن بين إنتاج الـ ROS وتدميرها، لضمان كفاءة الاستقلاب تحت الظروف المثالية وتحت ظروف الاجهاد، وتعتبر الأنزيمات (الكاتالاز، البيروكسيداز، البولي فينول أوكسيداز، والـ SOD) من أهم هذه الآليات (Blokhina *et al.*, 2003; Bhattacharjee, 2005).

يعتبر الشيتوزان منظم للنمو وهو بوليمير حيوي غير سام يشقق بنزع أستيل الكيتين (Sabbour, 2019)، و يساعد على تقليل الآثار الضارة لمبيدات الآفات، حيث يعمل كدرع يحمي النبات من تأثير المبيدات السامة (Goodwin *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2019)، يمكن للشيتوزان إزالة الجذور الحرة مثل OH^- - O_2^- ، ويحمي الـ DNA (Harish *et al.*, 2007)، وقد تعزى هذه القدرة إلى بنية الشيتوزان، فهو يتميز بوجود أعداد كبيرة من مجموعات الهيدروكسيل ومجموعات أمينية متاحة للتفاعل مع الجذور الحرة ROS (Feng *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2001).

يستخرج الشيتوزان بسهولة من قشور الكائنات البحرية، وتحفز المعاملة به آليات الدفاع في النبات، إذ يؤدي إلى تشكيل حواجز ميكانيكية وكيميائية ضد الممرضات، ويتحسين هذه الآليات يسهم الشيتوزان في تحفيز نمو النبات (Bautista et al. 2003). تحسن المعاملة بالشيتوزان الصفات البيوكيميائية والفيزيولوجية للنباتات، فقد حسنت المعاملة به نمو نباتات البامياء وإنتاجيتها (Mondal et al., 2012)، واللوبياء (El-Tanahy et al., 2012). كما زادت المعاملة بالشيتوزان نمو إنتاجية نباتات القهوة، وازداد تراكم الكلوروفيل والكاروتينات في الأوراق، وربما يعزى تحسن النمو إلى زيادة امتصاص العناصر المعدنية (Dzung et al., 2011). وبشكل مشابه زادت المعاملة بالشيتوزان (10-50 ppm) حجم الكلوروبلاست في الأوراق الفتية لنبات الأوركيد (Limpanavech et al., 2008).

يعتبر حمض الساليسليك مركب فينولي ذو أهمية كبيرة، فهو يتدخل في دفاعات النبات، ويساعد في التعرف على المركبات الناتجة عن مسببات المرضية، وإنشاء المقاومة المكتسبة في المنطقة المصابة، ومنها في النبات بأكمله (Tsuda et al., 2008)، ويعتبر الكالسيوم (Ca^{+2}) أيون إشارة متعدد الوظائف، وهو يعد أساس شبكة متطورة من مسارات الإشارة، والتي يكون مصدرها التغيرات الحية وغير الحية التي تؤثر في تعبير الجينات وفيزيولوجيا النبات (Dodd et al., 2010).

أهمية البحث وأهدافه:

- 1- ضرورة التوجه لاستخدام مركب آمن للبيئة لتقليل آثار المبيدات الحشرية وأضرارها.
- 2- اختبار كفاءة مركب الشيتوزان في تحسين نمو نبات الحامض سانتا تيريزا وتخفيض أضرار إصابته بأفة حافرة أنفاق الحمضيات.

مواد البحث وطرقه:

نفذ البحث في قرية بيت زينة (صافيتا طرطوس)، خلال عامي 2021-2022، على غراس حمضيات (ليمون حامض سانتا تيريزا) بعمر 4 سنوات، تمت معاملة الأشجار برش المجموع الخضري بتركيز مختلفة من الشيتوزان التجاري، وذلك باستخدام مرش يدوي سعة 20 لتر. تم رش الأشجار أربع مرات يفصل بين الرشة والأخرى 15 يوماً، مع مراعاة الظروف الجوية السائدة، وإضافة Tween-20 بمعدل 2 mL/L، كمادة ناشرة لاصقة. صممت التجربة بطريقة العشوائية الكاملة، واستخدم لذلك 3 معاملات بثلاث مكررات، حيث اعتبرت كل شجرة مكرراً، وكانت المعاملات كما يلي:

الجدول (1): المعاملات والتركيز المستخدمة للشيتوزان على غراس حمضيات (ليمون حامض) خلال عامي 2021-2022

المعاملة	التركيز
شاهد معاملة بالماء فقط	T0
معاملة شيتوزان 200ppm	CH200
معاملة شيتوزان 300ppm	CH300
معاملة شيتوزان 400ppm	CH400

المؤشرات المدروسة:

1- المؤشرات البيوكيميائية للنبات:

تمت دراسة نشاط أنزيم الكاتالاز، ومحتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني، والكالسيوم، وحمض الساليسليك في مخبر فيزيولوجيا النبات كلية الزراعة جامعة تشرين.

2- المؤشرات المورفولوجية للنبات:

تم قياس سماكة الورقة، ومساحة الأوراق المصابة والنسبة المئوية لسطح الورقة المتضرر.

3- المؤشرات الأطوار البيولوجية للحشرة المدروسة:

تم قياس طول العذراء، ومتوسط عدد البيض على الورقة حقلًا.

1- تحضير المستخلص الأنزيمي لأنزيم الـ CAT:

بطريقة استخلاص البروتينات وفقاً لطريقة Murshed وآخرون (2008) مع بعض التعديلات. تم مزج 100 ملغ من أوراق بالهرس نبات الحامض سانتا تيريزا والمصابة حديثاً بالحشرة والمخزنة على درجة حرارة -20 سيلسيوس، بـ 1 مل من محلول منظم (pH 6) MES/KOH 50mM الذي يحتوي على كلور البوتاسيوم 40mM، وكلور الكالسيوم 2mM، والأسكوريات 1mM، ثم وضع الخليط في جهاز الطرد المركزي على 1500g لمدة 15 دقيقة، ودرجة حرارة 4 مئوية. تمثل الرشاحة الناتجة مجمل البروتينات أو المستخلص الذي سيجرى عليه قياسات نشاط أنزيم الكاتالاز.

تقدير نشاط أنزيم الكاتالاز (أنزيم مضاد للأوكسدة):

تم تقدير نشاط أنزيم الكاتالاز (CAT) ضمن خليط تفاعلي مكون من 50mmol منظم فوسفاتي (pH7.8) و 15mmol من H_2O_2 ، و 100 μ l من مستخلص العينة. لقد تم تحديد نشاط الأنزيم من خلال قياس انخفاض تركيز الـ H_2O_2 على طول موجة 240 نانومتر.

2- تقدير محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني:

تم تقدير محتوى الأوراق الطازجة من الماء الأوكسجيني باستخدام طريقة Murshed وآخرون (2013)، مع بعض التعديلات، فقد تم سحق 500mg من أوراق الليمون الحامض المصابة حديثاً بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات، بوجود 1ml من حمض ثلاثي كلور أسيتيك 0.1% TCA، ثم وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي على 10000g لمدة 15 دقيقة، وحرارة 4 سيلسيوس، ثم وضع 0.5ml من الرشاحة السائلة مع 0.5ml من محلول فوسفات البوتاسيوم المنظم 10mmol ذو pH7، و 1ml من محلول يوديد البوتاسيوم النظامي KI، وتم قياس الامتصاصية على طول موجة 390 نانومتر باستخدام جهاز السبيكتروميتر. تم تقدير تركيز الماء الأوكسجيني بالاعتماد على منحني قياسي لتراكيز مختلفة للماء الأوكسجيني.

3- تقدير محتوى الأوراق من حمض الساليليك:

تم تقدير محتوى أوراق الليمون الحامض (سانتا تيريزا) الخضراء والمصابة بالأفة حديثاً من حمض الساليليك باستخدام طريقة Warrier وآخرون (2013)، مع بعض التعديلات، حيث تم سحق 500mg، وبوجود 10ml ماء مقطر، ثم تم وضع المستخلص قبل الترشيح في أنابيب بلاستيك بدون إغلاق، وبعد ذلك تعامل الأنابيب بالأمواج فوق الصوتية لمدة ربع ساعة في جهاز ألتراسونيك وعلى درجة حرارة 15°C، ثم تم تنقيت العينات 5000rpm لمدة عشر دقائق، ثم تم أخذ 100 μ l من المستخلص، وأضيف إليه كلوريد الحديد 3ml (0.2%) المحضر حديثاً، ثم جرى قياس الامتصاصية بجهاز سبيكتروميتر عند طول موجة 540nm.

4- تقدير محتوى الأوراق من الكالسيوم:

باستخدام المعايرة بالفرنسينات (Ricards, 1954)

5- قياس سماكة الورقة:

تم قياس سماكة الورقة باستخدام جهاز البياكوليس وواحدته (mm).

6- تقدير السطح المتضرر ومساحة الورقة المصابة للورقة المصابة:

تم تصوير 10 أوراق من كل مكرر مصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات، وقد نهاية طور التعذر، كاملة بنية الورقة لا تظهر عليها أعراض إصابات حشرية أخرى، بهاتف محمول J4+، واستخدام برنامج Digimizer لتحليل ودراسة الصور.

7- طول العذراء:

تم أخذ 10 أوراق تحتوي على عذارى بالغة حية لم تخرج من حجرة التعذر من كل شجيرة، ثم تصوير العذراء باستخدام ميكروسكوب محمول 600x-4.3inch Lcd على ورق ميلي متري، وتم استخدام برنامج Digimizer، لحساب طول العذراء بدقة بحث ألا يقل عدد العذارى في كل مكرر عن 20 عذراء.

8- تحديد عدد البيض:

تم عد البيض الموجود على الأوراق حقلياً، وذلك بعد ظهور الإصابة على كافة الغراس المعاملة، فقد تم أخذ 8 أوراق عشوائياً من الجهات الأربعة حديثة النمو صغيرة غير مصابة مسبقاً من كل شجيرة، وفحصها باستخدام ميكروسكوب محمول 600x-4.3inch Lcd، وحساب متوسط عدد البيض الموجود على هذه الأوراق.

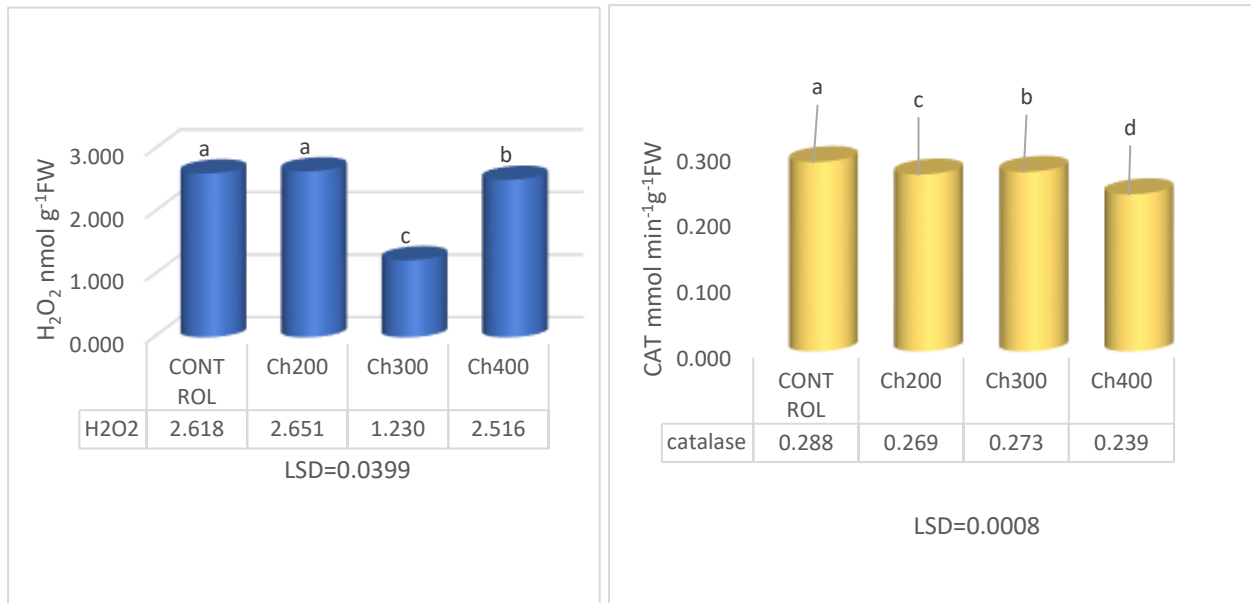
التحليل الإحصائي:

تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Gen Stat 15 مع اختبار الفروق بين المتوسطات بحساب أقل فرق معنوي LSD عند المستوى 0.05 للتجارب الحقلية و 0.01 للتجارب المخبرية (Duncan, 1955).

النتائج والمناقشة:

❖ تأثير المعاملة بالشيتوزان في نشاط أنزيم الكاتالاز ومحتوى الماء الأوكسجيني:

يبين الشكل (1) محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني، فقد خفضت معاملي الشيتوزان 300 و 400 ppm محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني إلى (1.230-2.516 nmol g⁻¹FW) على الترتيب معنوياً مقارنة مع الشاهد (2.618 nmol g⁻¹FW)، في حين لم يكن للمعاملة بالشيتوزان 200ppm تأثير معنوي في محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني (2.651 nmol g⁻¹FW). كذلك خفضت جميع معاملات الشيتوزان نشاط أنزيم الكاتالاز معنوياً مقارنة مع الشاهد، فقد خفضت المعاملات (200 و 300 و 400 ppm) نشاط الكاتالاز إلى (0.269 و 0.273 و 0.239 mmol min⁻¹g⁻¹FW) على التوالي مقارنة مع الشاهد (0.288 mmol min⁻¹g⁻¹FW)، (شكل 1).



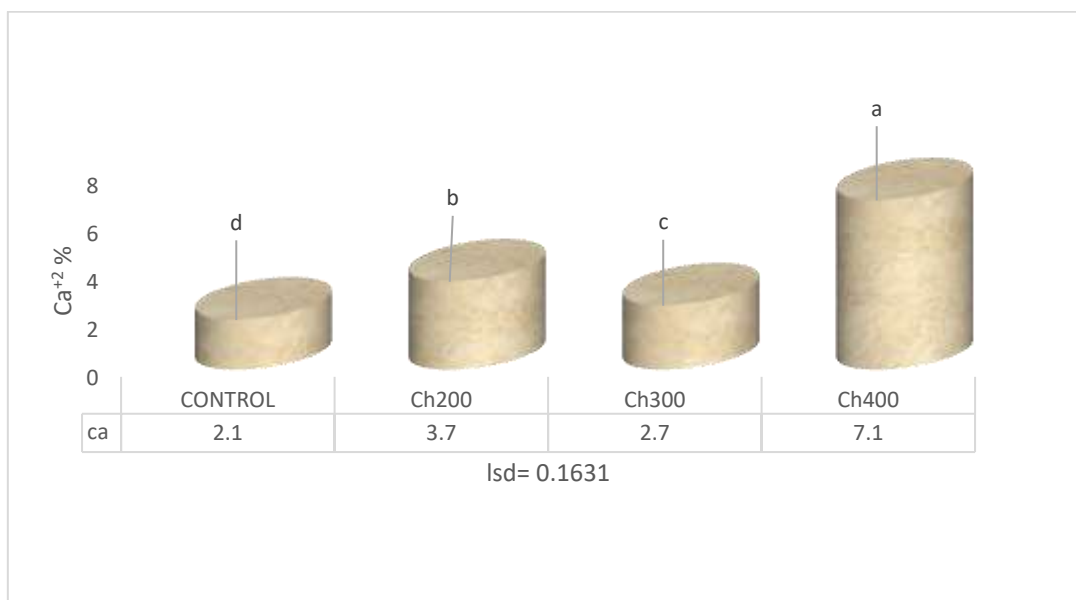
الشكل (1): تأثير المعاملة بالشيتوزان على نشاط أنزيم الكاتالاز ومحتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني في أوراق الليمون الحامض سانتا تيريزا المصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات

لقد انخفض محتوى أوراق الليمون الحامض سانتا تيريزا المصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات المعاملة بالشيتوزان من الماء الأوكسجيني وكذلك انخفض فيها نشاط أنزيم الكاتالاز في أوراق الليمون الحامض سانتا تيريزا المصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات،

فقد تكون المعاملة بالشيتوزان قد ساهمت في إزالة الجذور الحرة (H₂O₂)، مما أدى إلى تخفيض نشاط أنزيم الكاتالاز، وهذا يتوافق مع ما ذكر أنه يمكن للشيتوزان إزالة الجذور الحرة مثل OH⁻ و O²⁻ (Harish et al., 2007). زكرت دراسات سابقة عدم ثبات نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة، فهي مرتبطة بمجموعة عوامل مثل نوع النبات، وطبيعة الاجهاد، ونوع وتركيز المحفز، فقد وجد (Mandal, 2010)، أن المعاملة بالشيتوزان قد حسنت نشاط أنزيم الكاتالاز عند الباذنجان وكذلك عند البندورة (Ortega-Ortiz et al., 2007)، في حين أن معاملة العدس *Lens culinaris M.* بالشيتوزان لم تسبب أي تغيير في نشاط هذا الأنزيم (Bandeoglu et al., 2004)، وانخفض نشاط أنزيم الكاتالاز عند معاملة برتقال أبو صرة بالشيتوزان (Zeng et al., 2010).

❖ تأثير المعاملة بالشيتوزان في محتوى الأوراق من حمض الساليسليك:

يوضح الشكل (2) أن المعاملة بالشيتوزان (300ppm) قد زادت محتوى الأوراق من حمض الساليسليك معنوياً (20.505 µg/mg)، مقارنةً مع الشاهد (13.818 µg/mg)، في حين لم يكن للمعاملة (400ppm) تأثير معنوي في محتوى الأوراق من حمض الساليسليك (14.153 µg/mg)، وخفضت المعاملة (200ppm) محتوى الأوراق من حمض الساليسليك (12.301 µg/mg) معنوياً مقارنةً مع الشاهد.



الشكل (3) تأثير المعاملة بالشيتوزان على محتوى أوراق الليمون الحامض سانتا تيريزا المصابة بحشرة حافرة الأنفاق من الكالسيوم

وقد أوضحت أبحاث Sofy وآخرون (2020)، أن المعاملة بالشيتوزان قد زادت دفاع النبات ضد العدوى الفيروسية، وقد أشاروا إلى أن زيادة مقاومة النبات نتيجة المعاملة بالشيتوزان يمكن أن تعود إلى جينات تشفر بروتينات مرتبطة بالمرض مثل phenylalanine - 1,3-glucanase كذلك زيادة تعبير الجينات المشفرة لأنزيمات الفينيل البروبانويد مثل ammonia lyase (PAL)، الذي يساهم في تشكيل الفيتوألوكسين وغيرها من المركبات الفينولية، كما وجدوا أيضاً أنه تحت ظروف العدوى الفيروسية فإن المعاملة بالشيتوزان تزيد نشاط الكاتالاز وتفاعله مع الفيروس، مما يزيد استمرارية وجود H₂O₂ مما يؤدي في النهاية إلى زيادة تراكم حمض الساليسيليك الذي يمتلك القدرة على تحفيز المقاومة المكتسبة للنباتات ضد الفيروسات والفطريات والبكتيريا.

قد يكون للمعاملة بالشيتوزان تأثير مشابه عند الغزو الحشري للنباتات، وربما يزيد تركيز حمض الساليسيليك الذي يحفز المقاومة الجهازية المكتسبة وبذلك يزيد مقاومة الحشرة الغازية، والذي سيتضح من خلال طول العذراء وعدد البيض.

❖ تأثير المعاملة بالشيتوزان في محتوى الأوراق من الكالسيوم:

يبين الشكل (3) أن معاملات الشيتوزان (400 و 200 و 300 ppm) قد زادت محتوى الأوراق المصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات من الكالسيوم معنوياً (7.1 و 3.7 و 2.7%) على التوالي مقارنة مع الشاهد 2.1%.

يمكن تفسير ذلك بما ذكر في دراسات سابقة أنه يزداد تركيز الكالسيوم في الخلايا نتيجة تدفقه من الوسط الخارجي والحجرات تحت الخلوية، كذلك تزيد المحفزات تركيز الكالسيوم في السيتوبلازم، تتحدد هذه الزيادة بطبيعة المحفز. ويظن أن التغيرات المؤقتة للمحفز تجعل الأيون قادراً على تشفير معلومات، تحدد مقدار وطبيعة الاستجابة (Dodd et al., 2010).

بعد التعرف على جزيئة الشيتوزان بواسطة مستقبلات خلوية نباتية معينة، تقوم بعض الرسل الثانوية بنقل الإشارة لتحفيز استجابات فيزيولوجية في النبات، وقد وضح العديد من الباحثين دور الـ ROS، وأيون الـ Ca²⁺، وأكسيد النترت، والهرمونات النباتية في مسار الإشارات المحفزة بواسطة الشيتوزان، وقد وجد أن المعاملة بالشيتوزان تحفز تصنيع الكالوس في منطقة الجروح بواسطة الـ Ca²⁺ (Zuppini et al., 2003)، وقد بينت دراسة (Jang et al., 2012) أن المعاملة بالشيتوزان 10 ppm قد زادت امتصاص الكالسيوم في الأوراق مقارنة بالشاهد، وفي نفس الوقت خفضت الإصابة بالعفن الطري عند نباتات الملفوف الصيني.

❖ تأثير المعاملة بالشيتوزان في الصفات التشريحية لأوراق الليمون الحامض سانتا تيريزا المصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات:

الجدول (2) تأثير المعاملة بالشيتوزان في بعض الصفات التشريحية لأوراق الليمون الحامض سانتا تيريزا المصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات

المعاملات	النسبة المئوية للسطح المتضرر %	مساحة الورقة cm^2	ثخانة الورقة mm
Control	40.08 ^a	27.54 ^d	0.710 ^c
Ch200	33.68 ^b	44.49 ^a	0.830 ^b
Ch300	22.78 ^c	35.28 ^c	0.837 ^b
Ch400	15.69 ^d	37.50 ^b	2.033 ^a
Lsd	0.219	0.416	0.0557

نلاحظ من الجدول (2) أن المعاملة بالشيتوزان قد خفضت مساحة السطح المتضرر معنوياً مقارنةً مع الشاهد، فقد بلغت مساحة السطح المتضرر عند المعاملة بالشيتوزان (200 و 300 و 400 ppm) على التوالي (33.68 و 22.78 و 15.69%) مقارنة مع الشاهد 40.08%.

وقد حسنت المعاملة بالشيتوزان صفات الورقة، فبالرغم من أن جميع الأوراق مصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات، فقد زادت المعاملة بالشيتوزان (200 و 300 و 400 ppm) مساحة الورقة المصابة (44.49 و 35.28 و 37.50 cm^2) على التوالي، معنوياً مقارنة مع الشاهد 27.54 cm^2 .

كذلك يوضح الجدول (2) أن المعاملتين بالشيتوزان (400 و 300 ppm) قد حسنت سماكة الورقة معنوياً فكانت 2.033 و 0.837 mm على التوالي مقارنة مع الشاهد 0.710 mm لكن خفضت المعاملة 200 ppm ثخانة الورقة، (0.247 mm).

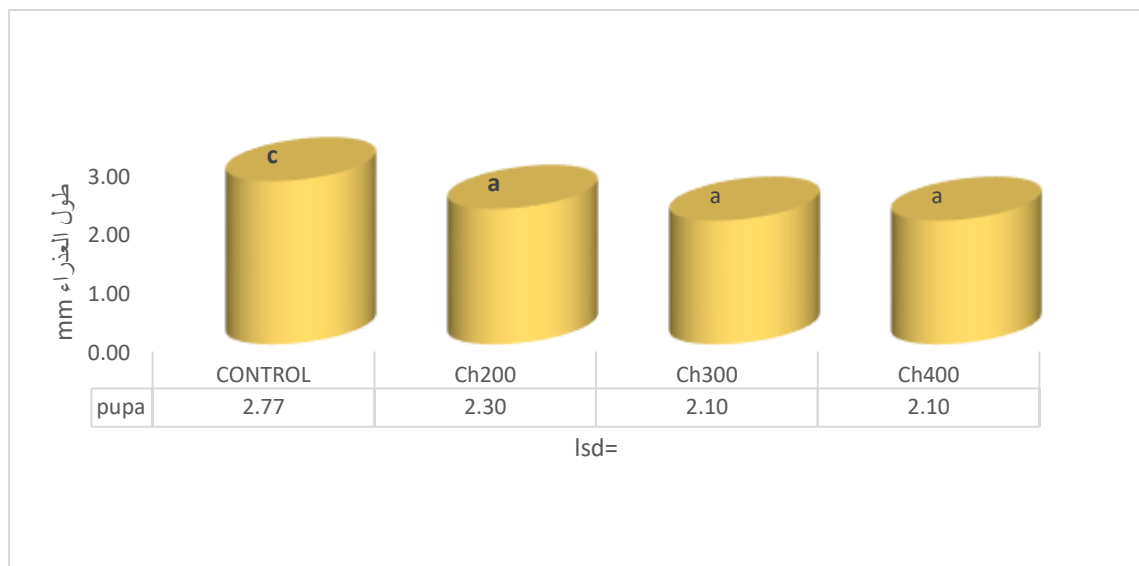
يوضح الجدول (2) أن المعاملة بالشيتوزان قد حسنت نمو وتطور أوراق الليمون الحامض المصابة بحشرة حافرة أنفاق الحمضيات، حيث انخفضت النسبة المئوية للمساحة المتضررة من الأوراق، وازدادت المساحة غير المتضررة، مما يزيد من المساحة الممثلة ضوئياً التي تنعكس على نمو الأوراق وبالتالي نمو الغراس بشكل عام، تتوافق هذه النتائج مع (El-Miniawyet *et al.*, 2013) الذين وجدوا أن المعاملة بالشيتوزان قد حسنت مؤشرات النمو الخضري للفراولة، وكذلك يتوافق مع (Chookhongkha *et al.*, 2012) على الفليفلة.

ويفسر هذه النتيجة أنه يعتبر الشيتوزان جزيء حيوي ذو خصائص هامة في زيادة نمو وتطور النبات (Khan *et al.*, 2002)، ويمكن أن تعزى تأثيرات الشيتوزان في نمو النبات لزيادة امتصاص الماء والعناصر المغذية من خلال تعديل الضغط الأسموزي، وتقليل تراكم الجذور الحرة الضارة بزيادة نشاط مضادات الأكسدة والأنزيمات المختلفة (Guan *et al.*, 2009)، أو قد تعزى لزيادة نشاط أنزيمات تمثيل النتروجين مثل (nitrate reductase, glutamine synthetase and protease)، وتحسين نقل النتروجين في الأوراق الفعالة وظيفياً وتحسين التمثيل الضوئي الذي ينعكس إجمالاً على نمو وتطور النبات (Mondal *et al.*, 2012).

وقد أشارت نتائج هذه الدراسة إلى تحسين المعاملة بالشيتوزان لمحتوى الأوراق من الكالسيوم الشكل (3)، يتواجد الكالسيوم في الصفيحة الوسطى للجدار الخلوي حيث يرتبط إلى المجموعات الكربوكسيل للبولي جالاكتورينات (Demarty *et al.*, 1984). مما يزيد من صلابة الغشاء الخلوي وثخانة الورقة، وقد ينعكس ذلك بالتأكيد على نشاط يرقة حافرة الأنفاق حيث أنها قد تجد صعوبة في قرض الخلايا مما يؤدي إلى تخفيض المساحة المصابة.

تأثير المعاملة بالشيتوزان في طول عذراء حافرة أنفاق الأوراق:

باعتبار أن طول العذراء يعتبر مؤشراً لتغذية الحشرة ونموها، يوضح الشكل (4) أن المعاملة بالشيتوزان (200 و300 و400ppm) قد خفضت طول العذراء (2.3 و2.10 و2.10mm)، معنوياً مقارنة مع الشاهد (2.77mm)، ولم يكن هناك فروقاً معنوية بين أطوال العذراء عند تراكيز الشيتوزان المستخدمة.



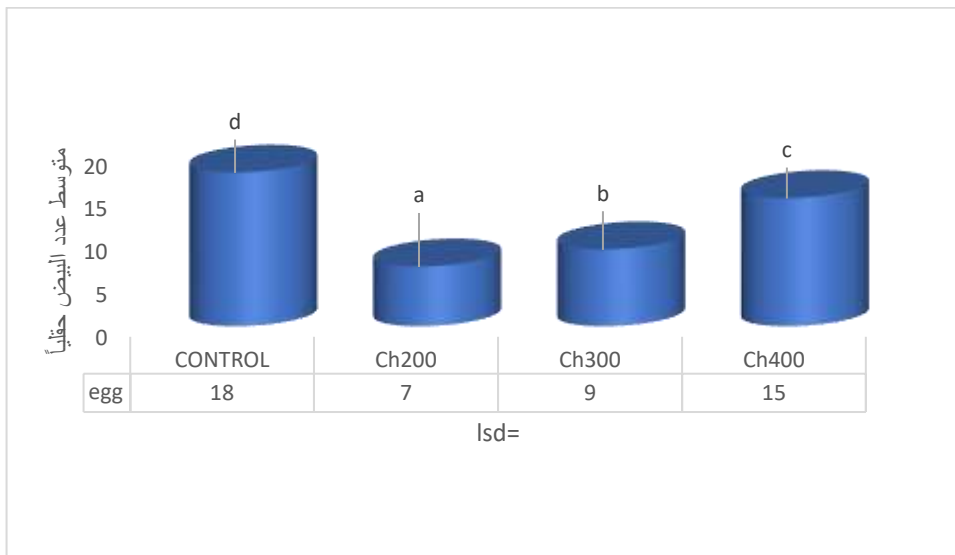
الشكل (4): تأثير المعاملة بالشيتوزان على طول عذراء حشرة حافرة أنفاق الحمضيات.

يمكن تفسير هذه النتيجة بما ذكرته دراسات سابقة بأنه تساهم المعاملة بالشيتوزان بتخفيض استهلاك الغذاء، إذ أدت إلى أذية غشاء جهاز الهضم لحشرة *Helicoverpa armigera* مما يخفض تغذية ونمو الحشرة (Binod et al., 2007)، كذلك خفضت المعاملة بأحد مشتقات الشيتوزان بعد ثلاثة أيام معدل الاستهلاك الغذائي، ومعامل الاستهلاك الغذائي، والنمو لدى حشرة *Spodoptera frugiperda* (Moorthy et al., 2021).

لقد بينت نتائج هذه الدراسة زيادة محتوى الأوراق من حمض الساليسيليك والكالسيوم، كذلك حسنت الصفات التشريحية للأوراق المصابة (زيادة ثخانة ومساحة الورقة المصابة)، كما انخفضت مساحة الجزء المصاب من الورقة (شكل 2 و3 والجدول 1)، مما يشير إلى فعالية المعاملة بالشيتوزان في تخفيض أضرار حشرة حافرة الأنفاق.

❖ تأثير المعاملة بالشيتوزان في متوسط عدد البيض:

بينت النتائج أن رش الأوراق بالشيتوزان (200 و300 و400ppm)، قد خفضت متوسط عدد البيض حقلياً (7-9-15 بيضة) على التوالي، معنوياً مقارنة مع الشاهد (18 بيضة)، شكل (5).



الشكل (5): تأثير المعاملة بالشيتوزان على متوسط عدد بيض حافرة الأوراق على أوراق الليمون الحامض ساننا تيريزا

يمكن تفسير هذه النتيجة أنه قد أشارت نتائج هذه الدراسة في الفقرة السابقة إلى انخفاض طول العذراء، مما يدل على انخفاض تغذيتها، فالمعاملة بالشيتوزان تعطي حشرات ضعيفة ذات خصوبة منخفضة مقارنة مع مثيلاتها في الشاهد (شكل 4). لقد أوضحت أبحاث Al-khazraji و Shaher (2020) أن المعاملة بالشيتوزان قد أثرت في حياة وخصوبة حشرة دودة شمع العسل *Galleria mellonella L*، فقد أثرت في عملية الهضم، وخفضت كفاءة الاستقلاب عند الحشرة، مما أدى إلى تخفيض معدل النمو بشكل عام، وتعطي عذارى صغيرة الحجم، قليلة المخزون الغذائي، ويرتبط هذان المؤشران مباشرة بخصوبة الحشرة البالغة وطول حياتها.

الاستنتاجات والتوصيات:

- 1- ينصح باستخدام الشيتوزان ضمن التراكيز المثلى المدروسة لمكافحة حشرة حافرة أنفاق أوراق الحمضيات وإدراجه ضمن برنامج الإدارة المتكاملة للآفة المدروسة.
- 2- يمكن إدخال الشيتوزان كمركب عضوي يستخدم رشاً على أوراق الحمضيات ضمن التراكيز المثلى وذلك لرفع مقاومة النبات ضد الآفة المروسة بسبب تحسين صفات النبات التشريحية.

المراجع:

- Abd-Ghafar, M. F., K. N. Prasad, K. K. Weng and A. Ismail (2010). Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *Afr. J. Biotechnol.* 9(3):326-330.
- Achor, D.S., H. Browning and L.G. Albrigo (1997). Anatomical and histochemical effects of feeding by Citrus leafminer larvae (*Phyllocnistiscitrella* Stainton) in Citrus leaves. *J.Am. Soc. Hort. Sci.*, 122: 829–836.
- AL-Khazraji, H.I. and K. W.Shaher, (2020). The effect of Chitosan on the greater wax worm *Galleria mellonella* L. *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*.
- Bandeoglu E. ,F. Eyidogan, M. Yucel and H. A.Oktem. (2004). 'Antioxidant response of shoots and roots of lentil to NaCl Salinity stress. *Plant Growth Regul*, 42 (1): 69-77.
- Bautista, B. S., Hernandez, L. M., Bosquez, M. E., & Wilson, C. L. (2003). Effects of Chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22, 1087–1092.
- Beattie, A. (2004). Citrus leafminer, 4th edn. NSW Department of Primary Industries, University of Western Sydney, Sydney.
- Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 1113-1121.
- Binod, P., R.K.Sukumaran, , S.V. Shirke, , J.C. Rajput, and A. Pandey, , 2007. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *Journal of applied microbiology*, 103(5),pp.1845-1852.
- Blokhina, O., E.Virolainen, , & K. V. Fagerstedt, (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.
- Boller T, GA Felix (2009) Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern- recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379–406.
- Chen, Z.; Z.Zheng,; J. Huang,; Z. Lai,; B. Fan, (2009) Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav*, 4, 493–496. [CrossRef] [PubMed]
- Chookhongkha, N., S. Miyagawa, Y.Jirakiattikul, , S. Photchanachai, ,(2012). Chiligrwth and seed productivity as affected by Chitosan. *International Conference on Agriculture Technology and Food Sciences (ICATFS'2012)* Nov. 17–18,146–149.
- Demarty, M., C. Morvan, and M. Thellier. 1984. Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ.* 7:441-448.
- Dodd, Antony N., Jörg Kudla, and Dale Sanders. "The language of calcium signaling." *Annual review of plant biology* 61 (2010): 593-620.
- DUNCAN B, D, Multiple range and multiple F-test Biometricalf. Vol:11, 1955,1- 42.
- Dzung,N.A. V.T.P. Khanh, and T.T. Dzung, “Research on impact of Chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee,” *Carbohydr. Polymers*, vol. 84, pp. 751–755, 2011.
- El-Miniawy, S., Ragab, M., Youssef, S., Metwally, A., 2013. Response of strawberry plants to foliar spraying of Chitosan. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 9, 366–372.
- El-Tanahy AMM, Mahmoud AR, Abde-mouty MM, and Ali AH (2012) Effect of Chitosan doses and nitrogen sources on the growth , yield and seed quality of cowpea. *Aus J Basic & Appl Sci.* 6(4):115-121.
- Garcia Mari, F., C. Granda, S. Zaragoza and M. Agusti (2002).Impact of Citrus leafminer (*Lepidoptera*, *Gracillariidae*) on leaf area development and yield of mature Citrus trees in the Mediterranean area. *J. Econ. Entomol.*, 95: 966-974.
- Gen-Ichiro A, Ozawa R, Massimo EM (2011) Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. *Int J Mol Sci* 12:3723–3739.

- Goodwin, B.; T. Babb; S. Kaffka and L. Godfrey (2007). Biorational management of beet armyworms in sugar beets in the Central Valley, Larry Godfrey and Tom Babb. UC DAVIS, University of California. <http://sugarbeet.Ucdavis.edu>.
- Guan, Y.-J., Hu, J., Wang, X.-J., Shao, C.-X., 2009. Seed priming with Chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10, 427–433.
- Harish Prashanth KV, Dharmesh SM, Jagannatha Rao KS and Tharanathan RN, Free radical-induced Chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. *Carbohydr Res* 342:190–195 (2007).
- Jang, E. J., Gu, E. H., Hwang, B. H., Lee, C., & Kim, J. K. (2012). Chitosan stimulates calcium uptake and enhances the capability of Chinese cabbage plant to resist soft rot disease caused by *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. *Horticultural Science & Technology*, 30(2), 137-143.
- Khan, W.M., Prithiviraj, B., Smith, D.L., 2002. Effect of foliar application of chitin and Chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica* 40, 621–624.
- Krieger-Liszka, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of experimental botany*, 56(411), 337-346.
- Limpanavech, P. S. Chaiyasuta, R. Vongpromek, R. Pichyangkura, C. Khunwasi, S. Chadchawan, P. Lotrakul, R. Bunjongrat, A. Chaidee and T. Bangyeekhun, "Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid," *Sci. Hort.*, vol. 116, pp. 65–72, 2008.
- Ma W, Qi Z, Smigel A et al (2009) Ca²⁺, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20995–21000.
- Mandal, S. 2010. 'Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors'. *African Journal of biotechnology*, 9:8038-8047.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Mondal MMA, Malek MA, Puteh AB, Ismail MR, Ashrafuzzaman M, Naher L (2012) Effect of foliar application of Chitosan on growth and yield in okra. *Aust J Crop Sci.* 6(5):918.
- Moorthy, A. V., Shanthi, M., Chinniah, C., and Senthil, K. 2021. Effect of N alkyl Chitosan on consumption and utilization of food by maize fall armyworm (FAW), *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).
- Murshed R, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle, *Anal. Biochem.* 383 (2008) 320–322.
- Murshed R., F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum Lycopersicon* L, cv Micro-tom), *Physiol. Mol. Biol. Plants* (2013).
- Ortega-Ortiz H, A. Benavides-Mendoza, R. Mendoza-Villarreal, H. Ramírez Rodríguez and K.D.A. Romenus KDA .2007. 'Enzymatic activity in tomato fruits as a response to chemical elicitors'. *J. Mex. Chem. Soc.* 51: 141-144.
- Ricards, L.A. Diagnosis and improvement of saline and alkaline soils. *USDA Agric Handbook* 60, 1954, Washington DC.
- Sabbour, M. M., and Nayera Y. Soleiman. "Control of beet fly (*Pegomya hyoscyami*) (Diptera: Anthomyiidae) using Chitosan and nano Chitosan." *Plant Archives* 19. Suppl 2 (2019): 462-465.
- Schaffer, B., J.E. Peña, A.M. Colls and A. Hunsberger (1997). Citrus leafminer (Lepidoptera: Gracillariidae) in lime: Assessment of leaf damage and effects on photosynthesis. *Crop Prot.*, 16: 337–343.

- Sharma, A.; V. Kumar ; B. Shahzad ; M. Tanveer; G. P. S. Sidhu; N. Handa; S. K. Kohli; P. Yadav ; A. S. Bali and R. D. Parihar (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.*, 1, 1446.
- Sofy, A. R., Dawoud, R. A., Sofy, M. R., Mohamed, H. I., Hmed, A. A., & El-Dougdoug, N. K. (2020). Improving regulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants and stress-related gene stimulation in Cucumber mosaic cucumovirus-infected cucumber plants treated with glycine betaine, Chitosan and combination. *Molecules*, 25(10), 2341.
- Tsuda K, Sato M, Glazebrook J, Cohen JD, Katagiri F. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J* 2008; 53:763-75.
- Warrier R. R., M. Paul, M. V. Vineetha, 2013. Estimation of salicylic acid in Eucalyptus leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and Plant Physiology*, 3(1-2): 90-97.
- Webber HJ. History and development of citrus industry. pp 1-39. In: Reuther W, Webber H J and Baxter E D (eds.) *The citrus industry*. Vol 1 Univ. of California, Riverside, California, 1967.
- Zeng, K., Deng, Y., Ming, J., & Deng, L. (2010). Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by Chitosan. *Scientia horticulturae*, 126(2), 223-228.
- Zuppini, A.; Baldan, B.; Millionsi, R.; Favaron, F.; Navazio, L.; Mariani, P. Chitosan induces Ca²⁺-mediated programmed cell death in soybean cells. *New Phytol.* 2003, 161, 557-568.

Effect of foliar application of Chitosan on biochemical changes of Santa Teresa lime (*Limon Feminello*) leaves and its relation with Citrus Leaf Miner (*Phyllocnistis citrella*) damages.

Batoul Ahmad^{(1)*}, Sawsan suleiman⁽¹⁾ and Mohammed Ahmad⁽¹⁾

(1). Faculty of Agriculture Tishreen University, Lattakia, Syria

(*Corresponding author: Batoul Ahmad, Email: batoulandjanalma@gmail.com)

Received: 3/02/2023

Accepted: 2/05/2023

Abstract:

The effect of foliar application of (4 years) lemon trees Santa Teresa in Tartous suburb, Beit Zeina village with Chitosan (200-300-400 ppm) on catalase antioxidant activity, Leaves content of salicylic acid, calcium, and leaf morphometric characteristics and their influence on citrus leaf miner *Phyllocnistis citrella* biology: Pupa's length and eggs number, under the conditions of field were investigated. The results showed that treatments with Chitosan (300-400) reduced the catalase activity 0.273-0.239 mmol min⁻¹ g⁻¹ FW and the content of H₂O₂ in leaves 1.230 -2.516 nmol g⁻¹ FW. Chitosan 300 increased the content of salicylic acid in leaves to (20.505 µg/mg), Chitosan 400 enhanced leaf calcium content by 7.1% and leaf thickness 2.033 mm, and reduced damaged leaf area by up to 15.69%, both treatments reduced pupa's length 2.1 mm comparing to control 2.77mm. Chitosan 200 reduced eggs' number to 7 eggs compared to control 18 eggs and increased leaf area to about 44.49 cm².

Keywords: Chitosan , Lemon Santa Teresa, Antioxidant enzyme, Salicylic acid, Calcium, morphometric characteristics of leaves, Citrus leaf miner.