الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم وقاية النبات

تأثير مستخلص نبات الصبغة الأمريكية *phytolacca Americana* على الجهاز المناعي لنحل العسل وتحديد دوره في حمايته من بعض الآفات

رسالة مقدمة لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية ـ قسم وقاية النبات

إعداد

م. مي عمر شرف

إشراف

د. نورس الأبرص
باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية
(مشرفا مشاركاً)

أ.د. أحمد محمد مهنا
أستاذ في قسم وقاية ـكلية الهندسة الزراعية
جامعة دمشق
(مشرفاً)

دمشق 2024

القبول

عنوان الرسالة: تأثير مستخلص نبات الصبغة الأمريكية *phytolacca Americana* على الجهاز المناعي لنحل العسل وتحديد دوره في حمايته من بعض الآفات

الدرجة العلمية: ماجستير في الهندسة الزراعية / وقاية النبات

اسم المرشح: مي عمر شرف

نُوقشت هذه الرسالة في الجلسة العلنية في تمام الساعة العاشرة من يوم الأثنين الواقع في 23 \ 12 \ 2024 أمام لجنة الحكم المؤلفة من السادة:

أ.د. هشام الرز .....

الأستاذ في قسم وقاية النبات – كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق – الاختصاص: حشرات اقتصادية – دودة الحرير

(عضواً)

أ.د. أحمد محمد مهنا .....

الأستاذ في قسم وقاية النبات – كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق – الاختصاص: التقانات الحيوية ورسم الخرائط الوراثية في أمراض النبات

(عضواً مشرفاً)

د. وفاء يعقوب .....

المدرس في قسم وقاية النبات – كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق – الاختصاص: تحسين وراثي للنحل

(عضواً)

تصريح

أصرح بأن هذا العمل المُقدم في هذه الرسالة تحت عنوان:

تأثير مستخلص نبات الصبغة الأمريكية phytolacca Americana على الجهاز المناعي لنحل العسل وتحديد دوره في حمايته من بعض الآفات

لم يسبق أن قُبل للحصول على الشهادة، ولا هو مُقدّم حالياً للحصول على شهادة آخرى.

المُرشّح

مي عمر شرف

.....

DECLERATION

I hereby declared that, this work:

Effect of Phytolacca Americana extract on the honey bww Immune system and determination of its protected role against of some pest

Has not been used previously or submitted now for any other degree.

Candidate

Mai Omar Sharaf

.....

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة:

تأثير مستخلص نبات الصبغة الأمريكية phytolacca Americana على الجهاز المناعي لنحل العسل وتحديد دوره في حمايته من بعض الآفات

هو نتيجة بحث علمي قام به المرشحة مي عمر شرف بإشراف الأستاذ الدكتور أحمد محمد مهنا الأستاذ في قسم وقاية النبات – كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق، والدكتور نورس الأبرص الباحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق، وأن أي مرجع ورد في هذا العمل موثّق في نص الرسالة.

المُرشح	المشرف	المشرف المشارك
م. مي عمر شرف	**أ.د. أحمد محمد مهنا**	**د. نورس الأبرص**
.....	.....	.....

We witness that the described work in this thesis:

Effect of Phytolacca Americana extract on the honey Immune system and determination of its protected role against of some pest

Is the result os scientific research conducted by the candidate Mai Omar Sharaf, under supervision of Prof. Dr. Ahmad Mohammad Mouhanna at the department of Protection Plant, Faculty of Agricultural engineering – Damascus University, and Dr. Nawras Al-Abrass, Researcher at National Commission for Biotechnology (NCBT). Any other references have been mentioned in this work are documented in the text of the thesis.

شكر وامتنان

شكري وامتناني كبيرين لكل من أسهم في تحقيق رسالتي الأولى في الحياة في أن أكون باحثة مواظبة على تقديم الجديد في ما يفيد بلدي وأهلي ومجتمعي.

وأخص بالشكر كليتي الحبيبة التي أفتخر بتخرجي منها ومتابعة تحصيلي العالي فيها، كما أتقدّم بالشكر الجزيل لقسم وقاية النبات والهيئة العامة للتقانة الحيوية على تهيئة كافة الظروف المناسبة لإنجاز عملي. ولايسعني أن أنسى المجهود الكبير لأستاذي المشرف الأستاذ الدكتور أحمد مهنا والمشرف المشارك الدكتور نورس الأبرص الذي قدّماه لي ليكون هذا البحث بالمستوى اللائق.

والشكر موصول إلى الأستاذ الدكتور غسان إبراهيم، والأستاذ الدكتور زكريا الناصر، والدكتور أوس حسن والمهندسة بثينة سلامة ,والاستاذ نزار إدلبي، وكل من قدم لي يد العون لإتمام هذا العمل العلمي.

وأخيراً فالشكر لله تعالى الذي منحني القوة والعزيمة مع أسرتي الغالية، أمي وإخوتي الأعزاء وأصدقائي الذين لهم الفضل في أن أتجاوز كل صعاب الحياة وأصل إلى هدفي، وأهدي هذا العمل إلى روح والدي الغالي المرحوم الدكتور عمر شرف الذي كنت أتمنى أن يرى هذا العمل ويفتخر به.

والله الموفق

المهندسة الزراعية

مي شرف

فهرس المحتويات

الموضوع	الصفحة
الملخص	1
المقدمة	3
أهمية البحث	6
مشكلة البحث	6
تساؤلات البحث	6
فرضيات البحث	7
مسلمات البحث	7
أهداف البحث	7
مبررات البحث	7
محددات البحث	8
1- الفصل الأول	9
1- 1- الدراسة المرجعية	9
1- 1- 1- نبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L.	9
1- 1- 1- 1- الوصف النباتي Botanical descripsion	9
1- 1- 1- 2- الموطن والانتشار والتكاثر	10
1- 1- 1- 3- المكافحة	11
1- 1- 1- 4- التركيب الكيميائي	11
1- 1- 1- 5- تأثيره على الإنسان	11
1- 1- 1- 6- تأثيره على الحيوان	12
1- 1- 1- 7- تأثيره على الحشرات	13
1- 1- 1- 8- الخصائص الميكروبيولوجية	14
1- 1- 1- 8- 1- مضاد فيروسي	14
1- 1- 1- 8- 2- مضاد بكتيري	15
1- 1- 1- 8- 3- مضاد فطري	15
1- 1- 1- 8- 4- مضاد أكسدة	16
1- 1- 1- 8- 5- مضاد سرطان	16

1- 1- 2- نحل العسل الغربي *Apis mellifera* 16
1- 1- 3- المستخلصات النباتية 19
1- 1- 4- الفاروا 21
1- 1- 5- فيروس الجناح المشوه (DWV) *Deformed wing virus* 22
2- الفصل الثاني 26
2- 1- مواد وطرائق العمل 26
2- 1- 1- التجهيزات المخبرية والمواد 26
2- 1- 2- المواد الكيميائية 26
2- 1- 3- البادئات 27
2- 2- طرائق البحث 27
2- 2- 1- جمع العينات النباتية 27
2- 2- 2- تحضير المستخلص المائي 27
2- 2- 3- الكشف عن بعض المركبات الكيميائية 28
2- 2- 3- 1- الفينولات 28
2- 2- 3- 2- التانينات 29
2- 2- 3- 3- السابونينات 29
2- 2- 4- جمع عينات نحل العسل 30
2- 2- 5- تأثير المستخلصات في طول فترة حياة شغالة نحل العسل 30
2- 2- 6- تأثير مستخلص نبات الصبغة على طفيل الفاروا 31
2- 2- 7- دور مستخلص نبات الصبغة في تحريض الجهاز المناعي لنحل العسل 32
2- 2- 7- 1- اختبار العينات للحصول على عينة نقية مصابة بفيروس DWV فقط 32
2- 2- 7- 2- اختبار RT-PCR 32
2- 2- 7- 2- 1- استخلاص الحمض النووي الفيروسي RNA من نحل العسل 32
2- 2- 7- 2- 2- النسخ العكسي وإنتاج الحمض النووي التكميلي cDNA 33
2-2- 7- 2- 3- تفاعل البلمرة التسلسلي PCR 34
2-2- 7- 2- 4- تحضير هلامة الآغاروز 35
2-2- 7- 3- تحضير المعلق الفيروسي 36

2- 2- 7- 4- تحفيز الببتيدات المضادة للميكروبات 36
2- 2- 7- 4- 1- جمع السائل اللمفاوي لشغالات نحل العسل: 36
2- 2- 7- 4- 2- الكشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات ضمن السائل اللمفاوي لشغالات نحل العسل 37
2- 2- 7- 4- 3- تحضير هلامة البولي أكرلامايد 37
2- 2- 7- 4- 3- 1- المحاليل المستخدمة 37
2- 2- 7- 4- 3- 2- هلامة الفصل 12% Separation gel 38
2- 2- 7- 4- 3- 3- هلامة التجميع 4% Stacking gel 38
2- 2- 7- 4- 3- 4- عملية الفصل بالرحلان الكهربائي 38
2- 2- 7- 4- 3- 5- حقن العينات 39
2- 2- 7- 4- 3- 6- تثبيت وصبغ الهلامة والتصوير 39
2- 3- التحليل الإحصائي 39
3- الفصل الثالث 40
3- 1- النتائج 40
3- 1- 1- الكشف عن بعض المركبات الكيميائية 40
3- 1- 1- 1- الفينولات 40
3- 1- 1- 2- التانينات 40
3- 1- 1- 3- السابونينات 41
3- 1- 2- تأثير المستخلصات على طول فترة حياة شغالة نحل العسل 41
3- 1- 2- 1- تأثير طريقة استخدام مستخلص نبات الصبغة الأميركية (الرش والتغذية) في طول فترة حياة شغالة نحل العسل 43
3- 1- 2- 2- تأثير مستخلص الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأميركية في حياة شغالة نحل العسل 44
3- 1- 3- تأثير مستخلص نبات الصبغة على طفيل الفاروا 45
3- 1- 4- تأثير مستخلص نبات الصبغة في تحريض الجهاز المناعي لنحل العسل 48
3- 1- 4- 1- اختبار العينات للحصول على عينة نقية مصابة بفيروس DWV فقط 48
3- 1- 4- 2- تأثير مستخلص نبات الصبغة الأميركية مع معلق فيروسي في طول 49

فترة حياة شغالة نحل العسل
3- 1- 4- 3- تحفيز الببتيدات المضادة للميكروبات 50
3- 2- المناقشة 53
3- 2- 1- الكشف عن بعض المركبات الكيميائية 53
3- 2- 2- تأثير المستخلصات على طول فترة حياة شغالة نحل العسل 53
3- 2- 3- تأثير مستخلص نبات الصبغة على طفيل الفاروا 54
3- 2- 4- تأثير مستخلص نبات الصبغة في تحريض الجهاز المناعي لنحل العسل 56
الاستنتاجات 58
التوصيات 59
المراجع 60

فهرس الجداول

الشكل	العنوان	الصفحة
1	التابع النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الكشف عن فيروس DWV في شغالات النحل.	32
2	مكونات مزيج المرحلة الأولى من عملية النسخ العكسي	41
3	مكونات مزيج المرحلة الثانية من عملية النسخ العكسي	41
4	مكونات تفاعل البلمرة التسلسلي في الكشف عن فيروسات النحل	42
5	برنامج المدور الحراري بالكشف عن فيروسات النحل	42
6	مكونات هلامتي التجميع والفصل للبولي أكرلامايد.	46
7	كمية الفينولات الكلية (ملغ/غ) في مستخلص الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية	48
8	كمية التانينات الكلية (ملغ/غ) في مستخلص الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية	49
9	متوسط عدد الحشرات التي بقيت على قيد الحياة في تجربة إضافة المستخلص للغذاء	49
10	متوسط عدد الحشرات التي بقيت على قيد الحياة في تجربة رش النحل بالمستخلص	50
11	دراسة فاعلية طريقة استخدام المستخلصات النباتية (الرش أو التغذية) في طول فترة الحياة لحشرة نحل العسل	51
12	دراسة فاعلية التراكيز المختلفة لمستخلصات الأجزاء النباتية على حياة نحل العسل خلال سبعة أيام	52
13	أعداد التساقط الطبيعي للفاروا قبل إجراء المعاملة	53
14	أعداد الفاروا المتساقطة بعد المعاملة	53
15	فاعلية استخدام مستخلص أوراق نبات الصبغة في مكافحة الفاروا	54
16	معدل موت الفاروا باستخدام مستخلص أوراق نبات الصبغة في مكافحة الفاروا	54
17	نسبة الفاروا المتساقطة باستخدام مستخلص أوراق نبات الصبغة في مكافحة الفاروا قبل وبعد المعاملة	55
18	دراسة فاعلية تأثير مستخلص نبات الصبغة الأميركية مع معلق فيروسي في	57

	طول فترة حياة شغالة نحل العسل	
19	تحفيز ببتيدات المقاومة (Hymenoptaecin، Abaecin، Defensin، Apidaecin) بالمعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية فقط	58
20	تحفيز ببتيدات المقاومة (Hymenoptaecin، Abaecin، Defensin، Apidaecin) بالمعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية وفيروس DWV معاً.	58

فهرس الأشكال

الشكل	العنوان	الصفحة
1	الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية	10
2	المنحني القياسي لحمض الغاليك Gallic acid	28
3	تشكل الرغوة في اختبار السابونين في مستخلص ثمار نبات الصبغة الأمريكية	40
4	معاملات النحل بالتراكيز المختلفة لمستخلصات الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية	42
5	الرحلان الكهربائي لمنتجات اختبار RT-PCR للكشف عن فيروس DWV في عينات النحل	48
6	الببتيدات المضادة للميكروبات المحفزة في السائل اللمفاوي لشغالة النحل عند المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية فقط	51
7	الببتيدات المضادة للميكروبات المحفزة في السائل اللمفاوي لشغالة النحل عند المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية وفيروس DWV معاً	51

الملخص

نفذ البحث خلال عام 2021 وعام 2024 في مخبر التنوع الحيوي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومخابر قسم وقاية النبات في كلية الهندسة الزراعية بجامعة دمشق، وقد هدفت هذه الدراسة للكشف عن بعض المركبات الكيميائية لنبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L.، وتأثير المستخلصات المائية لنبات الصبغة الأمريكية على طول فترة حياة وتحفيز (تقوية) الجهاز المناعي لشغالة نحل العسل *Apis mellifera*، ومكافحة طفيل الفاروا *Varroa destructor* Oud.. جُمعت عينات النحل من منحل كلية الهندسة الزراعية في جامعة دمشق خلال الفترة الواقعة بين آذار وأيلول من الأعوام (2021 حتى 2023).

استخدم مجموعة من البادئات المتخصصة بالكشف عن أكثر فيروسات نحل العسل انتشاراً في العالم.

أظهرت نتائج التحليل الكيميائي للمستخلصات المائية للأجزاء النباتية (أوراق – ثمار – جذور – أغصان) لنبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L. احتواء جميع المستخلصات بنسب متفاوتة على الفينولات والتانينات والسابونينات. حيث سجل أعلى محتوى للفينولات والتانينات في المستخلص المائي لأوراق نبات الصبغة الأمريكية وبلغ 128 µg/ml و 79.2 µg/ml على التوالي.

أبدت المستخلصات المائية للأجزاء النباتية المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية تأثيراً معنوياً إيجابيا على متوسط طول فترة حياة شغالة نحل العسل مقارنةً بالشاهد. ولم يكن هناك فروق معنوية بين طريقتي المعاملة سواء بالرش أوالتغذية. إذ كان أعلى تأثير لمستخلص الأوراق بتركيز 100 ppm حيث بلغ متوسط عدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة 76%. وبلغ متوسط الزيادة في عمر شغالة نحل العسل 52.6% مقارنة بالشاهد غير المعامل.

كما أعطى مستخلص الأوراق بتركيز 100 ppm نتائج إيجابية بطريقة الرش لمكافحة طفيل الفاروا، ومتوسط فاعلية نسبية قدره 83.3% مقارنةً بالشاهد المعامل برش الماء المقطر. وقد بلغ متوسط النسبة بين التساقط قبل وبعد التطبيق (ضعف)، وهي عدد أضعاف الفاروا المتساقطة بعد 24 ساعة من المعاملة مقارنةً بمتوسط التساقط الطبيعي قبل المعاملة 6.2 ضعف مقارنةً بالشاهد الذي بلغ 1.6 ضعف. وبلغت النسبة بين متوسط التساقط بعد ساعة واحدة من المعاملة مقارنةً بمتوسط التساقط الكلي بعد 24 ساعة من المعاملة 54.2 %.

إضافة لما سبق وعند دراسة كفاءة مستخلص الأوراق بتركيز 100 ppm في تحفيز الجهاز المناعي لشغالات نحل العسل أمكن الكشف عن البيتيدات المضادة للميكروبات (الهيمينوبتايسين، الأباسين، الديفينسين والأبايديسين)، كما كان هناك زيادة في عدد شغالات نحل العسل التي بقيت على قيد الحياة

والتي غذيت بمعلق لفيروس DWV مع المستخلص النباتي المضاف إلى محلول التغذية حيث بقيت حية لمدة 12 يوم مقارنةً بالشغالات التي تغذت على محلول سكري فقط حيث بقيت حية حتى 10 أيام والشغالات التي تغذت على محلول سكري ومعلق فيروسي عاشت حتى ثلاثة أيام فقط.

الكلمات المفتاحية: *Phytolacca americana* L.، نحل العسل، فاروا، فيروس DWV، المستخلصات النباتية، الفينولات

1- المقدمة

اعتمد الإنسان على الطبيعة في تلبية متطلباته، فهي مصدر للغذاء والدواء والملابس والأسمدة. وتستمر النباتات في إظهار دور رئيسي في نظام الرعاية الصحية (Ravichandran *et al*., 2023). حيث تعد النباتات الطبية مصادر غنية بالمكونات التي يمكن استعمالها في صناعة وتطوير الأدوية (Krishnaiah *et al*., 2011 & Rasool Hassan, 2012). وثبت أنها آمنة بسبب الآثار الجانبية القليلة عند استخدامها لعلاج الأمراض (Govindarajan *et al*., 2003 & Sharma *et al*., 2022).

استخدم نبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L. في الطب التقليدي في أمريكا الشمالية والجنوبية وآسيا (Zarling *et al*., 1990). حيث يمتلك النبات خصائص مضادة للفيروسات والميكروبات والالتهابات والأكسدة والسرطان (Ravikiran *et al*., 2011) ومبيد للرخويات (Krochmal & LeQuesne 1970) والنيماتودا (Ahmed, 2015) والأكاروسات (Ding *et al*., 2012; Rosado-Aguilar *et al*., 2010). يحتوي النبات على العديد من المركبات السامة (Balogh & Juhasz, 2008)، على الرغم من أنه نبات شديد السمية للماشية والبشر، فقد أعلن دستور الأدوية الأمريكي في عام 1820 أنه مسكن للألم ومضاد للالتهابات (Lady Bird Johnson Wildflower Center, cited July 11, 2017; Natural Remedies cited June 14, 2017; Tipaz-Tipaz, 2019).

يعد التأبير خطوة أساسية في عملية التكاثر وإنتاج البذور لما يقارب 300000 نوع من النباتات المزهرة (Kevan & Viana, 2003)، باستثناء محاصيل الحبوب وبعض الخضروات. وتعتمد النسبة الكبرى على التأبير الحشري (Klein *et al*., 2007). يوفر التأبير بواسطة الحشرات فوائد مباشرة وغير مباشرة للإنسان (Fisher *et al*., 2009)، لأنه يساهم في إنتاج 75% من المحاصيل ذات الأهمية العالية (Klein *et al*., 2007). ثلث الغذاء الناتج من النبات يعتمد على التأبير الحشري (Oldroyd & Nanork, 2009) وخاصةً نحل العسل (Richards, 2001).

نحل العسل (*Apis mellifera*) من الحشرات ذات الأهمية الكبيرة. وقد استفاد منه الإنسان منذ القدم، سواء بشكل مباشر (من خلال تربية النحل) أو بشكل غير مباشر (من خلال الزراعة)، لذا فإن أهميته تتماشى مع الأهمية البيئية، كونها اقتصادية أيضاً. على الرغم من الاهتمام المتزايد والطلب على المنتجات الثانوية لنحل العسل، فقد سُجل انخفاض في عدد طوائف النحل في الديد من الدول حول العالم خلال الثلاثين عامًا الماضية (FAOSTAT, 2015).

تراجعت مستعمرات نحل العسل على الصعيد العالمي لأسباب عديدة بما في ذلك الآفات ومسببات الأمراض (McMenamin & Genersch, 2015)، والمبيدات الحشرية (Williams *et al*., 2015)، وفقدان المراعي الطبيعية (Clermont *et al*., 2015)، إضافةً للتآزر بين هذه العوامل (Goulson *et al*., 2015). حددت مسببات الأمراض ومن أهمها الفيروسية من بين العوامل باعتبارها السبب الرئيسي وراء ظاهرة فقدان وانهيار المستعمرات Colony Collapse Disorder (CCD)، ولا سيما العلاقة بين طفيل الفاروا (Varroa) وفيروس الجناح المشوه (DWV) (Martin *et al*., 2012).

تواجه تربية النحل منذ منتصف القرن العشرين خطراً كبيراً بسبب طفيل الفاروا *Varroa destructor* Oud الذي يلعب دوراً هاماً في فقد طوائف النحل وأصبح المشكلة الرئيسة في تربية النحل في جميع أنحاء العالم (Rosenkranz *et al*., 2010; Traynor *et al*., 2020)، وذلك بسبب الضرر الذي يحدثه للأطوار غير البالغة داخل النخاريب المختومة وللنحل البالغ بالتغذية على الدم والأجسام الدهنية (Haemolymph)، بالإضافة لنقله الكثير من الأمراض الفطرية والبكتيرية (Qayyoum *et al*., 2013)، والعديد من الأمراض الفيروسيه (Martin *et al*., 2012; Traynor *et al*., 2020; Flores *et al*., 2021) مثل فيروس الجناح المشوه Deformed wing virus (DWV) وفيروس اسوداد البيت الملكي Black queen cell virus (BQCV) (Chen & Siede, 2007).

يعد فيروس الجناح المشوه DWV من أكثر الفيروسات إنتشاراً وخطورة على نحل العسل (De Miranda & Genersch, 2010; Martin *et al*., 2012) حيث ينتشر بسرعة بين أفراد نحل العسل وهو المسؤول عن موت المستعمرات خلال فصل الشتاء (Martin, 2001; Highfield *et al*., 2009).

توجهت الدراسات حاليا نحو استخدام المستخلصات النباتية في مواجهة هذه الأمراض. تتألف المستخلصات النباتية من خليط من المواد الكيميائية التي تنتمي لمجموعات مختلفة (Akhtar *et al*., 2014). وتمتلك القدرة على تثبيط تطور مجموعة من العوامل الممرضة (Swamy & Sinniah, 2015; Arumugam *et al*., 2016).

تضمنت هذه الدراسة ثلاثة فصول:

- الفصل الأول الدراسات المرجعية الموثقة والمرتبطة بخصائص نبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L.، النظام المناعي لنحل العسل *Apis mellifera*، طفيل الفاروا *Varroa destructor* Oud.، فيروس الجناح المشوه DWV واستخدام المستخلصات النباتية.
- الفصل الثاني مواد وطرائق البحث والتي تشمل الأدوات والتجارب المهمة وطرائق الاستخلاص، التحليل الكيميائي، اختبار تأثير المستخلصات على طول فترة حياة شغالة نحل العسل، مكافحة طفيل الفاروا وتحفيز مناعة النحل بالكشف عن البروتينات المضادة للميكروبات Antimicrobial Peptides.
- الفصل الثالث النتائج والمناقشة التي تم فيها تبويب النتائج بجداول وأشكال وتم شرح النتائج وتفسيرها ومناقشتها مع الأبحاث ذات الصلة.

أهمية البحث:

- يعد نبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L. من النباتات الغازية في سورية والسامة ويؤثر على النظام الإيكولوجي، إلا أنه يحتوي على العديد من الخصائص الطبية كمضاد للفيروسات والفطريات والبكتيريا ويعد مبيد حشري وأكاروسي. حيث أنه من مصلحة الإنسان معرفة كل شيء يمكن معرفته عن النباتات، ومعرفة استخداماتها وأضرارها.
- يلعب نحل العسل دوراً اقتصادياً مهماً على المستوى العالمي، حيث يقدر بأن ثلث غذاء العالم يعتمد على عملية التأبير التي يقوم بها النحل. ويُهدد بالعديد من العوامل الممرضة كالفاروا التي تعد السبب الرئيسي في فقد الأعداد الكبيرة من مستعمرات النحل. بالإضافة للفيروسات التي تلعب الدور الأكبر في فقد المستعمرات المصابة بالفاروا.
- تمتلك المستخلصات النباتية القدرة على تثبيط تطور مجموعة من العوامل الممرضة نظراً لاحتوائها على مكونات كيمائية طبيعية تم تركيبها من قبل أجهزة النبات. حيث تلعب دوراً هاماً كمضادات فطرية وبكتيرية وقد تكون مصدراً واعداً كمضادات فيروسية. لذلك جاء البحث لاستكشاف قدرة نبات الصبغة الأمريكية في تحفيز مناعة النحل ومقاومة بعض الأمراض التي تصيبه.

مشكلة البحث

- تشكل النباتات المعروفة بآثارها السامة كعلاج طبي جدلاً كبيراً. وقد استخدمت قديماً في الطب الشعبي دون معرفة جيدة بأثارها السامة وشدة خطورتها. حيث أن سمية النبات قد تنخفض أو تختفي بالغلي أو بعمليات أخرى وقد يكون النبات غير سام في جرعات محددة وسام في جرعات أخرى.
- بسبب ارتفاع أسعار الأدوية الآمنة والفعالة لنحل العسل، يلجأ النحالين لاستخدام المبيدات والتي تعد من المشاكل الخطيرة التي تؤثر على حياته، وقد أظهرت العديد من الدراسات وجود بقايا مبيدات في مستعمرات النحل ومنتجاته.
- مازالت الأمراض الفيروسية تشكل مشكلة رئيسية على صحة الإنسان والحيوان والنبات. وتعد الفيروسات التي تصيب نحل العسل هي الأقل دراسةً وفهماً حتى الآن، فلا يوجد دراسات كافية تؤكد آلية عملها في إحداث المرض.

تساؤلات البحث

- احتواء نبات الصبغة الأمريكية على بروتينات المضادة للفيروسات وبعض المركبات الأخرى
- قدرة نبات الصبغة الأمريكية على إطالة فترة حياة شغالة نحل العسل
- إمكانية نبات الصبغة الأمريكية في زيادة معدل التساقط لطفيل الفاروا
- قدرة نبات الصبغة الأمريكية على تحفيز مناعة نحل العسل

- احتمالية استخدام نبات الصبغة الأمريكية في تثبيط فيروس الجناح المشوه DWV

فرضيات البحث

- احتواء نبات الصبغة الأمريكية على بعض المركبات الكيميائية كالفينولات
- زيادة طول فترة حياة شغالة نحل العسل عند المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية
- فاعلية المعاملة بالمستخلص المائي لنبات الصبغة الأمريكية في مكافحة طفيل الفاروا
- قدرة نبات الصبغة الأمريكية على تحفيز الببتيدات المضادة للميكروبات في نحل العسل
- تثبيط فيروس الجناح المشوه DWV عند المعاملة بالمستخلص المائي لنبات الصبغة الأمريكية

مسلمات البحث

- احتواء نبات الصبغة الأمريكية على العديد من المركبات الكيميائية ذات الخصائص الطبية المتنوعة
- بعض النباتات لها تأثير في زيادة طول فترة حياة شغالة نحل العسل
- فاعلية المستخلصات النباتية في مكافحة طفيل الفاروا
- وجود بروتينات مضادة للفيروسات في الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية

أهداف البحث

- الكشف عن بعض المركبات الكيميائية في مستخلصات الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية
- دراسة تأثير المستخلصات المائية لنبات الصبغة الأمريكية في إطالة فترة حياة شغالة نحل العسل
- تحديد فاعلية المستخلصات المائية لنبات الصبغة الأمريكية في زيادة معدل التساقط لطفيل الفاروا
- إمكانية استخدام المستخلصات المائية لنبات الصبغة الأمريكية في تثبيط فيروس الجناح المشوه DWV

مبررات البحث

استخدم نبات الصبغة الأمريكية منذ القدم في العلاج الشعبي في العديد من الدول، أشارت العديد من الدراسات إلى دوره في علاج العديد من الأمراض بمختلف المسببات المرضية. بالإضافة لاحتواءه على بروتينات مضادة للفيروسات أثبتت كفاءتها ضد العديد من الفيروسات البشرية والنباتية.

يصاب نحل العسل محلياً وعالمياً بالعديد من الممرضات التي تسبب خسائر فادحة نتيجة انخفاض أعداد النحل داخل الخلايا، بالإضافة للخسائر البيئية والاقتصادية.

نظراً لندرة الدراسات حول استخدام نبات الصبغة الأمريكية على نحل العسل، لذلك جاءت فكرة البحث لدراسة إمكانية استخدام النبات في تعزيز مناعة النحل والتأكد من عدم وجود آثار سامة تسبب خسارة النحل.

محددات البحث

تم دراسة التوثيق المرجعي الأكثر توافراً وأهمية وارتباطاً بالبحث عن استخدام نبات الصبغة الأمريكية في تعزيز مناعة نحل العسل. حيث استخدم مراجع منها القديم وأكثرها حديث من الدراسات المرجعية العالمية والمحلية. وتعد هذه الدراسة مهمة من الناحية العلمية والعملية في البحث عن استخدام أحد النباتات الغازية في مكافحة بعض ممرضات نحل العسل.

المحددات المكانية: نفذت الدراسة في:

- مخبر التنوع الحيوي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق – سوريا.
- مخابر قسم وقاية النبات – كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق.

المحددات الزمانية: نفذت الدراسة خلال الأعوام: 2021 – 2022 – 2023.

1- الفصل الأول

1- 1- الدراسة المرجعية

1-1-1- نبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L.

1- 1- 1- 1- الوصف النباتي Botanical descripsion

ينتمي نبات الصبغة الأميركية إلى فصيلة Phytolaccaceae والتي تضم 35 جنساً (Roberge *et al.*, 1986) و150 نوعاً (Wren, 1900). وهي أعشاب وشجيرات ونادراً ما تكون أشجار أو نباتات متسلقة (Takhtajan, 1997). وهو نبات عشبي معمر وثنائي الفلقة، أملس وكثير التفرع. يتراوح طوله من 2 –3.5 م، وقد يكون أحياناً كريه الرائحة (شكل 1).

جذر النبات وتدي قوي، سميك، متفرع، ينمو سريعاً، يتعمق في التربة حتى نصف متر، وزنه في النباتات البالغة حوالي 10 كغ، ويصل قطره عند مستوى سطح الأرض 12 – 15سم، أبيض اللون (Balogh & Juhasz, 2008).

الساق منتصبة، اسطوانية، لحمية ومجوفة من الداخل. عادةً ما تكون مع بقع أرجوانية أو حمراء من الداخل. يمكن أن يكون خشبياً إلى حدٍ ما في القاعدة (Balogh & Juhasz, 2008).

الأوراق خضراء داكنة على الجانب العلوي وخضراء أكثر إشراقا على الجانب السفلي. تنمو بشكل متفرق على الساق. لها عنق، رمحية متطاولة إلى بيضاوية الشكل، حادة في القمة، وطولها 10-30 مم، وعرضها 5-15 مم، عريضة، ملساء، لها تعرق مجنح ملفت للنظر. يتناقص حجم الأوراق باتجاه قمة النبات. يبلغ طول نوراتها من 5 إلى 15 مم، ويمكن أن تكون مستقيمة أو منحنية، ولكن بحلول وقت النضج تكون في الغالب متدلية للأسفل (Skalicky 1972; Balogh & Juhasz, 2008).

الأزهار صغيرة بيضاء اللون بين شهري حزيران وتشرين الأول، يبلغ عرضها 5 – 6 مم، وقد تكون غير مكتملة الأجزاء الأنثوية أو قد تكون خنثى، تحوي 10 أسدية ومدقة مركبة (10 مدقات متحدة في القاعدة) وتتوضع بشكل متناظر على العناقيد. ويكون غلاف الزهرة بلون أبيض أو أخضر وتتحول إلى اللون الأحمر على الفاكهة. ولا يوجد لها تاج ويكون الكأس شبه دائري أو بيضوي، يبلغ عرضها 2.5 مم (Skalicky 1972; Balogh & Juhasz, 2008).

الثمار مفصلية بدرجة بسيطة، قبل النضج تكون خضراء وسطحها أملس، يتراوح قطرها 6 – 9 مم، وتتحول إلى اللون الأرجواني الداكن اللامع ثم إلى اللون الأسود عندما تنضج بين شهري آب وتشرين الأول وتصبح دائرية ويبلغ قطرها 7 – 12 مم. تحوي على 10 بذور كلوية مستديرة -reniform orbicular الشكل، ناعمة وبلون أسود لامع. يبلغ قطرها 2.5 – 3 مم ووزنها 6.1 – 7.5 غ/1000 بذرة (Balogh & Juhasz, 2008).

شكل1: الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية

(a: النبات الكامل، b: الجذر، c: الأوراق، d: الأزهار، e: الثمار)

1- 1- 1- 2- الموطن والانتشار والتكاثر

تنتشر النباتات التابعة لفصيلة Phytolaccaceae في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية في أمريكا وفي جنوب أفريقيا وجنوب أسيا وأجزاء من البحر المتوسط (Takhtajan, 1997; Balogh & Juhasz, 2008).

تعد أمريكا الشمالية والجنوبية وشرق آسيا الموطن الأصلي لنبات الصبغة الأمريكية (Wishon, 2010)، وتوسع انتشاره فيما بعد حتى أصبح من الصعب السيطرة عليه. في القرن السابع عشر، بدأت زراعته في المناطق المحيطة بالبحر الأبيض المتوسط حيث تمت زراعته كمصدر لمصانع الصباغة منذ عام 1650 (Balogh & Juhasz, 2008). وقد صنف على أنه نبات غازي وينتشر بكثرة في جميع أنحاء الولايات المتحدة (Rupp *et al*., 2017) وأوربا (Tanner & Fried 2020).

في سوريا ينتشر النبات في ريف حمص الغربي (قرى الحواش وبرشين واستراد حمص – طرطوس مفرق برشين) (معلومات قيد النشر). أما بالنسبة لكيفية إدخاله إلى سوريا مازالت مجهولة ولا توجد نصوص تؤكد كيفية إدخاله إلى سوريا والشرق الأوسط.

ينتشر النبات في الأراضي المضطربة التي تعرضت لحريق أو ما شابه وفي حواف الغابات والأراضي الحراجية (Balogh & Juhasz, 2008)، والغابات المختلطة الغنية بالأنواع

الحراجية (Schirmel, 2020). له أثار ضارة على النظام البيئي للمنطقة حيث يمنع تطور النباتات المحلية، وعلى نظام المنافسة الخفية حيث يمنع تطور الأنواع الأخرى، ويسبب تخريب للمناطق الزراعية مما يسبب أضراراً اقتصادية كبيره (http://www.invasoras.pt).

يتكاثر النبات عن طريق البذور، ويعطي عدد كبير جداً من البذور، والتي تنقلها الطيور من مكان إلى أخر، كما ويمكن إكثاره أيضاً عن طريق البراعم من الجذور (Florea & Donea, 2010; El-Minisy *et al*., 2017).

1- 1- 1- 3- المكافحة

يمكن قلعه باليد بعد هطول الأمطار حيث يسهل سحب النبات من جذوره كما أن تطبيق نظام إدارة مكافحة الأعشاب الغازية بشكل جيد وتحديد أساليب الدخول والغزو وتقييم المخاطر وتشديد الرقابة تحد من انتشاره. كما يمكن مكافحته من خلال استخدام مبيدات أعشاب (الغلايفوسات، 2،4-D) (http://www.invasoras.pt).

1- 1- 1- 4- التركيب الكيميائي

يحتوي النبات على العديد من المركبات السامة Alkaloid (Phytolaccin) والراتنج (Phytolaccatoxin) و Saponin (Phytolaccagenin) والبروتين السام (Lectin) والتي تتركز بشكل أساسي في الجذور والثمار والبذور وبالإضافة إلى ذلك، فهي تحتوي على مشتقات حمض السينامك والفلافونوئيدات التي لها تأثيرات فسيولوجية (Balogh & Juhasz, 2008). من أهم المركبات الكيميائية الموجودة في النبات Phenols و Flavonoids و Betalains و Betacyannins و Betaxanthins و Carotenoids و Saponins (Marinas *et al*., 2021) وTannins (Sussner *et al*., 2004).

1- 1- 1- 5- تأثيره على الإنسان

استخدم نبات الصبغة الأمريكية في بعض مستحضرات الطب البديل الفرنسية للتخفيف من الأنفلونزا والتهاب اللوز الحاد وآلام خراجات الحلق والثدي والروماتيزم والتهاب البلعوم المزمن (Nétien *et al*., 1986). هو نبات طبي مدرج رسميًا في الولايات المتحدة وكذلك في دستور الأدوية الفرنسي والياباني. تم استخدام النبات في الطب الشعبي كمدر للبول، ومسهل، ومضاد للسعال، ومضاد

للزهري (Fournier, 1948) ومقشع (Chevallier, 1996). على الرغم من أنه نبات شديد السمية للماشية والبشر، فقد أعلن دستور الأدوية الأمريكي في عام 1820 أنه مسكن للألم ومضاد للالتهابات (Lady Bird Johnson Wildflower Center, cited July 11, 2017; Natural Remedies cited June 14, 2017; Tipaz-Tipaz, 2019). وجد Pioneer فوائد النبات في معالجة التقرحات والأورام (Chevallier, 1996). وقام سكان أمريكا الأصليين وأوربا بابتلاع جذور النبات كمخدر ومقيء (Chevallier, 1996). بالإضافة إلى استخدامه كغذاء في بعض الأحيان (Fournier, 1948).

جميع أجزاء النبات سامة ويعتبر الجذر هو الجزء الأكثر سمية، وأن السمية تزداد مع نضج النبات، كما أن الثمار الخضراء غير الناضجة أكثر سمية من الثمار الناضجة (Roberge *et al*., 1986). وعلى الرغم من سمية جميع أجزاء النبات، إلا أن سكان أميركا الجنوبية قاموا بغلي النبات على درجات حرارة مختلفة والتغذية عليه. وإضافة عصير الثمار إلى المشروبات الكحولية كصبغة (Chevallier 1996). ومعظم الأمراض الخطيرة الناتجة عن النبات تأتي نتيجة الالتباس بين جذر النبات وجذور كل والجزر الأبيض والفجل (Lampe & Fagerstrom, 1968).

أشارت بعض التقارير إلى استخدام غير ملائم للنبات، عن طريق مضغ الجذر دون غليه قبل الاستهلاك (Roberge *et al*., 1986)، أو عن طريق تناول الأوراق النيئة (Stein, 1979)، أو عن طريق شرب شاي الأعشاب المحضر من استخلاص الأوراق والساق (Jaeckle & Freemon, 1982) أو مسحوق الجذر (Lewis & Smith, 1979) مع الماء المغلي. يمكن إرجاع هذه التعليقات إلى الاعتقاد السائد بأن البراعم الخضراء الصغيرة أو الأوراق يمكن استهلاكها بأمان كخضروات بعد غليها في الماء، والتخلص من ماء الطهي ثم إعادة غليها (Mack, 1982; Tyler, 1987; Stein, 1979). وينص نص صيني على أن سمية جذر النبات قد تقل بشكل كبير عند الغلي لمدة ساعتين (Chang & Butt, 1986).

1- 1- 1- 6- تأثيره على الحيوان

أدى حقن القطط في الوريد بالمستخلص الكحولي لجذور نبات الصبغة الأمريكية إلى انخفاض ملحوظ في وظائف الجهاز التنفسي والدورة الدموية (Macht, 1937). وفي الحقن داخل الصفاق أدى إلى شعور عدم الراحة، وأحيانًا التقيؤ، فقدان تدريجي لاستخدام الأرجل الخلفية والأمامية. الذهول والنعاس وانخفاض الإحساس بالألم. تخدير عميق وضربات القلب أبطأ وأضعف والتنفس أقل عمقا. وكان له تأثير قوي على الجهاز العصبي المركزي وبلغت الجرعة المميتة 50 ملغ / كيلو من وزن الجسم (Goldstein *et al*., 1937).

تؤثر ثمار النبات عند إضافتها إلى غذاء فراخ الديك الرومي على وزن الجسم وتسبب الموت مع زيادة تركيز الثمار. وتسبب الاستسقاء عند بعض الطيور، وكانت المرارة المتضخمة والمليئة بسائل بني شائعة في معظم الطيور التي ماتت بالتراكيز العالية من الثمار. وفي بعض الحالات أصبحت الطيور غير قادرة على الوقوف أو المشي بسبب انتفاخ العرقوب Hock (Barnett, 1975). ولكن في إحدى دراسات التغذية كانت غير ضارة لبعض طيور البط والدجاج (Hendrickson & Hilbert, 1931). تأثرت وظائف الكبد لدى الأرانب بشكل ملحوظ عند إعطائها جرعات مرتفعة من مستخلص الجذور (Macht, 1937).

تتجنب الخيول تناول هذا النبات ولكن في حال عدم توفر العلف أو عند التنافس بين الحيوانات تلجأ الخيول لتناوله، ويسبب فقدان في وزن الجسم عند الاستمرار في تناوله لفترة أشهر مسبباً تبلد وإسهال وانخفاض في الشهية وصعوبة في البلع والمضغ والتهاب المعدة وفقر الدم وانخفاض في البروتين الكلي في البلازما (Valle *et al*., 2016). أيضاً حيوانات الماشية تتجنب تناول النبات، ولكن في حال خلطه مع العلف يسبب إسهال شديد وانخفاض حاد في إنتاج الحليب وتنخفض حرارة الجسم (Kingsbury & Hillman, 1965)، يسبب للماعز إسهال دموي وتمزق في الأغشية المخاطية ورعشة في العضلات أحياناً (Smith & Constable, 2002). عانت الخنازير التي تناولت جذور النبات من محاولات تقيء ونوبات تشنج (حالات صرع) والدخول في غيبوبة (Patterson, 1929).

1- 1- 1- 7- تأثيره على الحشرات

يجذب نبات الصبغة أنواع من النحل (*Augochlora pura - Augochloropsis metallica - Augochloropsis sumptuosa - Dialictus miniatulus - Dialictus nymphalis - Dialictus placidensis - Dialictus tegularis - Evylaeus pectoralis - Bombus impatiens*) (Deyrup *et al*. 2002).

كما ويمتلك النبات خصائص كمبيد للرخويات، فقد لوحظ وجود قواقع لحلزونات ميتة في المجاري المائية في إثيوبيا حيث كان سكان هذه المناطق يغسلون ثيابهم بثمار هذا النبات الغنية بمادة السابونين Saponins. ومن ثم صنع مبيد للرخويات من ثمار النبات بتركيز Lethal Concentration LC_{100} عشرة أجزاء بالمليون ضد حلزونات (Biomphalaria – Bulinus – Lymnea spp)، حيث يقضي عليها بعد مرور 24 ساعة وبدرجة حرارة 23º س. بالإضافة إلى أن هذا المبيد لم يظهر له أي تأثير على التربة والخضار في المنطقة المعاملة وهذا له دور مهم عند استعماله في الظروف الطبيعية (Krochmal & LeQuesne, 1970).

أظهر المستخلص المائي لأوراق وجذور النبات خصائص كمبيد للنيماتودا (*Meloidogyne incognita - Aphlenchoides fragariae - Ditylenchus dipsaci - Rotylenchulus reniformis - Pratylenchus penetrans*) بعد التعرض للمستخلص لـ 4 و24 ساعة. وكان لمستخلص الأوراق التأثير الأقوى مخبرياً. وفي اختبارات البيت الزجاجي لم تظهر نتائج جيدة في مكافحة الديدان الخيطية الكلوية الشكل reniform nematode (Ahmed, 2015).

كان لمستخلص الجذور الأسيتوني خصائص كمبيد للأكاروسات عند اختباره على الإناث البالغة لـ *Tetranychus cinnabarinus* (Ding *et al*., 2012) و*Boophilus microplus* (Rosado-Aguilar *et al*., 2010). وله خصائص كمبيد للحشرات، حيث يسبب تسمم يرقات *Diabrotica undecimpunctata* عند تغذيتها عليه بسبب احتوائه على الليكتين (Czapla & Lang, 1990). ويرقات *Plutella xylostella* (Vanichpakorn *et al*., 2010).

1- 1- 1- 8- الخصائص الميكروبيولوجية

1- 1- 1- 8- 1- مضاد فيروسي

يحتوي النبات على بروتينات مثبطة لعمل الجسيمات الريبيه RIPs (Ribosome-Inactivating Protein) وتدعى بـ PAP (Pokeweed Antiviral Protein)، تم عزل PAP I من أوراق الربيع و PAP II و PAP III من الأوراق في بداية الصيف ونهايته (Irvin & Uckun, 1992) و PAP-S من البذور (Barbieri *et al*., 1982).

وفيما بعد في عام 1997 أكد العالمان Poyet و Heoveler وجود هذه البروتينات في جميع أجزاء النبات. وأوضحوا بأن عمر النبات المستخرج منه البروتين له أهمية في تحديد نوعية البروتين، فمثلا بروتين PAP II موجود بشكل أكبر في النباتات المعمرة. وتبين أن نوع البروتين يختلف من عضو لأخر في النبات. تتوفر تسلسلات cDNA لبروتينات PAP و PAP II و PAP-S من GenBank بأرقام accession التالية AR009535 و X86085 و X98079. وعدد النكليوتيدات في جين البروتينات PAP و PAP II و PAP-S هي 942 و 933 و 945 bp طولاً وعدد الشفرات 314 و 311 و 315 حمض أميني على التوالي (Poyet & Heoveler, 1997)، والوزن الجزيئي للبروتينات 29 ، 30 و 29 KDa على التوالي (Koch *et al*., 1996).

يقوم PAP بإزالة قاعدة أدنين محددة من حلقة sarcin/ricin (SRL) من 28S rRNA في حقيقيات النوى، ويثبط عملية الترجمة وبالتالي تموت الخلية نظرا لعدم قدرتها على تصنيع البروتينات اللازمة لتطورها (Lodge *et al*., 1993). تعود آليه PAP في إحداث السمية الخلوية إلى نشاط أنزيم

N-glycosidase والتفاعل مع البروتينات الريبوزمية وتثبيط الترجمة وفعالية أنزيمية (تعطيل mRNA المغطى و RNA غير المغطى) والنهاية الكربوكسيلية (Di & Tumer, 2015). وتختلف الآلية المستخدمة باختلاف نوع الفيروس (TELTOW *et al*., 1983).

أظهر البروتين PAP كفاءة في تثبيط فيروس نقص المناعة البشرية HIV-1 (Uckun *et al*., 2003)، وفيروس شلل الأطفال (Ussery *et al*., 1977) الهربس البسيط (Aron & Irvin 1980)، الانفلونزا (Tomlinson *et al*., 1974)، موزاييك الخيار (Tomlinson *et al*., 1974)، موزاييك التبغ (Chen *et al*., 1993; Watanabe *et al*., 1997)، موزاييك اللفت (Domashevskiy *et al*., 2012)، التهاب السحايا اللمفاوي LCMV (Uckun *et al*., 2005)، التهاب السحايا الياباني (Ishag *et al*., 2013)، البطاطا X و Y (Lodge *et al*., 1993).

1- 1- 1- 8- 2- مضاد بكتيري

يحتوي النبات على بروتينات مضادة للجراثيم AMP (Antimmicrobial Protein) موجود في الثمار الناضجة وهو أحد الطرق الدفاعية التي يستخدمها النبات ضد مسببات الأمراض. ويظهر تسلسل cDNA لمورثة هذا البروتين أنه يتم تصنيعه قبل حدوث الإصابة كبادئ. ومن ثم يخرج خارج غلاف البذرة في مرحلة الإنبات (Liu *et al*., 2000). يؤثر مستخلص الثمار بشكل سلبي على نمو البكتيريا سالبة الغرام *Escherichia coli* (Hamissou & Kurdmongkoltham, 2015) و*Porphyromonas gingivalis* (Patra *et al*., 2014)، التي تسبب أمراضاً فموية وبناء على نتائج دراسته، يمكن استخدام أجزاء النبات في معجون الأسنان العشبي والأدوية لعلاج أمراض اللثة وتسوس الأسنان. ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من البحث لتحديد وتوصيف الجزيئات النشطة المسؤولة عن خصائصها المضادة للبكتيريا وتحديد إمكانية استخدامها في الصناعات الدوائية.

1- 1- 1- 8- 3- مضاد فطري

يحتوي النبات على ببتيد مضاد للفطريات AFP (Antifungal Peptide)، تم عزله من ثمار النبات له تأثير مثبط للعديد من الفطريات (*Fusarium oxysporum - Fusarium graminearum - Fusarium graminearum - Fusarium solani - Alternaria tenuis - Pyricularia oryzae - Rhizoctonia solani - C&ida albicans - Botrytis cinerea - Magnaporthe grisea - Penicillium italicum - Diaporthe actinidiae - Botryosphaeria dothidea - Colletotrichum gloeosporioides*) وبعض الفطريات الرمية (Onaran & Saglam, 2016; Tipaz-Tipaz *et al*., 2019).

1- 1- 1- 8- 4- مضاد أكسدة

تحتوي مستخلصات الأوراق والثمار على كميات كبيرة من الفينولات Phenols والكاروتينات carotenoids التي تعرف بكفاءتها العالية كمضادات أكسدة (Marinas *et al*., 2021).

1- 1- 1- 8- 5- مضاد سرطان

تمتلك الأوراق تأثير مباشرة على الخلايا السرطانية، وكان لمستخلص الإيثانول تأثير مضاد للتكاثر على خلايا سرطان الكولون (Maness, 2012).

تبين وجود تأثير إيجابي لمستخلصات (جذور – أوراق – ثمار) في تثبيط نمو كالس callus من نبات التبغ *Nicotiana tabacum* (تزايد غير منتظم في كتلة النباتات) (Hamissou & Kurdmongkoltham, 2015).

1- 1- 2- نحل العسل الغربي *Apis mellifera*

استفاد الإنسان من نحل العسل منذ القدم، سواء بشكل مباشر (من خلال تربية النحل) أو بشكل غير مباشر (من خلال الزراعة)، فهو من الحشرات ذات الأهمية الكبيرة، وأهميتها تتجاوز الأهمية البيئية، كونها اقتصادية أيضاً (FAOSTAT, 2015).

ينتمي نحل العسل إلى رتبة غشائيات الأجنحة Hymenoptera وعائلة Apidae والجنس Apis التي تضم ثمانية أنواع من نحل العسل الآسيوي ونوع واحد من نحل العسل العالمي (الأوربي) *Apis mellifera* (Hepburn & Radloff, 2011). تتكون الخلية من ثلاث طبقات مختلفة من النحل: الملكة والشغالات والذكور. الملكة والذكور أكبر حجماً من الشغالات. الملكة هي الأنثى الوحيدة الخصبة في الخلية. يعتمد التمايز بين ملكة أو شغالة على تغذية اليرقات. تمتلك شغالات نحل العسل معدة خاصة لتخزين الرحيق والماء الذي تجمعه وتحمله إلى الخلية، وسلة حبوب اللقاح على أرجلها الخلفية لنقل حبوب الطلع المجمعة من الزهور إلى الخلية (Moreno, 2016).

تعيش الشغالات البالغة لمدة 2-4 أسابيع في الصيف، أو ما يصل إلى 11 أسبوعاً إذا عاشت خلال فصل الشتاء. يعيش الذكور لمدة 4-8 أسابيع فقط ولا يعيشون خلال فصل الشتاء. تعيش الملكات لمدة 2-5 سنوات (Hammond & Blankenship, 2009). يحدث التكاثر عادةً في فصل الربيع حيث يتوفر الغذاء (Mortensen *et al*., 2013). تحافظ الملكة على النظام في الخلية عن طريق نشر

الفيرومونات التي تحفز الشغالات على أداء مهامها. وهذه هي الطريقة الرئيسة للتواصل بين نحل العسل (Mortensen *et al*., 2013).

على الرغم من الاهتمام المتزايد والطلب على المنتجات الثانوية لنحل العسل، فقد كان هناك انخفاض في عدد طوائف النحل في بعض البلدان خلال الثلاثين عامًا الماضية (FAOSTAT, 2015). ويمثل هذا تحدياً بيئياً يساهم أيضاً في الخسائر الاقتصادية الناجمة عن فقدان أفراد نحل العسل نفسه. وقد تم وضع عدة فرضيات لتفسير سبب هذا الانخفاض، بما في ذلك آفات نحل العسل والإصابات، وتغير المناخ والمبيدات الحشرية وخاصة Neonicotinoids. ويعتقد أن كل عامل من العوامل المذكورة يلعب دوراً في صحة نحل العسل، على الرغم من عدم العثور على أي دليل يربط أي منهم بأنه العامل الوحيد الذي يؤدي إلى انخفاض مجتمعات نحل العسل في جميع أنحاء العالم (Cox-Foster *et al*., 2007). في عام 2006 تم وصف الانهيار المفاجئ لطوائف النحل (CCD) لأول مرة (Cox-Foster *et al*., 2007).

تعيش معظم أنواع الحشرات حياة قصيرة نسبيًا، لكن لديها جهاز مناعي معقد وفعال. على سبيل المثال، يعد الجهاز المناعي لدى الحشرات أكثر كفاءة في اكتشاف مسببات الأمراض والاستجابة لها مقارنة بأجهزة الفقاريات (Murphy *et al*., 2017). وتظهر مناعة الحشرات العديد من أوجه التشابه مع الاستجابات المناعية الفطرية للإنسان والفقاريات الأخرى، والتي تتضمن مجموعة متنوعة من ردود الفعل بما في ذلك تخليق الببتيدات المضادة للميكروبات، والبلعمة، والتصبغ melanization والتحلل الأنزيمي للممرضات (Hoffmann, 2003; Hultmark, 2003).

طورت الحشرات الاجتماعية عدة استراتيجيات لمكافحة الأمراض (Evans *et al*., 2006).

- أولاً: المناعة الاجتماعية

وهي مستوى الدفاع الأولى في الخلية والذي ينتج عن تخصص الشغالات بالعمل (Fries & Camazine, 2001). يقوم العديد من الأفراد بمهام صغيرة لها تأثير جماعي على مستوى الخلية في الحد من انتشار الطفيليات ومسببات الأمراض، وتخفف الضغط على الجهاز المناعي لأفراد النحل (Evans *et al*., 2006; Lourenço *et al*., 2013)، مثل:

- السلوك الصحي Hygienic Behavior: تقوم الشغالات بإزالة الحشرات البالغة التي تنفق في الخلية (Evans & Spivak, 2010) وتحديد وإزالة الحضنة المصابة من الحضنة السليمة (Spivak & Reuter, 2001). هذا السلوك يساعد في السيطرة على الفطريات مثل فطر الحضنة الطباشيري *Ascosphaera apis* (Simone *et al*., 2014)، والبكتيريا مثل البكتيريا المسببة لتعفن الحضنة الأمريكي *Paenibacillus larvae* (Rothenbuhler,

1964)، والفاروا Varroa (Boecking & Drescher, 1992). ويختلف النحل باختلاف الأنماط الوراثية في مستوى التعبير عن هذا السلوك (Rothenbuhler, 1964; Unger & Guzman-Novoa, 2010).

- الحمى الاجتماعية: تقوم الشغالات بتوليد حرارة إضافية في الخلية، مما يساعد في التحكم بمسببات المرض في العائل المصاب، وتساعد في مكافحة فطر الحضنة الطباشيري *Ascosphaera apis* (Starks *et al*., 2000).
- سلوك التنظيف Grooming behaviour: هي قدرة النحل على تنظيف أجسامها من الطفيليات الخارجية باستخدام الفك السفلي والأرجل (Guzman-Novoa, 2011; de Roode & Lefêvre, 2012). وهناك نوعين من التنظيف، الذاتي وتنظيف الغير (Pritchard, 2016).
- جمع واستخدام العكبر: ويقوم النحل بجمع العكبر وراتنجات الأشجار (خاصة من الصنوبريات) التي لها خصائص مطهرة ومضادة للميكروبات. يستخدم لتغليف الجزء الداخلي من العيون السداسية للحضنة أو تحنيط الفقاريات التي تدخل الخلية وبالتالي يمنع أو يقلل من تطور البكتيريا والفطريات المسببة للأمراض (de Roode & Lefêvre, 2012)، وقد تحد مركبات العكبر من نمو الفاروا Varroa لأنها تملك خصائص كمبيد أكاروسي (Popova *et al*., 2014; Damiani *et al*., 2010).

- ثانياً: المناعة الفردية

وهي مستوى الدفاع الثاني في الخلية، وتنتج عن التركيب الكيميائي والميكانيكي لجسم النحل (Evans *et al*., 2006; Chen & Siede, 2007). وتتمثل بالحواجز الفيزيائية والكيميائية، التي تتضمن الهيكل الخارجي Exoskeleton والقصبات الهوائية والغشاء المخاطي المعوي، وهي خط الدفاع الأول الذي يمنع مسببات الأمراض من الالتصاق بالجسم أو دخوله (Evans & Spivak, 2010). إذا اخترق العامل الممرض هذه الحواجز، يمكن لنحل العسل حماية نفسه من العدوى من خلال الاستجابات المناعية الخلوية والخلطية التي تمثل خط الدفاع الثالث (Laughton *et al*., 2011).

- ثالثاً: النظام المناعي

هو المستوى الدفاعي الثالث الذي يتكون من: الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية (Chen & Siede, 2007).

- المناعة الخلوية:

الهدف الأساسي منها هو تمييز الأجسام الغريبة داخل الجسم وبالتالي التعرف على الكائن الممرض (Chen & Siede, 2007)، تتمثل بخلايا دموية يتم نقلها عن طريق الدم والتي تؤدي عمليات

مثل البلعمة Phagocytosis التغليف أو الكبسولة Encapsulation والتصبغ Melanization (Strand, 2008). وتقوم بتصنيع وتخزين استجابات هرمونية مثل الببتيدات المضادة للميكروبات AMP (Lemaitre & Hoffmann, 2007). ترتبط الخلايا البالعة بالكائن الممرض، وفي حال وجود عدد كبير من الكائنات الممرضة تتشكل ما يسمى بالعقد Nodule والتي تنتج عن ارتباط أعداد كبيرة من الخلايا البالعة، وفي حال كان حجم الكائن الممرض كبير كالطفيليات، تتشكل الكبسولات، وهي عبارة عن عدة طبقات من الخلايا البالعة وبأعداد كبيرة (Chen & Siede, 2007).

- المناعة الخلطية:

هي أهم نظام دفاعي، يتم بواسطة المواد الكيميائية والببتيدات المضادة للميكروبات AMP (Lemaitre & Hoffmann, 2007). يتم إنتاج الاستجابات الخلطية في الخلايا الدموية والظهارية والغدد اللعابية والجسم الدهني (الذي يكافئ الكبد لدى الثديات) (Gätschenberger *et al*., 2013).

ينتج نحل العسل عدد أقل من الببتيدات المضادة للميكروبات AMP مقارنةً بباقي الحشرات (Brutscher *et al*., 2015). يحتوي على أربع عائلات من AMP: Abaecin وApidaecin وHymenoptaecin وDefensin (Vizioli & Salzet, 2002).

1- 1- 3- المستخلصات النباتية

اعتمد الإنسان على النباتات لتلبية احتياجاته الأساسية مثل الغذاء والملبس والمأوى لعدة قرون (Salim *et al*., 2008)، وكانت النباتات الطبية مصدراً لمجموعة واسعة من المركبات النشطة بيولوجياً واستخدمت على نطاق واسع كمواد خام أو كمركبات نقية لعلاج الحالات المرضية المختلفة. يستخدم الإنسان ما بين 1 إلى 10% من النباتات من بين 250.000 إلى 500.000 نوع من النباتات الموجودة على الأرض (Kunzelman *et al*., 2005). ويلعب الطب التقليدي النباتي دوراً رئيسياً في تطوير الدراسات الحديثة من خلال العمل كنقطة انطلاق لتطوير الاختراعات في اكتشاف الأدوية (Wright, 2005).

كان النبات في السابق المصدر الرئيسي للدواء في العالم، ومنذ ذلك الحين، استمرت النباتات بتزويد الإنسان بعلاجات جديدة حيث أن 50% من الأدوية المستخدمة في العلاج في العالم مشتقة من مصادر طبيعية (Hayta *et al*., 2014; van Wyk & Prinsloo, 2018). انتشر استخدام النباتات على نطاق واسع في الحضارات القديمة. وحتى منتصف القرن التاسع عشر، كانت النباتات هي العناصر العلاجية الرئيسية التي يستخدمها الإنسان، وحتى يومنا هذا، لا يزال دورها في الطب ذا أهمية (Farnsworth *et al*., 1985). اكتسب النبات شعبيته كمصدر للدواء بسبب منشأه الطبيعي، انخفاض

تكلفة شراءه وسهولة إدارته، كما أنه مفيد في حالة ظهور صفة المقاومة للأدوية والأعراض الجانبية (Ingle *et al*., 2017; Sasidharan *et al*., 2011). وتعود القوة الطبية لهذه النبات إلى مركبات كيميائية نباتية Phytochemicals والتي يمكن أن تسبب تأثيرات فيزولوجية Physiological محددة على جسم الإنسان، وتعمل مع العناصر الغذائية والألياف ضد الأمراض أو بشكل أكثر تحديداً للوقاية من الأمراض (Moshi & Mhame, 2013; Akinmoladun *et al*., 2007).

تصنف المواد الكيميائية النباتية إلى مجموعتين (Hussein & El-Anssary, 2018):

1. المستقلبات الأولية، وهي ضرورية للنمو الطبيعي للنبات وتطوره، تتضمن الأحماض النووية Nucleic Acids، الكربوهيدرات، الأحماض الدهنية، البروتينات والجزيئات الموجودة في كل النبات لنموه وتطوره مثل منظمات النمو ومكونات جدار الخلية.
2. المستقلبات الثانوية، وهي مواد نشطة بيولوجياً، ضرورية للنبات لتعزيز قدرته على التكيف مع بيئته المحلية. ولها وظائف مختلفة في فيزيولوجيا النبات والكيمياء الحيوية وتتضمن (Alkaloids, Flavonoids, Terpenes, Saponins, Steroids, Glycosides).

خلال الاستخلاص يتم فصل المواد النشطة أو المستقلبات الثانوية من المواد غير النشطة باستخدام طرق استخلاص معيارية ومذيب مناسب (Sasidharan *et al*., 2011). ويعتمد تركيز هذه المواد في النبات على التربة والمناخ والممارسات الزراعية ونوعية مياه الري ومعالجة النباتات وموسم الحصاد والتلوث البيئي (Aldhanhani *et al*., 2022; Caldeirão *et al*., 2021)، وقد يكون النشاط الإجمالي للمستخلصات ناجم عن مجموعة من المواد ذات النشاط التآزري أو التنافسي أو الجمعي (Piechocka *et al*., 2019). إن التركيب الكيميائي للنبات معقد نسبياً ويلاحظ وجود 20 إلى 60 مركب كيميائي ذو نشاط وخصائص بيولوجية مختلفة في العديد من الزيوت العطرية (Swamy & Sinniah, 2015; Arumugam *et al*., 2016)، وقد بينت الدراسات أن معظم المستخلصات تحتوي على 2-3 مركبات كيميائية رئيسية تكون بتركيز عالي نسبياً مقارنة مع المركبات الأخرى التي تتواجد بكميات ضئيلة (Pandey *et al*., 2014).

للمكونات النشطة بيولوجياً والمسؤولة عن بعض الأنشطة الفيزيولوجية في جسم الأنسان، فوائد تعزز الصحة مثل مضادات الأكسدة، مضادات الالتهاب، مضادات سرطان، نقص السكر في الدم، مضادات السمنة ومواد ذات الخصائص الوقائية للأجهزة العصبية والكبدية والقلبية والمعدية (Majeed & Bhat, 2022).

هناك طرق عديدة للاستخلاص ويعتمد اختيار طريقة الاستخلاص المناسبة على طبيعة المادة النباتية، والمذيب المستخدم، ودرجة الحموضة pH ودرجة الحرارة للمذيب. وأيضاً استخدام نواتج

الاستخلاص (Ingle *et al*., 2017; Sasidharan *et al*., 2011). في كثير من الأحيان، يمكن أن يكون للنبات الطبي الواحد استخدامات متعددة، وفي بعض الأحيان يمكن استخدام أجزاء مختلفة من نفس النبات لعلاج أكثر من حالة مرضية. وفي أحيان أخرى، يمكن استخدام نفس النبات كعنصر في المستحضرات العشبية للحصول على تأثير تآزري (Boadu & Asase, 2017; Zhou *et al*., 2016).

أصبحت المستخلصات النباتية أكثر شيوعًا في الصناعات الغذائية بسبب خصائصها الوظيفية والتكلفة المنخفضة، وفي بعض الحالات، مصدر متجدد للمكونات النشطة بيولوجيًا (Mourtzinos *et al*., 2018). بالإضافة لأنها تتمتع بطعم ونكهة مركزة وعمر افتراضي أطول من النباتات الطازجة، مما يجعلها مثالية كمكونات للمنتجات (Sedlacek-Bassani *et al*., 2020).

1- 1- 4- الفاروا

تعرف حالياً بـ *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) وقد عرفت سابقاً بـ *Varroa jacobsoni* Oud. يعتبر نحل العسل الشرقي *Apis cerana* العائل الأساسي له، ثم انتقل ليتطفل على نحل العسل العالمي *Apis mellifera* (Anderson & Trueman, 2000)، وقد صنف Anderson وTrueman ستة أنماط Haplotypes تختلف بالشكل. وقد أصبح المشكلة الرئيسية في تربية النحل في جميع أنحاء العالم (Rosenkranz *et al*., 2010; Traynor *et al*., 2020). وتشير العديد من الدراسات إلى دور الفاروا الرئيسي في خسائر مستعمرات نحل العسل الغربي (Flores *et al*., 2021; Hernandez *et al*., 2022). حيث تستهلك الفاروا أولاً أنسجة الجسم الدهنية (Ramsey *et al*., 2018)، وهذا يسبب انخفاض في وزن الجسم ومستويات البروتين الاحتياطية Reserve وطول عمر اليرقات المصابة (De Jong *et al*., 1982; Amdam *et al*., 2004)، بالإضافة إلى أنه ينقل العديد من الفيروسات (Martin *et al*., 2012; Traynor *et al*., 2020; Flores *et al*., 2021) مثل فيروس الجناح المشوه واسوداد البيت الملكي (Chen & Siede, 2007).

تمر دورة حياة الفاروا بمرحلتين:

الأولى: مرحلة الحمل، حيث تتغذى إناث الفاروا على النحل البالغ (Ramsey *et al*., 2018)،

ويمكن أن يقضي الشتاء على ظهر النحلة (Boecking & Genersch, 2008)، ويفضل النحل الحاضن لأن جسمها الدهني أكبر مقارنةً بباقي أنواع النحل (Ramsey *et al*., 2018)، يتوضع على الحلقة البطنية الثالثة وعلى الجانب الأيسر للنحلة (Ramsey *et al*., 2018)، ويتوزع بمعدل

أكاروس واحد أو اثنين على ظهر النحلة في أغلب الأحيان وفي بعض الحالات يكون ثلاثة إلى أربعة (Fernandez *et al*., 1993).

الثانية: مرحلة التكاثر، حيث يتطفل على يرقات الذكور والشغالات قبل تغطية العيون السداسية، ويحدث التكاثر ضمن العيون السداسية للحضنة المختومة (Rosenkranz *et al*., 2010). ويفضل حضنة الذكور (Fuchs, 1992)، ويعود ذلك لعدة أسباب منها: الرعاية الأكثر تكرار وكثافة ليرقات الذكور من قبل النحل الحاضن (Calderone & Kuenen, 2003) ووجود نسبة أعلى من المواد الكيميائية الجاذبة للفاروا (Le Conte *et al*., 1989). ونادراً ما يوجد الفاروا ضمن البيوت الملكية (Calderone *et al*., 2002). بعد ختم عيون الحضنة واستهلاك اليرقات لبقية الغذاء، تبدأ أنثى الفاروا بالتغذية على اليرقات وتباشر بتكوين البويضات، وتقوم بوضع البيض بعد 3 أيام من تغطية الحضنة، وعادةً تبدأ بوضع بيضة ذكر (غير مخصبة) ويتبعها بيوض إناث (مخصبة) حوالي خمسة أو ستة بيضات خلال مدة 30 ساعة تقريباً. (Rosenkranz *et al*., 2010). ذكور الفاروا قصيرة العمر ولا يمكن العثور عليها إلا ضمن العيون السداسية للحضنة المختومة خلال مرحلة التكاثر، بعد فقس البيض تحتاج الإناث خلال 5.8 يوم، والذكور 6.6 يوم حتى الوصول للنضج الجنسي (Martin, 1994). تمر دورة حياة الفاروا بأربع مراحل (بيضة – حورية أولى – حورية ثانية – طور كامل) (Rosenkranz *et al*., 2010).

تكون الذكور بلون أصفر شاحب، شكلها متطاول مثلثي (De Jong *et al*., 1982)، ولها أرجل أطول من الإناث (Infantidis, 1983)، وهي أصغر بكثير من الإناث يبلغ عرضها 0.7 – 0.9 مم وطولها 0.8 – 0.9 مم (De Jong *et al*., 1982). ويبلغ عرض الإناث 1 – 1.5 مم وطولها 1.5 – 1.6 مم (Maggi *et al*., 2012)، لونها بني محمر (De Jong *et al*., 1982)، ومغطاة بشعيرات صغيرة خشنة على الظهر والبطن مما يساعدها على البقاء مرتبطة بالمضيف (Kirrane *et al*., 2012)، شكلها بيضاوي مسطح (Rosenkranz *et al*., 2010)، والأقدام مزودة بكلابات apoteles تساعدها على التمسك بالمضيف (De Ruijter & Kaas, 1983).

تم تطوير العديد من طرق المكافحة المختلفة، الكيميائية مثل مبيدات الأكاروسات Acaricides اللينة تحتوي على مكونات طبيعية مثل الأحماض العضوية والزيوت العطرية، والصلبة التي تحتوي على مكونات صناعية من مجموعة الفوسفات العضوية والبيرثرويدات Pyrethroids أو الفورماميدين formamidine، واستخدام التقانات الحيوية Biotechnical (إزالة حضنة الذكور – إزالة الحضنة بالكامل – رفع درجة الحرارة Hyperthermia وغيرها) (Rosenkranz *et al*., 2010; Roth *et al*., 2020; Jack & Ellis, 2021).

1- 1- 5- فيروس الجناح المشوه (DWV) *Deformed wing virus*

تعتبر الفيروسات من أهم وأخطر المسببات المرضية على نحل العسل (Matusiewicz *et al*., 2016)، ومن أكثرها تنوعاً وانتشاراً ويعود ذلك لقدرتها العالية على التطور والتأقلم مع عوائلها الجديدة (Bowen-Walker *et al*., 1999). وبدأ الاهتمام بالفيروسات كمسبب رئيسي لأمراض نحل العسل في الآونة الأخيرة وذلك نتيجة لخسائر كبيرة في مستعمرات نحل العسل وهذا ما أطلق عليه اسم الانهيار المفاجئ لطوائف نحل العسل Colony Collapse Disorder syndrome (CCD) (Cordoni & Spagnuolo, 2007).

الفيروسات هي طفيليات داخلية إجبارية التطفل، تتكون من حمض نووي واحد محاط بغلاف بروتيني (Adjlane & Haddad, 2017). تعتبر من مسببات الأمراض قادرة على إصابة العديد من العوائل والتضاعف داخلها (Rothenburg & Brennan, 2020)، ويعتمد نطاق المضيف على مجموعة من العوامل على المستويين الخلوي والبيئي (Maginnis, 2018).

عرفت الفيروسات لأول مرة كمسبب مرضي يصيب نحل العسل في بداية القرن الماضي (مهنا والحاج عمر، 2013). حيث اكتشف أول فيروس على نحل العسل عام 1913 (Beaurepaire *et al*., 2020). حتى الآن، تم اكتشاف 24 فيروساً يصيب النحل (Yañez *et al*., 2020)، غالبيتها لديها جينوم RNA باستثناء فيروس AmFV وفيروس AIV هما فيروسا DNA، ومعظم هذه الفيروسات تتبع رتبة Picornavirales (Chagas *et al*., 2019). من أهم وأكثر الفيروسات انتشاراً فيروس شلل النحل الحاد (ABPV)، فيروس تكيس الحضنة (SBV)، فيروس اسوداد البيت الملكي (BQCV)، فيروس الجناح المشوه (DWV) فيروس نحل كشمير (KBV) (مهنا والحاج عمر، 2013).

يمكن للفيروسات أن تصيب جميع أطوار النحلة (بيضة – يرقة – عذراء – حشرة بالغة)، وتسبب علامات سريرية مثل تشوه الأجنحة وفقدان الشعر، وبعض الاضطرابات السلوكية مثل الشلل والارتعاش (De Miranda *et al*., 2013).

تنتقل الفيروسات داخل المستعمرة عمودياً (من الملكة المصابة إلى نسلها) وأفقياً (من خلال التلامس بين النحل المصاب أو عن طريق ناقل مثل الفاروا) (Chen *et al*., 2006).

تم عزل فيروس الجناح المشوه DWV أول مرة عام 1982 على يد Legendary Bailey و Brenda Ball في مركز روثماستد للأبحاث في بريطانيا، وأطلق عليه اسم فيروس الجناح المشوه Deforming wing virus (DWV) نظراً لأهم وأبرز عرض يظهر على النحل المصاب به

(Calderon *et al*., 2003; Martin & Brettell, 2019; Bailey & Ball, 1991). ينتمي إلى عائلة Flaviridae رتبة Picornavirales (Fujiyuki *et al*., 2004; Lanzi *et al*., 2006)، وتضم هذه العائلة أربعة أجناس وهي تسبب أمراض للفقاريات واللافقاريات، وللإنسان أيضاً مثل حمى الدنجك وحمى غرب النيل والتهاب الكبد C (Shi *et al*., 2016a). يتبع الفيروس الجنس Flavirus وهو فيروس أحادي الطبقة (Lanzi *et al*., 2006).

الشكل العام للفيروس كروي أو يميل إلى البيضوي، جسيماته متناظرة أو متعددة الأوجه يحتوي على حمض نووي مفرد (+ssRNA) داخل كبسولة بروتينية يتراوح قطرها بين 17 – 30 نانو متر (Chen & Siede, 2007)، ومحاط بغلاف من ثلاثة بروتينات أساسية هي Vp1 – Vp2 – Vp3 (Lanzi *et al*., 2006)، يتكون الجينوم من إطار قراءة مفتوح واحد (Ongus *et al*., 2004)، يبلغ وزنه 10 KB (Matusiewicz *et al*., 2016)، يتشابه في تتابع القواعد الآزوتية مع فيروس كاكاجو Kakugo virus (KV) وفيروس الفاروا المدمر1 Varroa destructor virus1 (VDV-1) (Fujiyuki *et al*., 2004).

يصيب الفيروس الشغالات والذكور والملكة بالإضافة إلى اليرقات والعذارى التي قد لا تظهر عليها أعراض واضحة في أحيان كثيرة (De Miranda *et al*., 2013; Yanez *et al*., 2012)، تعد الشغالات هي الأكثر حساسية لهذا المرض (Lanzi *et al*., 2006) حيث بلغت نسبة إصابة الشغالات 100%، العذارى 95% واليرقات 47% (Smith *et al*., 2013). ويصاب طور العذراء في مرحلة العيون البيضاء، مما يؤدي إلى موتها أو إحداث تشوه الأجنحة (Berényi *et al*., 2007).

يسبب الفيروس تجعد الأجنحة، قصر في البطن، شلل أو عدم القدرة على الطيران، قصر العمر الافتراضي (Beaurepaire *et al*., 2020; Haddad *et al*., 2017)، انخفاض الاستجابة للتغذية، ضعف التعلم، وعدم الميل للسروح (Beaurepaire *et al*., 2020; Highfield *et al*., 2009)، ونقص كبير في عدد الشغالات والحضنة (Budge *et al*., 2015)، وتخرج الشغالات من العيون السداسية مشوهة الأجنحة وغالباً ما تموت بسرعة (Martin & Brettell, 2019)، ويعزى هذا العرض على الأجنحة إلى إصابة براعم الأجنحة بالفيروس في الطور اليرقي (Oldroyd, 1999).

تزداد نسبة إصابة النحل بالفيروس عند التعرض للمبيدات النيكوتينية Clothianidin و Impidacloprid (Di Prisco *et al*., 2013)، كما أن إصابة الطوائف بالنوزيما تزيد من خطورة الفيروس عليها (Martin & Brettell, 2019)، ويعتبر الفاروا الناقل الأساسي والرئيسي للفيروس (Tentcheva *et al*., 2006) وتزداد شدة الإصابة مع ازدياد أعداد الفاروا داخل الخلية (Bowen-Walker *et al*., 1999).

في سورية، أجريت منذ عام 2009 وحتى تاريخه العديد من الزيارات الحقلية والتي شملت ما يزيد عن 410 منحلاً منتشرة في محافظات سورية عدة بهدف الكشف عن فيروسات النحل المنتشرة (مهنا وزملاؤه، 2023). ينتشر الفيروس في سورية في ثماني محافظات (دمشق وريفها، السويداء، القنيطرة، حمص، حماة، طرطوس واللاذقية (برهوم وزملاؤه، 2017).

لوحظ في العامين 2022 و2023 تغير واضح في الظروف المناخية ترافق وبشكل واضح على انتشار فيروس DWV خلال فصول السنة إذ وصل أوجه مع بداية فصل الصيف على عكس دراسات سابقة التي أظهرت أن أعلى نسبة لانتشار الفيروس كانت خلال فصل الخريف وفي كثير من الحالات ترافق مع انتشار كثيف لطفيل الفاروا (مهنا وزملاؤه، 2023).

وجد مهنا (2023) أن لبعض المستخلصات النباتية القدرة على تحفيز تخليق الببتيدات المضادة للميكروبات ضمن السائل اللمفاوي لشغالة نحل العسل مثل زيت نبات الشيح وتسهم هذه الببتيدات في تحفيز الجهاز المناعي والدفاعي الطبيعي (الفطري) لنحل العسل.

2- الفصل الثاني

2- 1- مواد وطرائق العمل

نُفذت الدراسة في مخابر قسم وقاية النبات – كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق، ومخابر قسم التنوع الحيوي والمكافحة الحيوية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق

2- 1- 1- التجهيزات المخبرية والمواد

استخدمت العديد من التجهيزات والمواد الخاصة بالعمل المخبري

- ميكروبيبيت يدوية Manual micropipettes سعة (مايكرو ليتر microliter) 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl (Eppendorf®)
- جهاز الرحلان الكهربائي Electrophoresis نوع GeNeiTM
- مجمدة Freezer: 30- (Hilife) و 80- (OPERON®)
- مثفلة Centrifuge دون تبريد Hittich® Mikro20، بتبريد Biofuge® Primo R
- جهاز طحن نوع Qiagen® TissueLyser LT
- موثق هلامة (التصوير باستخدام الأشعة فوق البنفسجية) Gel Documentation
- مقياس الطيف الضوئي UV-Spectrophotometer نوع Hittich® U2900

2- 1- 2- المواد الكيميائية

- مؤشر معياري للبروتينات (5– 245 kDa) BlueElf Prestained Protein Marker من شركة Jena Bioscience.
- صبغة G-250
- غليسيرول Glycerol
- تيميد TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenlenediamine)
- كاشف فولن Folin-Ciocalteau
- كربونات الصوديوم Na_2CO_3
- ميتانول
- حمض الغاليك Gallic acid

- خلات الرصاص

2- 1- 3- البادئات Primers

استخدمت البادئات التالية للكشف عن فيروس الجناح المشوه DWV الواردة في (جدول 1):

جدول1. التتابع النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الكشف عن فيروس DWV في شغالات النحل.

الفيروس	التتابع النكليوتيدي من '5 إلى '3	الوزن الجزيئيbp
DWV	CTTACTCTGCCGTCGCCCA CCGTTAGGAACTCATTATCGCG	194
DWV	TTTGCAAGATGCTGTATGTGG GTCGTGCAGCTCGATAGGAT	395

2- 2- طرائق البحث

2- 2- 1- جمع العينات النباتية

تم الحصول على عينات نبات الصبغة *Phytolacca americana* L. من مناطق انتشارها في ريف مدينة حمص خلال شهر تشرين الثاني لعام 2020.

2- 2- 2- تحضير المستخلص المائي

لتحضير المستخلص المائي من كل جزء من أجزاء النبات، فصلت الأجزاء النباتية ثمار – أوراق – جذور – أغصان كل على حده، اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Harborne (1984) مع إجراء بعض التعديلات وفق الخطوات التالية:

1. طحن الأجزاء النباتية كلٌ على حدا باستخدام جهاز الطحن، لمدة 5 دقائق على سرعة 30 دورة/ثانية.
2. وزن 50 غ من كل جزء نباتي مطحون وأضيف إليها 250 مل ماء مقطر معقم مع التحريك الجيد.
3. وضع المحلول ضمن جهاز الهزاز الأفقي (Horizontal shaker) لمدة 24 ساعة، على سرعة 120 دورة/دقيقة.

4. فُرغ المحلول في أنابيب ووضع في المثفلة على 8130 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق.
5. رشح المحلول باستخدام ورق ترشيح Whatman No.1 للتخلص من أي بقايا للراسب.
6. فلترة المستخلص باستخدام فلاتر بكتيرية
7. وضع المستخلص في أنابيب محكمة الإغلاق، وحفظت في المجمدة عند درجة حرارة -20 °س الى حين الأستخدام.

2- 2- 3- الكشف عن بعض المركبات الكيميائية

2- 2- 3- 1- الفينولات

تقدير الفينولات الكلية Total phenols content (TPC) باتباع طريقة AOAC SMPR 2015.009 باستخدام كاشف فولن Folin-Ciocalteau وفق الخطوات التالية:

وزن 2 مل من المستخلص لكل جزء نباتي (ثمار – أوراق – جذور – أغصان)، خُفف بإضافة الماء المقطر المعقم بنسبة 1:10، وأضيف 20 مل من ميتانول وحرك باستخدام المغناطيس لمدة 15 دقيقة.

رشح المحلول وأخذ منه 1 مل إلى أنبوب اختبار وأضيف إليه 5 مل من كاشف فولن -Folin Ciocalteau الممدد بنسبة 1:10 وترك لمدة 5 دقائق.

أضيف 4 مل من كربونات الصوديوم Na2CO3 (المحضرة بإضافة 5.3غ إلى 50 مل ماء مقطر معقم) بتركيز 1 مول، وترك في الظلام لمدة 15 دقيقة.

قرأت الامتصاصية على جهاز المطياف اللوني المرئي (السبيكتروفوتومتر) على طول الموجة nm765 .

كشاهد: حُضر حمض الغاليك Gallic acid كمحلول مرجعي، من خلال تحضير محاليل من الميتانول ويضاف لها كاشف فولن Folin-Ciocalteau وكربونات الصوديوم Na2CO3، وتوضع في الظلام بنفس الطريقة.

قراءة أطوال الموجات للمستخلصات والشاهد واسقاطها على المنحني القياسي لحمض الغاليك وحساب كمية الفينولات وفق المعادلة التالية:

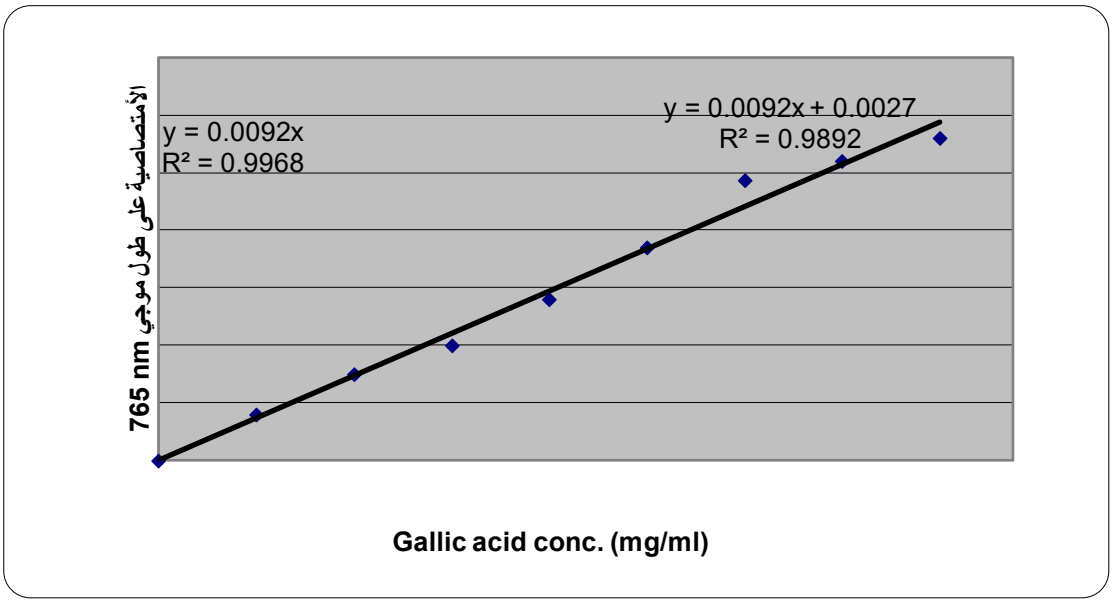
$$y = \frac{C * V}{W} * 10^{-1}$$

Y= كمية الفينولات مقدرة بـ ملغ/100غ

C = تركيز المستخلص من الإسقاط على المنحنى المعياري

V = حجم المستخلص مقدراً بـ مل

W = وزن العينة المأخوذة بـ غ



شكل2: المنحني القياسي لحمض الغاليك Gallic acid

2- 2- 3- 2- التانينات

اتبعت طريقة Sun وزملائه (1998) وفق الخطوات التالية:

1. وزن 10 مل من المستخلص لكل جزء نباتي (ثمار – أوراق – جذور – أغصان)، أضيف إليها 10 مل من خلات الرصاص (المحضرة بإضافة 10 غ من خلات الرصاص إلى 90 مل ماء مقطر معقم) وتحريكها بمغناطيس لمدة 15 دقيقة.
2. سخن المزيج لمدة 10 دقائق ورشح باستخدام ورق الترشيح Whatman No.1 ووضع في المجففة لمدة 30 دقيقة حتى يجف تماماً.
3. وزن ورق الترشيح قبل الاستعمال وبعد خروجها من المجففة. وحساب كمية التانينات وفق المعادلة التالية:

$$\% \text{ تانينات} = \frac{\text{وزن المتبقي من الراسب قبل التجفيف} - \text{وزن المتبقي من الراسب بعد التجفيف}}{\text{وزن النموذج}} \times 100$$

2- 2- 3- 3- السابونينات

اتبعت طريقة Edeoga وزملائه (2005) في الكشف عن السابونينات وفق التالي:

أُخذ 1 ml من المستخلص وخفف بالماء المقطر بنسبة 1:10 ثم سخن على درجة حرارة 100 ºس لمدة 10 دقائق مع التحريك.

للتاكد من وجود السابونينات يجب أن يتشكل عمود من الرغوة يصل ارتفاعه إلى 10 سم ويبقى ثابتاً لمدة 10 دقائق على الأقل.

2- 2- 4- جمع عينات نحل العسل

جمع عينات من نحل العسل خلال الفترة الواقعة بين آذار وأيلول من الأعوام 2021 و 2023 من منحل كلية الزراعة – جامعة دمشق. جمعت العينات اعتماداً على:

1. عينات من نحل العسل سليمة لا يظهر عليها أي أعراض إصابة بالأمراض أو الفاروا.
2. عينات من نحل العسل مصابة بطفيل الفاروا حيث احضرت للاستخدام الفوري.
3. عينات من نحل العسل تظهر عليها الأعراض التالية: عدم القدرة على الطيران، تشوه في الأجنحة، ارتجاف الشغالة، الاسوداد، الصلع، نحل زاحف ونافق أمام باب الخلية. وضعت ضمن أنابيب سعة 15 ml محكمة الإغلاق وغمرت مباشرة بالآزوت السائل وبعد وصولها للمخبر حفظت على الدرجة -70 ºس لحين الاستعمال.

2- 2- 5- تأثير المستخلصات في طول فترة حياة شغالة نحل العسل

جمعت شغالات نحل العسل من منحل كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق، وضعت في أطباق (قطر 15 سم وارتفاع 10 سم)، مع مراعاة صنع ثقوب من الأعلى لضمان تنفس الحشرات، وتحوي على أطباق بتري صغيرة (قطر 5 سم) وضع فيها محلول سكري للتغذية. حضر ثلاثة تراكيز من كل مستخلص من الأجزاء النباتية (10، 50، 100 ppm). وطبق كل تركيز على عينة من شغالات نحل العسل بشكل منفصل وبنفس الشروط والخطوات. حضرت 3 مكررات لكل تركيز، ولكل جزء نباتي، وللشاهد غير معامل، في كل مكرر 25 نحلة، بمجموع 26 معاملة بما فيها معاملات الشاهد، و78 مكرر وتمت مراقبة نشاط النحل وتسجيل القراءات يومياً حتى 15 يوم (Ebert et al., 2007). أجري الاختبار بطريقتين:

1- إضافة المستخلص إلى المحلول السكري المحضر لتغذية النحل، أما الشاهد فتغذى على المحلول السكري فقط.

2- رش الشغالات بالمستخلص بشكل عشوائي، ورش الشاهد بالماء المقطر.

تم حساب مقدار الزيادة في عمر الشغالات كنسبة مئوية من خلال حساب النسبة المئوية للموت وفق معادلة Abbott (1925) المصححة ونطرح الناتج من 100.

$$\text{النسبة المئوية للموت المصححة} = \frac{\%\text{ للموت في المعاملة} - \%\text{ للموت في الشاهد}}{\%\text{ للموت في الشاهد}} \text{X } 100$$

2- 2- 6- تأثير مستخلص نبات الصبغة على طفيل الفاروا

قسمت حشرات النحل المصابة بالفاروا الى مجموعتين تبعاً للمعاملة الشاهد والرش بمستخلص الأوراق وكل معاملة تضمنت ثلاثة مكررات وكل مكرر تضمن 15 شغالة مصابة بشدة بالفاروا بمعدل 2-3 على الشغالة الواحدة، والتي وضعت في أطباق (قطر 15 سم وارتفاع 10 سم) مثقبة من الأعلى لضمان تنفس الحشرات ويحتوي كل طبق على طبق أخر صغير الحجم والقطر (قطر 5 سم) حيث وضع فيها محلول سكري للتغذية.

أجريت التجربة ضمن ظروف المخبر (رطوبة نسبية 18-37%، حرارة 17-25 °س) (Ebert et al., 2007) وفق الخطوات التالية:

1. لدراسة معدل السقوط الطبيعي للفاروا وضعت الأطباق في المخبر و دون معاملة لمدة ثلاثة أيام، وتسجيل عدد الفاروا المتساقطة بشكل طبيعي.
2. في اليوم الرابع، أجريت المعاملة برش الشغالات بمستخلص أوراق نبات الصبغة بتركيز 100 ppm. ورش الشاهد بالماء المقطر.

تمت مراقبة العينات وتسجيل عدد الفاروا المتساقطة بعد ساعة من المعاملة وبعد 24 و 48 و 72 ساعة.

حساب متوسط عدد الفاروا المتساقطة خلال الأيام الثلاثة وتم استخدام المعادلات التالية لحساب فاعلية مادة المكافحة (Asha *et al.*, 2014)

$$\text{الفاعلية النسبية \%} = \frac{\text{ددع اورافلا ةطقاستملا دعب 24 ةعاس نم ةلماعملا} - \text{طسوتم طقاستلا يعيبطلا لبق ةلماعملا}}{\text{ددع اورافلا ةطقاستملا دعب 24 ةعاس نم ةلماعملا}} \times 100$$

معدل موت الفاروا% (Calderone & Lin, 2003)

$$\text{معدل موت الفاروا \%} = \frac{\text{ددع اورافلا ةطقاستملا دعب 24 ةعاس نم ةلماعملا} - \text{طسوتم طقاستلا يعيبطلا لبق ةلماعملا}}{\text{ددع اورافلا ةطقاستملا دعب 24 ةعاس نم ةلماعملا} + \text{طسوتم طقاستلا يعيبطلا لبق ةلماعملا}} \times 100$$

النسبة بين التساقط بعد وقبل التطبيق (ضعف). وهي عدد أضعاف الفاروا المتساقطة بعد 24 ساعة من المعاملة مقارنةً بمتوسط التساقط الطبيعي قبل المعاملة، وفق المعادلة التالية:

$$\text{النسبة بين التساقط الطبيعي بعد و قبل التطبيق} = \frac{\text{عدد الفاروا المتساقطة بعد 24 ساعة من المعاملة}}{\text{متوسط التساقط الطبيعي قبل المعاملة}}$$

$$\text{الفاعلية الحقيقية للمستخلص مقارنة الشاهد \%} = \frac{\text{متوسط فعالية المستخلص} - \text{متوسط فعالية الشاهد}}{\text{متوسط فعالية المستخلص}} \times 100$$

2- 2- 7- دور مستخلص نبات الصبغة في تحريض الجهاز المناعي لنحل العسل

2- 2- 7- 1- اختبار العينات للحصول على عينة نقية مصابة بفيروس DWV فقط

جمعت عينات نحل من مناحل قريبة من محيط كلية الهندسة الزراعية بجامعة دمشق ومن مناحل أخرى من محافظة اللاذقيه، وأجري اختبار RT-PCR للتأكد من إصابتها بفيروس DWV فقط دون أي فيروسات أخرى وباستخدام البادئات الواردة في (الجدول 1).

2- 2- 7- 2- اختبار RT-PCR

2- 2- 7- 2- 1- استخلاص الحمض النووي الفيروسي RNA من نحل العسل

طحنت الشغالات المجموعة والتي تظهر عليها أعراض الإصابة بفيروس DWV وطحنت باستخدام الهاون والآزوت السائل، ثم أضيف 1 ml من محلول المنظم الفوسفاتي Phosphate-buffered Saline (PBS) (137 mM NaCL, 2.7 mM KCL, 10 mM Na_2PO_4, 1.8 mM KH_2PO_4). أجريت عملية تثفيل على السرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، وأخذ 140 µl من الرائق العلوي واستخلص منها RNA باستخدام طقم أدوات QIAamp® Viral RNA Mini Kit (No. 52904) المصنع من قبل شركة Qiagen وفق الخطوات الموصى بها:

1. في أنبوب أبندورف سعة 1.5 ml، وضع 560 µl من محلول (AVL + carRNA).

2. أضيف 140 µl من الرائق العلوي لعينة الحشرات المطحونة، ومزجها جيداً بواسطة الرج Vortexلمدة 15 ثانية.
3. حضنت العينة على درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق، لاكتمال تحلل الجسيمات الفيروسة.
4. وضعت في المثفلة على سرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق لإزالة العوالق من داخل الغطاء. ونقل الرائق العلوي إلى أنبوب أبندورف نظيف سعة 1.5 ml.
5. إضافة 560 µl إيثانول (96 - 100%) إلى العينة، ومزجها بواسطة الرج Vortexلمدة 15 ثانية، وتثفيلها لبضع دقائق لإزالة القطرات العالقة في الغطاء.
6. أخذ 630 µl من المحلول في الخطوة السابقة وأضيف إلى عمود QIAamp Mini في أنبوبة فلترة spintube سعة 2 ml، وإجراء عملية تثفيل على سرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة.
7. إضافة 500 µl من محلول الغسل AW1 وإجراء التثفيل على سرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة.
8. إضافة 500 µl من محلول AW2 لإعادة الغسل وإجراء التثفيل على سرعة 14000 دورة/ دقيقة لمدة ثلاث دقائق.
9. إعادة التثفيل على سرعة 14000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة للتخلص من بقايا محلول الغسل AW2.
10. وضع أنبوبة الفلترة في أنبوب أبندورف نظيف سعة 1.5 ml، وأضيف 60 µl من محلول AVE. ترك الأنبوب لمدة دقيقة واحدة في جو الغرفة ثم وإجراء التثفيل على سرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة.
11. خزن الحمض النووي الفيروسي على درجة -20، -80 ºس لحين الاستخدام.

2- 2- 7- 2- 2- النسخ العكسي وإنتاج الحمض النووي التكميلي cDNA

استخدم لذلك طقم أدوات من شركة 2-steps RT-PCR (RTPL12) المصنع من شركة Vivantis وفق الخطوات التالية:

1- حضر مزيج (جدول 2) في أنبوب أبندورف سعة 0.2 ml وحضن على درجة حرارة 65 ºس لمدة 5 دقائق ومن ثم وضع في الجليد لمدة دقيقتان

جدول2. مكونات مزيج المرحلة الأولى من عملية النسخ العكسي

	المكونات	الحجم بـ µl
قالب	Template RNA	**3**
البادئ	Oligo d(T) 18-Primer	**1**
المحلول	dNTPs Mix	**1**
	Nuclease-free Water	**5**
الحجم النهائي		**10**

2- حضر مزيج ثاني (جدول 3) وإضافته للمزيج الأول ومزجهما بشكل جيد وحضن على درجة حرارة 42 ºس لمدة ساعة ومن ثم على درجة حرارة 85 ºس لمدة خمس دقائق

جدول3. مكونات مزيج المرحلة الثانية من عملية النسخ العكسي

	المكونات	الحجم بـ µl
محلول	10X Buffer M-MuLV	**2**
أنزيم	M-MuLV Reverse Transcriptase	**2**
	Nuclease-free Water	**6**
الحجم النهائي		**10**

خزن الحمض النووي التكميلي cDNA على درجة حرارة -20 ºس لحين الاستخدام.

2-2- 7- 2- 3- تفاعل البلمرة التسلسلي PCR

أجري تفاعل البلمرة التسلسلي في حجم نهائي قدره 25 µl باستخدام مزيج من مواد التفاعل GoTaq® Green Master Mix من إنتاج شركة Promega. يوضح (جدول 4) مكونات التفاعل في الكشف عن فيروسات النحل

جدول4. مكونات تفاعل البلمرة التسلسلي في الكشف عن فيروسات النحل

	المكونات	الحجم بـ µl
مواد التفاعل	Master Mix	12.5

البادئ الأمامي	µmol/µl 10 For. Primer	2
البادئ الخلفي	µmol/µl 10 Rev. Primer	2
الحمض النووي التكميلي	cDNA	2
	Nuclease-free Water	6.5
الحجم النهائي		**25**

وضعت العينات في جهاز المدور الحراري وفق المراحل التالية (جدول 5):

جدول5: برنامج المدور الحراري بالكشف عن فيروسات النحل

المرحلة	عدد الدورات	المدة	الحرارة °س	
الأولى	1	45 دقيقة	45	**للنسخ العكسي Reverse Transcription**
الثانية	1	2 دقيقة	94	**لتخريب أنزيم النسخ العكسي والتخلص من شظايا الـ RNA المتبقية**
الثالثة	40			
		30 ثانية	94	**لفصل سلسلتي الـ DNA**
		45 ثانية	55	**لالتحام زوجي البادئات**
		1 دقيقة	68	**للاستطالة**
الرابعة		8 دقائق	68	**للاستطالة النهائية**

رُحل حوالي 5 µl من نواتج تفاعل البلمرة التسلسلي PCR على هلامة الآغاروز 1.5%، ووثقت النتائج بتصوير هلامة الآغاروز باستخدام الأشعة فوق البنفسجية للتأكد من وجود أو عدم وجود إصابة فيروسية لنحل العسل.

2-2- 7- 2- 4- تحضير هلامة الآغاروز

حضرت هلامة الآغاروز بتركيز 1.5% وفق الخطوات التالية:

1. أضيف 3 غ آغاروز إلى 200 مل محلول منظم 1X TBE buffer (10.8 g Tris, 5.5 g (Boric acid, 4ml/0.5M EDTA (pH 8), In 1000 ml distilled water
2. سُخن المزيج مدة 2-4 دقائق حتى الغليان داخل الميكرويف، ثم تركه ليبرد حتى الدرجة 50 ºس على درجة حرارة المخبر.
3. أضيف للمحلول 16 µl بروميد الإيثيديوم (0.5 µg/ml) ومزجها جيداً، ثم سكبه ضمن قالب جهاز الترحيل بهدوء والمجهز مسبقاً بإغلاقة من الطرفين بواسطة لاصق ورقي ووضع المشط المناسب لتشكيل الآبار.
4. أزيل المشط بعد تصلب المزيج، ونقلت الهلامة مع القالب إلى حوض جهاز الرحلان الكهربائي بعد ملئه بالمحلول المنظم 1X TBE
5. بعد الترحيل لمدة مناسبة، توثيق نتائج الترحيل على الهلامة، وتصويرها عند طول موجة 302 نانومتر

2-2- 7- 3- تحضير المعلق الفيروسي

حضر المعلق الفيروسي من شغالات تظهر عليها أعراض الإصابة بفيروس DWV وفق الخطوات التالية:

1. طحن خمس شغالات بالآزوت السائل، ضمن جفنة خزفية
2. نقلت إلى أنابيب اختبار ثم أضيف لها 20 مل من الماء المقطر المعقم
3. ثفلت بسرعة 5000 دورة/د لمدة ثلاث دقائق للتخلص من الأجزاء والرواسب الكبيرة، ثم أخذ الرائق ووضع في أنابيب اختبار جديدة وحفظت عند درجة حرارة -70ºس.

2- 2- 7- 4- تحفيز والكشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات AMP

أجريت معاملة الشغالات بالمستخلص النباتي الذي أعطى أعلى نسبة حياة باختبار تأثير المستخلصات على طول فترة حياة شغالة نحل العسل فقط ومن ثم العدوى بالمعلق الفيروسي حيث وضعت عينات النحل (كل عينة 15 شغالة) في أطباق مثقبة للتنفس وتحوي مايلي:

1- أطباق حاوية على محلول سكري (1:1 سكروز: ماء) للتغذية.
2- أطباق حاوية على محلول سكري (1:1 سكروز: ماء) للتغذية مع المستخلص النباتي
3- أطباق حاوية على محلول سكري (1:1 سكروز: ماء) للتغذية مع المعلق الفيروسي

4- أطباق حاوية على محلول سكري (1:1 سكروز: ماء) للتغذية مع المستخلص النباتي بعد 24 ساعة اضيف لأطباق التغذية محلول سكري يحتوي على 5 ml من المعلق الفيروسي.

أجريت التجربة ضمن ظروف المختبر (رطوبة نسبية 18-37%، حرارة 17-25 ºس) (Ebert *et al*., 2007).

أجري الكشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات وفق الخطوات التالية

2- 2- 7- 4- 1- جمع السائل اللمفاوي لشغالات نحل العسل:

جمع السائل اللمفاوي لشغالات النحل بفترات 2-4-8-12-16-24 ساعة من المعاملة تبعاً لطريقة (Lin *et al*., 2004) وفق الخطوات التالية:

1. إجراء جرح طفيف في منطقة البطن للشغالة بواسطة إبرة معقمة
2. سحب السائل اللمفاوي باستخدام الماصة بمعدل 10-5 ميكرولتر/الشغالة
3. نقل السائل مباشرة إلى أنبوب ابندورف (0.5 مل) يحتوي على واحد ميكرولتر من مادتي PTU (P-7629) وAprotinin (A-4529) بتركيز 0.1 ميللي غرام/مل، اللذان يمنعان عملية التصبغ أو التحول إلى "الميلانين" Melanization،
4. حفظ العينات عند حرارة -20°س.

2- 2- 7- 4- 2- الكشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات ضمن السائل اللمفاوي لشغالات نحل العسل

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Haider وزملاؤه (2012) في الكشف عن الببتيدات، وفق الخطوات التالية:

1. حل عينة السائل اللمفاوي بمحلول 100 mM Tris-HCl،pH 6.8 يحتوي على 4% SDS، 17% glycerol، و0.8 M من 2-mercaptoethanol
2. سخنت لمدة ثلاث دقائق عند حرارة 95 ºس، وثفلت لعدة ثواني لتصبح جاهزة للحقن ضمن هلامة البولي أكرلامايد

2- 2- 7- 4- 3- تحضير هلامة البولي أكرلامايد

2- 2- 7- 4- 3- 1- المحاليل المستخدمة

حُضّرت جميع المحاليل باستخدام الماء المقطر وفق التالي:

1- محلول الجل Gel buffer 3M Tris-HCl pH 8.45, 0.3% SDS

-2	محلول	AB	30% (وزن/حجم) من مادتي Bisacrylamide/Acrylamide
-3	محلول الرحلان	Running buffer	25 mM Tris, 25 mM tricine, 0.05% (w/v) SDS
-4	محلول	A	10% Ammonium persulphate (APS)
-5	محلول التثبيت	Fixing solution	10% حمض الأندول الثلجي، 100 mM أسيتات الأمونيوم ammonium acetate.
-6	محلول الصبغ	Staining solution	0.03 غرام من أزرق الكوماسي G-250 المذاب في 100 ميلي ماء مقطر يحوي 10% من حمض الاندول الثلجي.

2- 2- 7- 4- 3- 2- هلامة الفصل 12% Separation gel

حضرت مكونات هلامة الفصل كما هو مبين في الجدول (6) وفق الخطوات التالية:

1- مزجت المكونات بشكل جيد وسكبت مباشرة ضمن الفراغ المكون بين لوحي زجاج قالب الهلامة بحيث تبقى المسافة بين هلامة الفصل وأسفل أسنان المشط 1 سم.

2- أضيف 1 مل من كحول الإيزوبروبانول النقي لمنح الهلامة سطح مستوي.

3- تركت الهلامة لمدة 20 دقيقة لكي تتصلب.

4- التخلص من كحول الأيزوبروبانول عن طريق إمالة لوحي الزجاج ومن ثم تنشيفهما جيداً بورق ترشيح تمهيداً لسكب هلامة التجميع.

2- 2- 7- 4- 3- 3- هلامة التجميع 4% Stacking gel

أتبعت نفس الخطوات السابقة ولكن مع اختلاف في المكونات كما هو مبين في الجدول (6). سكب مزيج المكونات فوق هلامة الفصل، ووضع المشط الخاص بالعينات، وتركت لمدة 20 دقيقة لكي تتصلب.

جدول (6). مكونات هلامتي التجميع والفصل للبولي أكرلامايد.

المكونات	هلامة الفصل 12%	هلامة التجميع 4%
محلول AB	2 ml	0.33 ml
محلول الجل	1.67 ml	0.6 ml
غليسيرول	0.4 ml	-
محلول A	25 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

ماء مقطر	0.9 ml	1.54 ml
الحجم النهائي	**~ 5 ml**	**~ 2.5 ml**

2- 2- 7- 4- 3- 4- عملية الفصل بالرحلان الكهربائي

استخدم جهاز Mini gel من شركة Bio-Rad، أجري الرحلان تحت جهد كهربائي 120 فولت لمدة ثلاث ساعات.

2- 2- 7- 4- 3- 5- حقن العينات

بلغ حجم العينة الكلي 7.5 µl (5 µl من السائل اللمفاوي لشغالة النحل: 2.5 µl من محلول العينة). وضعت الهلامة ضمن جهاز الترحيل وغمرت بمحلول الترحيل، ومن ثم أزيل المشط لتملأ الآبار الناتجة بمحلول الترحيل. حقن 7 µl من كل عينة و4 µl من المؤشر الجزيئي البروتيني BlueElf Prestained Protein Marker (5– 245 kDa) من شركة Jena Bioscience

2- 2- 7- 4- 3- 6- تثبيت وصبغ الهلامة والتصوير

بعد الانتهاء من عملية الترحيل، غسل اللوحين الزجاجين بالماء المقطر، وفُصلا بلطف بحث بقيت الهلامة سليمة، واتبعت الخطوات التالية:

1. وضعت الهلامة في محلول التثبيت على جهاز الرجاج الأفقي لمدة 25 دقيقة.
2. نقلت بعدها إلى محلول الصبغ على جهاز الرجاج الأفقي لليوم التالي.
3. أزيلت الصبغة باستخدام محلول إزالة الصبغة لمدة 20 دقيقة على جهاز الرجاج الأفقي. وضعت قطعة من ورق النشاف على جانب الوعاء وملامس لمحلول إزالة الصبغة وذلك للتخلص من الصبغة قدر الإمكان.
4. وثقت الهلامة على لوح فايبر بلاس أبيض اللون مزود بإضاءة خلفية واستخدمت كاميرا نوع سوني بدقة 16.2 ميغابكسل Sony DSC-WX7 16.2MP.
5. خزنت الهلامة ضمن محلول 5% غليسرول على درجة حرارة 4°س.

2- 3- التحليل الإحصائي

استخدم برنامج Addinsoft-XLSTAT 2015 لإجراء اختبار one Way ANOVA لدراسة النسبة المئوية للحياة عند مستوى ثقة 5%.

3- الفصل الثالث

3- 1- النتائج

3- 1- 1- الكشف عن بعض المركبات الكيميائية

أجري التحليل الكيميائي لمستخلصات الأجزاء النباتية المختلفة (ثمار – جذور – أوراق – أغصان) لنبات الصبغة الأمريكية لتقدير كمية الفينولات الكلية وكمية التانينات والكشف عن السابونين

3- 1- 1- 1- الفينولات:

قدرت كمية الفينولات الكلية بعد قراءة أطوال الموجات لمستخلصات الأجزاء النباتية والشاهد واسقاطها على المنحني القياسي لحمض الغاليك وحساب كمية الفينولات وفق المعادلة كما هو وارد في الموارد وطرائق العمل (جدول 7).

جدول7. كمية الفينولات الكلية (ملغ/غ) في مستخلص الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية

المستخلص	الثمار	الجذور	الأوراق	الأغصان
كمية الفينولات مقدرة بـ ملغ/غ	6.5	12.4	12.8	7.9

تمثل النتائج التقدير الكمي للفينولات بـ ملغ المكافئ لحمض الغاليك لكل غرام واحد من وزن المستخلص، ولوحظ احتواء مستخلص جميع الأجزاء النباتية على الفينولات بنسب متفاوتة. أظهرت النتائج احتواء مستخلص الأوراق على أعلى تركيز من الفينولات وبلغت 12.8 ملغ/غ يليه مستخلص الجذور حيث بلغت 12.4 ملغ/غ، وأقل تركيز كان في مستخلص الثمار حيث بلغت 6.5 ملغ/غ.

3- 1- 1- 2- التانينات

قدرت كمية التانينات على أساس الوزن الجاف وفق المعادلة الواردة في المواد وطرائق العمل (جدول 8).

جدول8. كمية التانينات الكلية (ملغ/غ) في مستخلص الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية

المستخلص	الثمار	الجذور	الأوراق	الأغصان
كمية الفينولات مقدرة بـ ملغ/غ	6.45	6.20	7.92	5.6

بينت نتائج التحليل الكيميائي لمستخلصات الأجزاء النباتية، احتواء مستخلص جميع أجزاء النبات على التانينات بنسب متقاربة. ولوحظ أن مستخلص الأوراق يحوي على أعلى تركيز من التانينات وبلغت 7.92ملغ/غ وأقل تركيز كان في مستخلص الأغصان حيث بلغت 5.6 ملغ/غ.

3- 1- 1- 3- السابونينات

استخدمت طريقة تشكل عمود من الرغوة وبقائه ثابتاً لمدة 10 دقائق، وبينت النتائج وجود السابونينات في جميع الأجزاء النباتية.

شكل3: تشكل الرغوة في اختبار السابونين في مستخلص ثمار نبات الصبغة الأمريكية

3- 1- 2- تأثير المستخلصات على طول فترة حياة شغالة نحل العسل

أجري اختبار تأثير مستخلص الأجزاء النباتية على عينات من شغالات نحل العسل، وتم اختبار ثلاثة تراكيز (10، 50، 100) ppm من كل جزء. أجري الاختبار بطريقتين التغذية والرش (2- 2- 5).

تمت مراقبة نشاط النحل وتسجيل القراءات يومياً لمدة 14 يوماً، وأخذ المتوسطات بعد 7 أيام من المعاملة (جدول 9، 10).

جدول9. متوسط عدد الحشرات التي بقيت على قيد الحياة في تجربة إضافة المستخلص للغذاء

الجزء النباتي	التركيز	متوسط عدد الشغالات التي بقيت حية بعد 7 أيام من المعاملة
أوراق	10	16.3
	50	16.7

	100	19
جذور	10	14
	50	18.7
	100	17.7
أغصان	10	13.3
	50	15
	100	16.7
ثمار	10	14.7
	50	15
	100	14.7
شاهد	**-**	**11.7**

جدول10. متوسط عدد الحشرات التي بقيت على قيد الحياة في تجربة رش النحل بالمستخلص

الجزء النباتي	**التركيز**	**متوسط عدد الشغالات التي بقيت حية بعد 7 أيام من المعاملة**
أوراق	10	19
	50	17.7
	100	15
جذور	10	17.4
	50	18
	100	13
أغصان	10	17.4
	50	17
	100	14.4
ثمار	10	18.7
	50	14.4
	100	15
شاهد	**-**	**11**

شكل4: معاملات النحل بالتراكيز المختلفة لمستخلصات الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية (a: شغالات نحل العسل تتغذى على المحلول السكري الذي يحوي على مستخلص نبات الصبغة، b: مكررات معاملة شغالات نحل العسل بمستخلص الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الصبغة الأمريكية)

3- 1- 2- 1- تأثير طريقة استخدام مستخلص نبات الصبغة الأميركية (الرش والتغذية) في طول فترة حياة شغالة نحل العسل

بعد سبعة أيام من المعاملة لشغالات نحل العسل وعند مقارنة طريقتي المعاملة بالرش والتغذية وبمختلف الأجزاء النباتية ومختلف التراكيز المستخدمة (10، 50 و100 ppm) تبين أنه لا يوجد اية فروق معنوية بين الطريقتين من حيث فترة بقاء الحشرة على قيد الحياة. لذلك تم اعتماد طريقة التغذية لسهولة التعامل (جدول 11).

جدول11. دراسة فاعلية طريقة استخدام المستخلصات النباتية (الرش أو التغذية) في طول فترة الحياة لحشرة نحل العسل

طريقة المعاملة	المتوسط
شاهد	45.3^{B}
رش	65.6^{A}
تغذية	63.9^{A}
LSD	4.74

3- 1- 2- 2- تأثير مستخلص الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأميركية على طول فترة حياة شغالة نحل العسل

بعد سبعة أيام من المعاملة لشغالات نحل العسل وعند مقارنة المعاملة بالتراكيز المختلفة 10، 50 و100 ppm للمستخلصات النباتية من الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأميركية من أوراق، جذور، أغصان وثمار تبين تفوق كل من المعاملة بمستخلص الأوراق والتركيز 100 ppm حيث بلغ متوسط عدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة 19 شغالة وبنسبة مئوية 76%. يليها في المرتبة الثانية الشغالات المعاملة بمستخلص الجذور وبالتراكيز 50 و100 ppm حيث بلغ متوسط عدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة 18.7 و17.7 على التوالي وبنسبة مئوية 73.3 و70% على التوالي وبفروق معنوية مقارنةً بالشاهد والذي بلغ متوسط عدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة 11.7 وبنسبة مئوية 45.3 % (جدول 12). وبناء على هذه النتائج تم اختيار التركيز 100 ppm من مستخلص الأوراق من بين المعاملات الثلاث المتفوقة لأنها تفوقت على معاملتي الجذور.

جدول12. دراسة فاعلية التراكيز المختلفة لمستخلصات الأجزاء النباتية على حياة نحل العسل خلال سبعة أيام

الجزء النباتي	التركيز ppm	متوسط عدد الشغالات التي بقيت حية	النسبة المئوية % لعدد الشغالات التي بقيت حية	مقدار الزيادة في عمر الشغالات كنسبة مئوية %
أوراق	10	16.3	62.7^{DE}	38.4
	50	16.7	68.7^{BCD}	51.6
	100	19	76^{A}	67.8

	10	14	54^{F}	19.2
جذور	50	18.7	73.3^{AB}	61.8
	100	17.7	70^{ABC}	54.5
	10	13.3	55.3^{F}	22.1
أفرع	50	15	64^{CDE}	41.3
	100	16.7	68^{BCD}	50.1
	10	14.7	59.3^{EF}	30.9
ثمار	50	15	58.7^{EF}	29.6
	100	14.7	66.7^{BCD}	47.2
شاهد	-	11.7	45.3^{G}	
LSD			6.9635	

3- 1- 3- تأثير مستخلص نبات الصبغة على طفيل الفاروا

استخدم في هذا الاختبار مستخلص الأوراق بتركيز 100 ppm لإعطائه أفضل نتيجة التأثير على طول فترة حياة شغالة نحل العسل (جدول 12).

سجلت القراءات اليومية لمدة ثلاث أيام لعينات النحل المصابة بالفاروا قبل إجراء المعاملة بالمستخلص لحساب معدل التساقط الطبيعي (جدول 13).

جدول13. معدل التساقط الطبيعي للفاروا قبل إجراء المعاملة

	المكررات					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
بعد 24 ساعة	0	1	1	2	1	1
بعد 48 ساعة	1	1	2	1	0	1
بعد 72 ساعة	2	2	2	2	2	1
المتوسط	1	1.3	1.7	1.7	1	1

في اليوم الرابع قسمت المكررات إلى مجموعتين، كل مجموعة تحوي 3 مكررات، وعوملت المجموعة الأولى برش مستخلص الأوراق بتركيز 100 ppm والمجموعة الثانية برش الماء المقطر كشاهد، وسجلت القراءات لمدة 3 أيام (جدول 14).

جدول14. أعداد الفاروا المتساقطة بعد المعاملة

المعاملة	مستخلص نبات الصبغة			الشاهد		
	المكررات					
	1	2	3	1	2	3
بعد ساعة	4	4	5	-	-	-
بعد 24 ساعة	8	7	9	3	2	2
بعد 48 ساعة	12	8	7	4	4	4
بعد 72 ساعة	22	19	25	7	6	6

أظهرت النتائج أن رش المستخلص المائي لأوراق نبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L. بتركيز 100 ppm لمكافحة الفاروا أعطى نتائج إيجابية.

- بعد ساعة من المعاملة، بلغ متوسط الفاعلية النسبية 69.5% (جدول 15). وفي مكررات الشاهد الذي عُوملت الشغالات فيه برش الماء المقطر، لم يتم تسجيل أي فاروا متساقطة بعد ساعة من المعاملة
- بعد 24 ساعة من المعاملة، بلغ متوسط الفاعلية النسبية 83.3%، مقارنةً بالشاهد والذي كان متوسط الفاعلية النسبية فيه 48.1%.
- بعد 48 ساعة: بلغ متوسط الفاعلية النسبية 83.7% مقارنة بالشاهد الذي بلغ متوسط الفاعلية فيه 69.2%
- بعد 72 ساعة: بلغ متوسط الفاعلية النسبية 94% مقارنة بالشاهد الذي بلغ متوسط الفاعلية فيه 80.8%
- وبلغ متوسط الفاعلية الحقيقة بعد 24 ساعة لاستخدام المستخلص مقارنةً بالشاهد 42.3% (جدول 15).

جدول15. فاعلية استخدام مستخلص أوراق نبات الصبغة في مكافحة الفاروا

المعاملات	مستخلص نبات الصبغة			الشاهد		
	المكررات					
	1	2	3	1	2	3
الفاعلية النسبية بعد ساعة %	75	67.5	66	-	-	-
متوسط الفاعلية النسبية بعد ساعة %		69.5			-	

الفاعلية النسبية بعد 24 ساعة %	87.5	81	81.5	44.4	50	50
متوسط الفاعلية النسبية بعد 24 ساعة %		83.3			48.1	
الفاعلية النسبية بعد 48 ساعة %	91.7	83.3	75.7	57.5	75	75
متوسط الفاعلية النسبية بعد 48 ساعة %		83.7			69.2	
الفاعلية النسبية بعد 72 ساعة %	95.5	93.2	93.2	75.7	83.3	83.3
متوسط الفاعلية النسبية بعد 72 ساعة %		94			80.8	
الفاعلية الحقيقة للمستخلص مقارنة بالشاهد %		42.3			-	

- بعد 24 ساعة من المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية، كان متوسط معدل موت الفاروا 71.5% مقارنةً بالشاهد والذي كان متوسط معدل الموت فيه 31.7%

- بعد 48 ساعة: بلغ متوسط معدل موت الفاروا 70.3% مقارنةً بالشاهد والذي كان متوسط معدل الموت فيه 53.5%

- بعد 72 ساعة: بلغ متوسط معدل موت الفاروا 88.6% مقارنةً بالشاهد والذي كان متوسط معدل الموت فيه 68% (جدول 16).

جدول16: معدل موت الفاروا باستخدام مستخلص أوراق نبات الصبغة في مكافحة الفاروا

المعاملات	**مستخلص نبات الصبغة**			**الشاهد**		
	مكررات					
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
معدل موت الفاروا بعد 24 ساعة %	77.8	68	68.8	28.6	33.3	33.3
متوسط الموت بعد 24 ساعة %		71.5			31.7	
معدل موت الفاروا بعد 48 ساعة %	77.8	72	61	40.4	60	60
متوسط الموت بعد 48 ساعة %		70.3			53.5	
معدل موت الفاروا بعد 72 ساعة %	91.3	87.2	87.3	61	71.4	71.4
متوسط الموت بعد 72 ساعة %		88.6			68	

- بعد 24 ساعة من المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية، كان متوسط نسبة الفاروا المتساقطة قبل وبعد المعاملة 6.2 ضعف التساقط الطبيعي قبل المعاملة. مقابل ارتفاع 1.6 ضعف في الشاهد.

- بعد 48 ساعة: بلغ متوسط نسبة الفاروا المتساقطة قبل وبعد المعاملة 7.4 ضعف التساقط الطبيعي قبل المعاملة. مقابل ارتفاع 3.5 ضعف في الشاهد

- بعد 72 ساعة: بلغ متوسط نسبة الفاروا المتساقطة قبل وبعد المعاملة 16.9 ضعف التساقط الطبيعي قبل المعاملة. مقابل ارتفاع 5.2 ضعف في الشاهد

بلغ متوسط النسبة بين التساقط بعد ساعة من المعاملة والتساقط بعد 24 ساعة 54.2% (جدول 17).

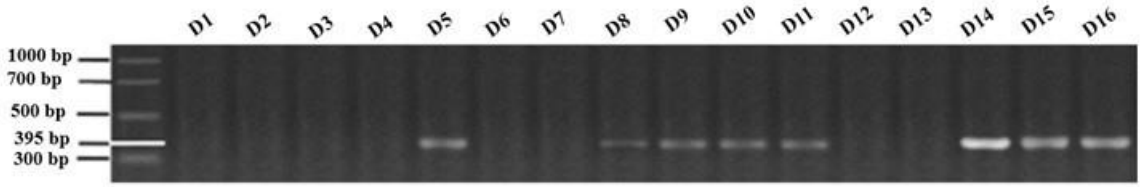
جدول17: نسبة الفاروا المتساقطة باستخدام مستخلص أوراق نبات الصبغة في مكافحة الفاروا قبل وبعد المعاملة

المعاملات	مستخلص نبات الصبغة			الشاهد		
	مكررات					
	1	2	3	1	2	3
نسبة الفاروا المتساقطة بعد ساعة مقارنة بالتساقط بعد 24 ساعة	50	57.1	55.6	-	-	-
المتوسط		54.2			-	
نسبة الفاروا المتساقطة قبل وبعد المعاملة بـ 24 ساعة	8	5.3	5.4	1.8	1	2
متوسط النسبة		6.2			1.6	
نسبة الفاروا المتساقطة قبل وبعد المعاملة بـ 48 ساعة	12	6.2	4.1	2.4	4	4
متوسط النسبة		7.4			3.5	
نسبة الفاروا المتساقطة قبل وبعد المعاملة بـ 72 ساعة	22	14.3	14.4	3.6	6	6
متوسط النسبة		16.9			5.2	

3- 1- 4- تأثير مستخلص نبات الصبغة في تحريض الجهاز المناعي لنحل العسل

3- 1- 4- 1- اختبار العينات للحصول على عينة نقية مصابة بفيروس DWV فقط

بيّنت نتائج الرحلان الكهربائي لاختبار RT-PCR للكشف عن فيروس الجناح المشوه DWV وغيره من الفيروسات المنتشرة في سورية لدى العينات المدروسة بهدف استخدامها لإحداث العدوى، وجود تفاعل لدى عدد من العينات (D5، D8، D9، D10، D11، D14، D15، D16) وظهرت حزمة واحدة بوزن جزيئي 395 pb ما يدل على إصابتها بفيروسDWV (شكل 1)، اختيرت العينة D14 لإحداث العدوى كون نتائج اختبار RT-PCR بيّنت على أنها حاملة لفيروس DWV ولم يظهر فيها أية إصابة بفيروس آخر (مهنا، 2023).



شكل5. الرحلان الكهربائي لمنتجات اختبار RT-PCR للكشف عن فيروس DWV في عينات النحل.

3- 1- 4- 2- تأثير مستخلص نبات الصبغة الأميركية مع معلق فيروسي في طول فترة حياة شغالة نحل العسل

تمت مراقبة نشاط الشغالات التي غذيت بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية مع المعلق الفيروسي وسجلت القراءات وجميع المشاهدات يومياً ولمدة 14 يوماً. أظهرت النتائج بعد ثلاثة ايام من المعاملة مايلي:

النسبة المئوية لعدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة وتغذت على محلول سكري فقط 73.3% (جدول 18) في حين ماتت جميع الشغالات في العينة التي تغذت على محلول سكري مع معلق فيروسي بعد 3 أيام من بدء التجربة. هذا وقد بلغت النسبة المئوية لعدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة وتغذت على محلول سكري مع مستخلص نباتي 93.3% والنسبة المئوية لعدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة وتغذت على محلول سكري مع مستخلص نباتي ومعلق فيروسي 80%.

في اليوم السابع من بدء التجربة كانت النسبة المئوية للشغالات التي بقيت على قيد الحياة وتغذت على محلول سكري فقط 46.6، بينما كانت النسبة المئوية لعدد الشغالات التي تغذت على محلول سكري مع مستخلص نباتي 80% والنسبة المئوية لعدد الشغالات التي تغذت على محلول سكري مع مستخلص نباتي ومعلق فيروسي 60%

في اليوم العاشر: بقيت الشغالات التي تغذت على محلول سكري حتى اليوم العاشر فقط، وبلغت النسبة المئوية لعدد الشغالات التي تغذت على محلول سكري مع مستخلص نباتي 40% والنسبة المئوية لعدد الشغالات التي تغذت على محلول سكري مع مستخلص نباتي ومعلق فيروسي 20%.

في اليوم الثاني عشر: ماتت جميع الشغالات التي تغذت على محلول سكري يحوي مستخلص نباتي مع معلق فيروسي، في حين بلغت النسبة المئوية لعدد الشغالات التي تغذت على محلول سكري مع مستخلص نباتي 20%، والشغالات التي تغذت على محلول سكري يحوي مستخلص نباتي فقط بقيت حتى اليوم الخامس عشر من بدء التجربة (جدول 18).

جدول18. دراسة فاعلية تأثير مستخلص نبات الصبغة الأميركية مع معلق فيروسي في طول فترة حياة شغالة نحل العسل

المعاملات	النسبة المئوية % لعدد الشغالات التي بقيت حية عند التغذية بمحلول سكري مع معلق فيروسي	النسبة المئوية % لعدد الشغالات التي بقيت حية عند التغذية بمحلول سكري فقط	النسبة المئوية % لعدد الشغالات التي بقيت حية عند التغذية بمحلول سكري مع مستخلص نباتي ومعلق فيروسي	النسبة المئوية % لعدد الشغالات التي بقيت حية عند التغذية بمحلول سكري مع مستخلص نباتي
بعد 3 أيام	-	73.3	80	93.3
بعد 7 أيام	-	46.6	60	80
بعد 10 أيام	-	-	20	40
بعد 12 يوم	-	-	-	20
بعد 15 يوم	-	-	-	-

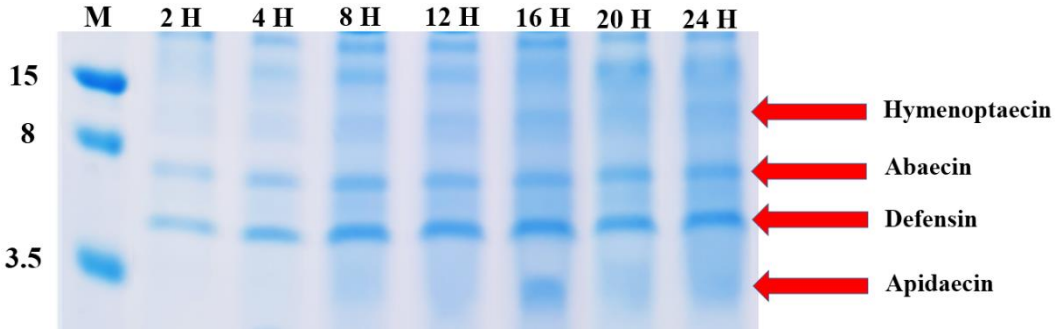
3- 1- 4- 3- تحفيز الببتيدات المضادة للميكروبات

حفزت المعاملة بمستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية بتركيز 100 ppm أربعة ببتيدات وهي الهيمينوبتايسين 12 kDa، الأباسين 5.8 kDa والديفينسين 4.8 kDa والأبايديسين 2 kDa خلال مراحل التجربة المختلفة (جدول 19). كُشف عن ببتيدات الهيمينوبتايسين والأباسين والديفينسين بعد ساعتين من المعاملة، واستمر ظهورها حتى 24 ساعة. أما ببتيد الأبايديسين فكشف عنه بعد ثمان ساعات من المعاملة واستمر ظهوره حتى 24 ساعة (جدول 19).

جدول19. تحفيز ببتيدات المقاومة (Hymenoptaecin، Abaecin، Defensin، Apidaecin) بالمعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية فقط

المعاملة بالمستخلص	**2H**	**4H**	**8H**	**12H**	**16H**	**20H**	**24H**
Hymenoptaecin	+	+	+	+	+	+	+
Abaecin	+	+	+	+	+	+	+
Defensin	+	+	+	+	+	+	+
Apidaecin			+	+	+	+	+

(H: ساعة، M: مؤشرجزيئي بروتيني)



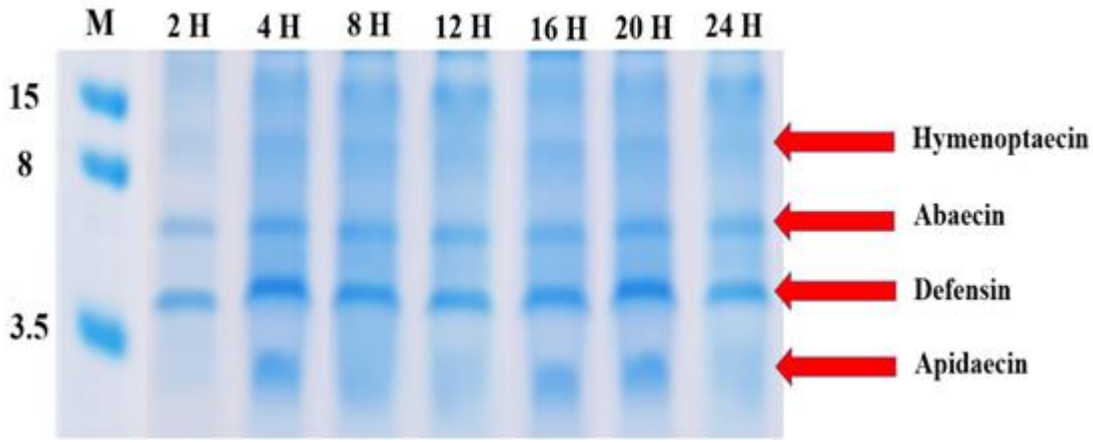
شكل6. الببتيدات المضادة للميكروبات المحفزة في السائل اللمفاوي لشغالة النحل عند المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية فقط

كما حرضت المعاملة بمستخلص النبات (100 ppm) مع إجراء العدوى بفيروس DWV على ظهور الببتيدات الأربعة (الهيمينوبتايسين، والأباسين، والديفينسين، والأبايديسين) وإن المقاومة للممرضات يحد من الأمراض التي تسببها مما يحافظ على حيوية ونشاط النحل ويمنع من التسبب بالموت جراء تلك الأمراض، وذلك بعد ساعتين من المعاملة واستمر ظهور الببتيدات الأربعة حتى نهاية التجربة بعد 24 ساعة (جدول 20)، في حين لم تحفز العدوى بفيروس الجناح المشوه ولا المعاملة بالماء المقطر أياً من الببتيدات الأربعة السابقة.

جدول20. تحفيز ببتيدات المقاومة (Hymenoptaecin، Abaecin، Defensin، Apidaecin) بالمعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية وفيروس DWV معاً.

مستخلص+DWV	2H	4H	8H	12H	16H	20H	24H
Hymenoptaecin	+	+	+	+	+	+	+
Abaecin	+	+	+	+	+	+	+
Defensin	+	+	+	+	+	+	+
Apidaecin	+	+	+	+	+	+	+

(H: ساعة، M: مؤشر جزيئي بروتيني)



شكل7 الببتيدات المضادة للميكروبات المحفزة في السائل اللمفاوي لشغالة النحل عند المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية وفيروس DWV معاً.

3- 2- المناقشة

3- 2- 1- الكشف عن بعض المركبات الكيميائية

في السنوات الأخيرة، ازداد تقييم النباتات الطبية وعزل مركباتها النشطة بيولوجياً بشكل كبير، بسبب احتمال استخدامها في الطب الحديث. حيث يمكن لهذه المركبات أن تحسن الصحة العامة وأن تعمل بشكل إفرادي أو تآزري (Azaizeh *et al*., 2003; Gurib-Fakim, 2006).

العديد من أنواع جنس Phytolacca وعائلة Phytolaccaceae عرفت باستخداماتها في الطب الشعبي لعلاج العديد من الأمراض، وتم الإبلاغ عن تأثيرات دوائية مختلفة كمضادات للالتهاب والميكروبات والسرطان (Haraguchi *et al*., 1988; Gomes *et al*., 2008).

أشارت الدراسات السابقة أن الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة يمتلك مستقلبات ثانوية رئيسية متنوعة (Trunjaruen *et al*., 2022). وعلى الرغم من خصائصها المحتملة في تعزيز الصحة، إلا أنه نادراً ما تم فحص الفينولات الموجودة في النبات (Daglia, 2012). بينت نتائج (Marinas *et al*., 2021) محتوى المستخلص الكحولي للأوراق من المركبات الفينولية أعلى مقارنةً بالمستخلص الكحولي للثمار وقد بلغ 32.28 ملغ/غ. وجد (Trunjaruen *et al*., 2022) أن محتوى مستخلص الأوراق من الفينولات كان أعلى من الجذور وقد بلغ 28.56 ملغ/غ. وأشارت نتائج Zheleva-Dimitrova عام 2013 أن محتوى الفينولات في مستخلص الأوراق أعلى من الثمار وبلغ 215.79 ملغ/غ. وهذا مايتفق مع نتائج هذه الدراسة من حيث أن محتوى المستخلص المائي للأوراق كان أعلى مقارنةً مع باقي الأجزاء الأخرى حيث بلغ محتوى الفينولات الكلي 12.8 ملغ/غ، وقد يعزى هذا التفاوت في النتائج إلى عدة عوامل والتي تؤثر على كمية الفينولات في المستخلص كطريقة تحضير المستخلص (Abdelkader *et al*., 2014) وعمر النبات (Johnson & Kim, 2005) وموقع النمو (Bahnweg *et al*., 2000) والتغيرات الطبيعية البيئية (غير الحيوية) مثل خصوبة التربة والرطوبة ودرجة الحرارة (Penuelas & Estiarte, 1998). تمتلك الفينولات أنشطة كمضادات للأكسدة (van Acker *et al*., 1996) وهذا يتفق مع أن نبات الصبغة الأمريكية يمتلك نشاط كمضاد للأكسدة (Marinas *et al*., 2021).

أشارت الدراسات السابقة إلى أن النبات غني بالتانينات (Sussner *et al*., 2004; Tipaz-Tipaz *et al*., 2019)، وهي مضادات للأكسدة والالتهاب وتقي من تصلب الشرايين (Mamet *et al*., 2018). هذا ما يتفق مع النتائج التي تشير إلى وجود التانينات في المستخلصات المائية لأجزاء نبات الصبغة الأمريكية وكان أعلى تركيز في مستخلص الأوراق وبلغ 7.92 ملغ/غ.

تعد السابونينات من المركبات الكيميائية الأساسية في نبات الصبغة الأمريكية (Ahmed *et al*., 1949)، توجد في جميع أجزاء النبات وخاصةً في الجذور (Yang *et al*., 2003). إن استهلاك السابونين يزيد من الحماية من خطر الإصابة بالسرطان، ويقلل من مستوى الكوليسترول والجلوكوز في

الدم، بالإضافة إلى أنه ينسب إليه خصائص مضادة للالتهابات وخافضة للكوليسترول ومنبهة للمناعة (Augustin *et al*., 2011). وهذا يتفق مع نتائج الكشف عن السابونينات في المستخلصات المائية لأجزاء نبات الصبغة الأمريكية، وأن النبات يمتلك خصائص كمضاد للسرطان (Maness, 2012).

3- 2- 2- تأثير المستخلصات في طول فترة حياة شغالة نحل العسل

تستخدم النباتات الطبية والعطرية في تربية النحل بسبب التأثيرات المضادة للبكتيريا والفطريات وكمضادات أكسدة والمضادة للفيروسات في الجهاز الهضمي لنحل العسل (Dıgrak *et al*., 1999, Bohme *et al*., 2013). ومع ذلك، فإن استخدام البدائل الطبيعية للأدوية الاصطناعية ينطوي أيضاً على مخاطر. إذا لم يتم اختيارها وإعدادها بشكل صحيح، فإنها يمكن أن تظهر سمية كبيرة (Schmehl *et al*., 2016).

أشارت الدراسات قدرة نبات القاسية *Scleranthus perennis* على إطالة فترة حياة شغالة نحل العسل السليم والمصاب بالنوزيما Nosema بنسبة 30% عند إضافته إلى الغذاء، حيث عاش النحل المصاب الذي تغذى على المحلول السكري 20 يوم والنحل السليم 26 يوم، أما النحل المصاب بعد تناوله المستخلص عاش حتى 26 يوم والنحل السليم عاش 34 يوم (Jakimiuk *et al*., 2022).

عام 2015 وجد كل من Strachecka وزملاؤهعند إضافة الكركم إلى المحلول السكري لتغذية النحل، أن النحل عاش لفترة أطول وكان أقل إصابة بالنوزيما.

عام 2022 وجد Skowronek وزملاؤه أن مستخلص القنب Hemp عند وضع داخل الخلية شرائط مبللة بالمستخلص أو إضافته إلى محلول التغذية أدى زيادة عمر النحل حتى 49 و52 يوماً على التوالي مقارنةً بالشاهد الذي تغذى على محلول سكري فقط، عاش النحل حتى 35 يوماً. ويعود ذلك إلى الخصائص المضادة للأكسدة الموجودة في مستخلص القنب والذي يؤخر عملية الشيخوخة.

ما يتوافق مع نتائج هذه الدراسة من حيث أن المعاملة بالمستخلصات النباتية لأجزاء نبات الصبغة الأميركية *Phytolacca americana* L. أدت إلى زيادة فترة حياة شغالات نحل العسل وكان لمستخلص الأوراق بتركيز 100 ppm تفوق معنوي على باقي المستخلصات حيث بلغت النسبة المئوية لعدد الشغالات التي بقيت حية 76% بعد سبعة أيام من المعاملة مقارنة بالشاهد الذي تغذى على محلول سكري فقط وبلغت النسبة المئوية لعدد الشغالات التي بقيت حية 45.3%.

3- 2- 3- تأثير مستخلص نبات الصبغة على طفيل الفاروا

يميل الباحثون في الوقت الحاضر إلى إيجاد طرق أكثر أماناً لمكافحة طفيل الفاروا. كاستخدام المستخلصات النباتية التي يمكن أن تحل محل المبيدات الكيميائية في مكافحة الفاروا (Kim *et al*.,

2005; Ghasemi *et al*., 2010). نظراً لأن النبات يحتوي على مستقلبات الثانوية لها خصائص كمبيد حشري (Isman & Machial, 2006). ولهذه المواد القدرة على تسميم مفصليات الأرجل عن طريق الابتلاع أو الملامسة أو الاستنشاق. كما أن لديها القدرة على صد أو طرد الحشرات ومنعها من التغذية، مما يقلل من قدرتها على التكاثر ويغير سلوكها الطبيعي (Weaver & Subramanyam, 2000).

تعد المستخلصات أكثر توافقاً مع النظم البيئية وأقل سمية للكائنات الحية ولا تترك أي مواد قاتلة ثابتة في الطبيعة (Liu *et al*., 2006). ومع ذلك تحتاج إلى مزيد من الدراسة لتأكيد هذه الخصائص (Ghasemi *et al*., 2010).

تشير الدراسات السابقة إلى فاعلية بعض المستخلصات النباتية في مكافحة طفيل الفاروا. منها المستخلص المائي للزعتر البري *Thymus vulgaris* (El-Bolok & Mahfouz, 2021; Rahimi *et al*., 2014)، وازداد معدل تساقط الفاروا مع ازدياد تركيز المستخلص حيث بلغ متوسط عدد الفاروا المتساقطة عند التركيز 20% 36.66 بعد 24 ساعة من المعاملة و 78.26 بعد 15 يوم من المعاملة، ولكن لوحظ وجود أثر لهذه المعاملة في ارتفاع معدل وفيات النحل (El-Bolok & Mahfouz, 2021).

مستخلص نبات التبغ Nicotiana tabacum له تأثير في ازدياد معدل موت الفاروا، ولم يكن له تأثير على كثافة population الخلية (Shaddel-Telli *et al*., 2008).

وجد Baker وزملاؤه عام 2019 أن بعض الزيوت أعطت فاعلية (زيت النيم Neem 90%، زيت الليمون Lemon 87.5% وزيت الأوكالبتوس Eucalyptus 83.3%) بعد 72 ساعة من المعاملة وعند التركيز 400 ppm ضمن ظروف المخبر. قد تصل الفعالية عند استخدام المبيدات الكيميائية في مكافحة الفاروا إلى 95% (Devi *et al*., 2019)، كما في حمض الفورميك بلغ متوسط الفعالية 91.90% (Sharaf EL-Din & Elenany, 2020) بينما في الثيمول Thymol بلغ متوسط الفعالية 76.74% (Abdul Qadir *et al*., 2021).

بينت النتائج فاعلية مستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية عند التركيز 100 ppm بعد 24 ساعة في مكافحة طفيل الفاروا بمتوسط قدره 83.3% مقارنةً بالشاهد الذي بلغ متوسط الفاعلية النسبية فيه 48.1%. بلغ متوسط الفاعلية بعد 72 ساعة 94% مقارنةً بالشاهد الذي بلغت متوسط الفاعلية فيه 80.8% وهو ما يتفق مع (El-Bolok & Mahfouz, 2021) ومع (Shaddel-Telli *et al*., 2008).

بلغ متوسط النسبة المئوية لموت الفاروا باستخدام مستخلص أوراق نبات الصبغة 71.5% بعد 24 ساعة و 88.6% بعد 72 ساعة من المعاملة

في حين بلغ متوسط النسبة المئوية للموت في الشاهد غير المعامل 31.7% بعد 24 ساعة و 68% بعد 72 ساعة من المعاملة.

عدد متوسط الفاروا المتساقطة بعد المعاملة بـ 24 ساعة بمستخلص أوراق نبات الصبغة كان 6.2 ضعف التساقط الطبيعي قبل المعاملة، مقابل 1.6 ضعفاً في الشاهد غير المعامل. وارتفع معدل التساقط بعد 72 ساعة حتى 16.9 ضعفاً مقابل ارتفاع 5.2 ضعفاً في الشاهد غير المعامل. حيث يتسبب رش النحل بالماء فقط على شكل رذاذ إلى ازدياد التساقط الطبيعي بمعدل 1.53 ضعف (حجيج وزملاؤه، 2018). وهذا ما يتفق مع الدراسات السابقة أن نبات الصبغة الأمريكية له خصائص كمبيد أكاروسي (Ding *et al*., 2012; Rosado-Aguilar *et al*., 2010). أن أي مادة نباتية وصلت فاعليتها في مكافحة الفاروا إلى 70% هذا يعني أن لها فائدة كبيرة وذلك لأن المادة الطبيعية يمكن تكرار استخدامها لمرات عديدة دون خوف من ترك أثر متبقي أو إحداث ضرر على النحل ومنتجاته، بالإضافة لتكلفتها المنخفضة (حجيج وزملاؤه، 2018).

3- 2- 4- تأثير مستخلص نبات الصبغة في تحريض الجهاز المناعي لنحل العسل

أصبح البحث عن أدوية بديلة تعتمد على الخصائص الدوائية والكيميائية النباتية له أولوية في أبحاث صحة مستعمرة النحل بسبب زيادة المقاومة للأدوية المتعددة والطلب على المنتجات العضوية (Pasca *et al*., 2021) في السنوات القليلة الماضية، ازداد الاهتمام باستخدام المستخلصات من أجل تعزيز تكاثر وقوة النحل ومقاومة الأمراض والاستهلاك الغذائي (Erler & Moritez, 2016) ومع ذلك، فإن استخدام البدائل الطبيعية للأدوية الاصطناعية ينطوي أيضاً على مخاطر. إذا لم يتم اختيارها وإعدادها بشكل صحيح، فإنها يمكن أن تظهر سمية كبيرة (Schmehl *et al*., 2016). ويمكن استخدامها لمكافحة عدد كبير من أمراض النحل الفطرية والبكتيرية والفيروسية وغيرها (Pasca *et al*., 2021). أثبتت الأمراض الفيروسية التي تصيب نحل العسل تأثيراً سلبياً على الأمن الغذائي والحياة البرية والاستقرار الاقتصادي (Hall & Steiner, 2019). يلعب النظام الغذائي دوراً أساسياً في توفير مستعمرات نحل قوية وصحية (Annoscia *et al*., 2019)، وأن قدرة المستعمرة على مواجهة الضغوط الحيوية وغير الحيوية يمكن تعزيزها عن طريق إمداد النحل بالعناصر الغذائية (Annoscia *et al*., 2017) وتنشيط الجهاز المناعي (Pascual *et al*., 2022).

وجد برهوم وآخرون (2018) عند دراسة تأثير إضافة مستخلص زيت الشيح الأبيض *Artemisia herba-alba* والنارنج *Citrus aurantium* والزعتر البري *Thymus serpyllum* والغار *Laurus nobilis* والمليسة *Aloysia citriodora* أن لها تأثيرات معنوية على طول فترة حياة شغالة النحل مقارنة بالشاهد

استخدام المكونات الطبيعية، مثل المركبات المضادة للأكسدة، ذات فائدة كبيرة لتوليد مركبات مضادة للفيروسات والتي يمكن أن تؤثر على دورة حياة الفيروس وبروتينات المضيف (Pour *et al*., 2019).
للكافيين تأثير على استجابة النحل ضد مسببات الأمراض حيث يمكن أن يزيد من التعبير عن الجينات المشاركة في المناعة ويقلل من عدد نسخ الفيروس، مما يشير إلى أنه لديه القدرة على تعزيز قدرة النحل على مكافحة العدوى الفيروسية (Lu *et al*., 2020).
عام 2022 وجد Pascual وآخرون أن إضافة مسحوق ثفل العنب إلى غذاء النحل أدى إلى تعزيز الاستجابة المناعية ضد فيروس DWV.
وجد مهنا (2023) أن لبعض المستخلصات النباتية القدرة على تحفيز تركيب الببتيدات المضادة للميكروبات ضمن السائل اللمفاوي لشغالة نحل العسل مثل زيت نبات الشيح وتسهم هذه الببتيدات في تحفيز الجهاز المناعي والدفاعي الطبيعي (الفطري) لنحل العسل.

وكان للظروف المناخية تأثيراً على انتشار فيروس DWV (مهنا وزملاؤه، 2023).

تتوافق هذه النتائج مع نتائج الدراسة التي بينت دور مستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية عند التركيز 100 جزء في المليون في تحفيز الجهاز المناعي لشغالات نحل العسل لناحية ظهور الببتيدات المضادة للميكروبات (الهيمينوبتايسين، والأباسين، والديفينسين، والأبايديسين).

الاستنتاجات

1. احتواء نبات الصبغة الأمريكية *Pytolacca americana* L. على بعض المركبات الكيميائية التي قد تعطيه خصائص كمضاد أكسدة
2. يلعب إضافة مستخلصات النبات إلى غذاء النحل دور هام في طول فترة حياة شغالة نحل العسل.
3. تفوق مستخلص الأوراق بتركيز 100 ppm على المستخلصات الأخرى المستخدمة في التأثير على فترة بقاء شغالة نحل العسل وعلى تحفيز مناعة النحل.
4. إمكانية استخدام مستخلص أوراق النبات في زيادة معدل تساقط الفاروا مخبرياً
5. احتمالية تثبيط انتشار فيروس الجناح المشوه DWV عند إضافة مستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية إلى الغذاء

التوصيات

1. إجراء المزيد من الدراسات من أجل وضع البرامج الوقائية والعلاجية لنحل العسل باستخدام المستخلصات النباتية.
2. إجراء المزيد من الدراسات لاختبار تأثير نبات الصبغة الأمريكية *Phytolacca americana* L. على العديد من الممرضات.
3. إجراء المزيد من الدراسات لاختبار تأثير نبات الصبغة الأمريكية كمبيد للفاروا
4. التوسع في الدراسات الجزيئية حول الأثر الأيجابي لنبات الصبغة في تحريض المورثات المسؤولة عن إنتاج الببيدات المضادة للميكروبات بنتيجة المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية.
5. إجراء المزيد من الدراسات لاختبار مستخلصات الجذور في تحفيز مناعة النحل.

المراجع

المراجع العربية:

1. حجيج، نور الدين يوسف ظاهر، خالد، باسم سليمان، العلان، محمد، كحيل، هيثم، المنوفي، عادل، ومحمد حسن. (2018). تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات إكليل الجبل (Rosmarinusofficinalis L.) في مكافحة الفاروا (Varroa destructor Oud.). **مجلة وقاية النبات العربية**. ج: 36(1). ص-ص: 27-31. http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-036.1.027031

2. برهوم، همام شعبان، هشام أديب الرز وأحمد محمد مهنا. (2018). المستخلصات النباتية ودورها في تحفيز تكوين الببتيدات المضادة للميكروبات لدى شغالات نحل العسل (Apis mellifera L.). **مجلة وقاية النبات العربية**. ج: 36(3). ص-ص: 250-258. https://dx.doi.org/10.22268/AJPP-036.3.250258

3. مهنا، أحمد محمد. (2023). الجهاز المناعي لنحل العسل وآليات تحفيزه. **المؤتمر الرابع عشر لاتحاد النحالين العرب**، 13-15/نوفمبر/2023، القاهرة، مصر.

4. مهنا، أحمد محمد و ميسر الحاج عمر. (2013). دراسة مرجعية لأكثر فيروسات نحل العسل انتشاراً في العالم. **مجلة وقاية النبات العربية**. ج: 31(1). ص-ص: 1-9.

5. مهنا، أحمد محمد، مي شرف، أوس حسن و نورس الأبرص. (2023). دراسة تفصيلية لفيروس الجناح المشوه DWV ودور نبات الصبغة الأمريكية في تحفيز الجهاز المناعي لنحل العسل في سورية. **المؤتمر الرابع عشر لاتحاد النحالين العرب**، 13-15/نوفمبر/2023، القاهرة ، مصر.

المراجع الأجنبية

1. Abbott, W.S.A. (1925) A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **Journal of Economic Entomology**. Vol. 18(2), pp. 265-267. http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a
2. Abdelkader, M., Ahcen, B., Rachid, D., & Hakim, H. (2014). Phytochemical study and biological activity of sage (*Salvia officinalis* L.). **International Journal of Bioengineering and Life Sciences**. Vol. 8(11), pp. 1253-1257.
3. Abdul Qadir, Z., Idrees, A., Mahmood, R., Sarwar, G., Abu Bakar, M., Ahmad, S., Raza, M.M., & Li, J. (2021). Effectiveness of Different Soft Acaricides against Honey Bee Ectoparasitic Mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). **Insects**. Vol. 12(11), pp. 1032. DOI: 10.3390/insects12111032
4. Adjlane, N., & Haddad, N. (2017). A bibliographic review on the most dangerous diseases of the honey bee. **Bio-Science Research Bulletin**. Vol. 33(2), pp. 85-99. https://doi.org/10.5958/2320-3161.2017.00011.6
5. Ahmed, S. (2015). **NEMATICIDAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM PHYTOLACCA AMERICANA ON FIVE PLANT-PATHOGENIC NEMATODE SPECIES OF ECONOMIC IMPORTANCE**. Doctoral dissertation, Clemson University. Pp.81.
6. Ahmed, Z.F., Zufall, C.J., & Jenkins, G.L. (1949). A contribution to the chemistry and toxicology of the root of *Phytolacca americana*, L. **Journal of American Pharmaceutical Association**. Vol. 38(8), pp. 443-448. doi:10.1002/jps.3030380808
7. Akhtar, M. S., Degaga, B., & Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. **Issues in Biological Sciences & Pharmaceutical Research**. Vol. 2(1), pp. 1-7.
8. Akinmoladun, A.C., Ibukun, E.O., Afor, E., Obuotor, E.M., & Farombi, E.O. (2007). Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of Ocimum gratissimum. **Scientific Research and Essays**. Vol. 2(5), pp. 163-166.

9. Aldhanhani, A.R.H., Ahmed, Z., Tzortzakis, N., & Singh, Z. (2022). Maturity stage at harvest influences antioxidant phytochemicals and antibacterial activity of jujube fruit (Ziziphus mauritiana Lamk. and Ziziphus spina-christi L.). **Annals of Agricultural Sciences**. Vol. 67(2), pp. 196-203. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2022.12.003

10. Amdam, G.V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S.W. (2004). Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? **Journal of Economic Entomology**. Vol. 97(3), pp. 741–747. https://doi.org/10.1093/jee/97.3.741

11. Anderson, D.L., & Trueman, J.W.H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. **Experimental and Applied Acarology**. Vol. 24(3), pp. 165–189. https://doi.org/10.1023/A:1006456720416

12. Annoscia D., Zanni V., Galbraith D., Quirici A., Grozinger C., Bortolomeazzi R., Nazzi F. (2017). Elucidating the mechanisms underlying the beneficial health effects of dietary pollen on honey bees (*Apis mellifera*) infested by *Varroa* mite ectoparasites. **Sci. Rep**. Vol. 7, pp. 6258. doi: 10.1038/s41598-017-06488-2.

13. Annoscia, D., Brown, S.P., Di Prisco, G., De Paoli, E., Del Fabbro, S., Frizzera, D., *et al.*, (2019). Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.** Vol. 286(1901), pp. 20190331. doi: 10.1098/rspb.2019.0331.

14. AOAC SMPR .2015.009. (2015). Estimation of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**. Vol. 98(4), pp. 1109–1110. https://doi.org/10.5740/jaoac.int.SMPR2015.009 .

15. Aron, G.M., & Irvin, J.D. (1980). Inhibition of Herpes Simplex Virus Multiplication by the Pokeweed Antiviral Protein. **Antimicrob. Agents Chemother**. Vol. 17(6), pp. 1032-1033. doi: 10.1128/aac.17.6.1032

16. Arumugam, G., Swamy, M. K., & Sinniah, U. R. (2016). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological & nutritional significance. **Molecules**. Vol. 21(4), pp. 369. Doi: 10.3390/molecules21040369

17. Asha, P., Gulati, R., & Sharma, S.K. (2014). Comparative evaluation of oxalic acid and formic acid against Varroa destructor Anderson and Trueman in Apis mellifera L. colonies. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. Vol. 2(4), pp. 119-124.

18. Augustin, J.M., Kuzina, V., Andersen, S.B., & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**. Vol. 72(6), pp. 435-57. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.015.

19. Azaizeh, H., Fulder, S., Khalil, K., & Said, O. (2003). Ethnobotanical knowledge of local Arab practitioners in the Middle Eastern region. **Fitoterapia**. Vol. 74(1-2), pp. 98-108. DOI: 10.1016/s0367-326x(02)00285-x

20. Bahnweg, G., Schubert, R., Kehr, R.D., Muller-Starck, G., Heller, W., Langebartels, C., & Sanderman Jr, H. (2000). Controlled inoculation of Norway spruce with Sirococcus conigenus: PCR based quantification of the pathogen in host tissue and infection related increase of phenolic metabolites. **Trees**. Vol. 14(8), pp. 435-441. DOI:10.1007/s004680000058

21. Bailey, L., & Ball, B.V. (1991). **Honey Bee Pathology**. Acadimic Press. 2nd Ed. Pp. 208.

22. Bakar, M.A., Aqueel, M.A., Raza, A.B.M., Mahmood, R., Qadir, Z.A., Arshad, M., & Sohail, M. (2019). Evaluation of essential oils for the management of parasitic bee mites, Varroa destructor (Acari: Varroidae) in vitro. **Pakistan Journal of Agricultural Research**. Vol. 32(4), pp. 566-571. DOI | http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjar/2019/32.4.566.571.

23. Balogh, L., & Juhasz, M. (2008). American & Chinese pokeweed (*Phytolacca Americana* L, *Phytolacca esculenta* VAN HOUTTE). **The most important**

invasive plants in Hungary. Vol. 3, pp. 35-46. Vacratot: Hunggary. Hungarian Academy of Sciences, Institute of Ecology & Botany.

24. Barbieri, L., Aron, G.M., Irvin, J.D., & Stirpe, F. (1982). Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of Phytolacca americana L. (pokeweed). **Biochemical Journal**. Vol. 203(1), pp. 55–59. DOI: 10.1042/bj2030055

25. Barnett, B.D. (1975). Toxicity of pokeberries (fruit of Phytalacca americana Large) for turkey poults. **Poultry Science**. Vol. 54(4), pp. 1215-1217. https://doi.org/10.3382/ps.0541215

26. Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antuñez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., *et al.*, (2020). Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, Apis mellifera. **Insects**. Vol. 11(4), pp. 239. https,//doi.org/10.3390/insects110 40239.

27. Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., Topolska, G., Ritter, W., *et al.*, (2007). Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 73(11), pp. 3605–3611. doi: 10.1128/AEM.00696-07

28. Boadu, A.A., & Asase, A. (2017). Documentation of herbal medicines used for the treatment and management of human diseases by some communities in southern Ghana. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**. Vol. 2017(11-12), pp. 1–12. DOI:10.1155/2017/3043061

29. Boecking, O., & Drescher, W. (1992). The removal response of Apis mellifera L. colonies to brood in wax and plastic cells after artificial and natural infestation with Varroa jacobsoni Oud. and to freeze killed brood. **Experimental and Applied Acarology**. Vol. 16, pp. 321-329.

30. Boecking, O., & Genersch, E. (2008). Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.** Vol. 3(2), pp. 221–228. DOI:10.1007/s00003-008-0331-y

31. Bohme, K., Barros-Velazquez, J., Calo-Mata, P., & Aubourg, S.P. (2013). Antibacterial, Antiviral and Antifungal Activity of Essential Oils: Mechanisms and Applications. Eds: Villa, T., & Veiga-Crespo, P. **Antimicrobial**

Compounds. Pp. 51–81. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40444-3_3.

32. Bowen-Walker, P. L., Martin, S.J., & Gunn, A. (1999). The transmission of deformed wing virus between honeybees (Apis mellifera L.) by the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni Oud. **Journal of Invertebrate Pathology**. Vol. 73(1), pp. 101–106. DOI: 10.1006/jipa.1998.4807

33. Brutscher, L.M., Daughenbaugh, K.F., & Flenniken, M.L. (2015). Antiviral defense mechanisms in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**. Vol. 10, pp. 71–82. DOI: 10.1016/j.cois.2015.04.016

34. Budge, G.E., Pietravalle, S., Brown, M., Laurenson, L., & Jones, B. (2015). Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales. **PLOS ONE**. Vol. 10(7), pp. e0133228. https,//doi.org/10.1371/journal.pone.01 33228

35. Caldeirão, L., Sousa, J., Nunes, L.C.G., Godoy, H.T., Fernandes, J.O., & Cunha, S.C. (2021). Herbs and herbal infusions: Determination of natural contaminants (mycotoxins and trace elements) and evaluation of their exposure. **Food Research International**. Vol. 144: 110322. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110322

36. Calderon, R., Veen, J., Arce, H., & Esquivel, M. (2003). Presence of deformed wing virus and Kashmir bee virus in Africanized honey bee colonies in Costa Rica infested with Varroa destructor. **Bee World**. Vol. 84(3), pp. 112–116. DOI:10.1080/0005772X.2003.11099586

37. Calderone, N.W., & Kuenen, L.P.S. (2003). Differential tending of worker and drone larvae of the honey bee, Apis mellifera, during the 60 hours prior to cell capping. **Apidologie**. Vol. 34(6), pp. 543–552. DOI:10.1051/apido:2003054

38. Calderone, N.W., & Lin, S. (2003). Rapid determination of the numbers of Varroa destructor, a parasitic mite of the honey bee, Apis mellifera, on sticky-board collection devices. **Apidologie**. Vol. 34, pp. 11– 17. DOI : 10.1051/apido:2002042

39. Calderone, N.W., LIN, S., & Kuenen L.P.S. (2002). Differential infestation of honey bee, Apis mellifera, worker and queen brood by the parasitic mite

Varroa destructor. **Apidologie**. Vol. 33(4), pp. 389–398.DOI:10.1051/apido:2002024

40. Chagas, D.B., Monteiro, F.L., De Olivera, H.S., Lima, M., & Fischer, G. (2019). Viruses that afect Apis mellifera and their occurrence in Brazil. **Ciencia Rural**. Vol. 49(9), pp. e2018142. doi. org/10.1590/0103-8478cr20181042

41. Chang, H-M and But P.P.H. (1986). **Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica**. World Scientific. pp. 716.

42. Chen, Y. P., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. Advances in Virus Research. Vol. 70, pp. 33-80. Elsevier Publishing. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7

43. Chen, Y., Evans, J., & Feldlaufer, M. (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, Apis mellifera. **Journal of Invertebrate Pathology**. Vol. 92(3), pp. 152–159. doi: 10.1016/j.jip.2006.03.010

44. Chen, Z., Antoniw, J.F., & White, R.F. (1993). A possible mechanism for the antiviral activity of pokeweed antiviral protein. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. Vol. 42(4), pp. 249–258.

45. Chevallier, A. (1996). **The Encyclopedia of Medicinal Plants**. London: UK. Dorling Kinderley, Pp. 336.

46. Clermont, A., Eickermann, M., Kraus, F., Hoffmann, L., & Beyer, M. (2015). Correlations between l& covers & honey bee colony losses in a country with industrialized & rural regions. **The Science of The Total Environment**. Vol. 532, pp. 1–13. Elsevier Publishing. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.128

47. Cordoni, G., & Spagnuolo, M.L. (2007). Development of an experimental GIS for beekeeping in the Marche Region, Italy. **Veterinaria Italiana**. Vol. 43(3), pp. 431-436.

48. Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., *et al.*, (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**. Vol. 318(5848), pp. 283-287. DOI: 10.1126/science.1146498

49. Czapla, T.H., & Lang, B.A. (1990). Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Crysomelidae). **Journal of Economic. Entomology.** Vol. 83(6), pp. 2480–2485 https://doi.org/10.1093/jee/83.6.2480

50. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. Vol. 23(2), pp. 174–181. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.007

51. Damiani, N., Fernandez, N.J., Maldonado, L.M., Alvarez, A.R., Eguaras, M.J., & Marcangeli, J.A. (2010). Bioactivity of propolis from different geographical origins on Varroa destructor (Acari: Varroidae). **Parasitology Research**. Vol. 107(1), pp. 31–37. DOI: 10.1007/s00436-010-1829-7

52. De Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). *Deformed wing virus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. Vol. 103, pp. S48–S61. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012

53. De Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., *et al.*, (2013). Standard methods for virus research in Apis mellifera. **Journal of Apicultural Research.** Vol. 52(4), pp. 1–56.

54. de Roode, J.C., & Lefêvre, T. (2012). Behavioral Inmunity in insects. **Insects**. Vol. 3(3), pp. 789–820. doi:10.3390/insects3030789.

55. De Jong, D., Morse, R.A., & Eickwort, C.G. (1982). Mite pests of honey bees. **Annual Review of Entomology**. Vol. 27(1), pp. 229–252. DOI:10.1146/annurev.en.27.010182.001305

56. De Ruijter, A., & Kaas, J.P. (1983). The anatomy of the Varroa mite. R. Cavalloro. **Varroa jacobsoni oud affecting honey bees: present status and needs**. pp. 45–47.Rotterdam: Netherlands. Balkema.

57. Devi, S., Barwar, C., & Devi, M. (2019). Different methods for the management of Varroa mite (Varroa destructor) in honey bee colony. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. Vol. 7(4), pp. 178–182.

58. Deyrup, M., Edirisinghe J.P., & Norden, B. (2002). The diversity and floral hosts of bees at the Archbold Biological Station, Florida (Hymenoptera: Apoidea). **Insecta Mundi**. Vol. 16(1–3), pp. 87–120.

59. Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., & Caprio, E. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Vol. 110(46), pp. 18466-18471. https,//doi.org/10.1073/pnas.13149231 10

60. Di, R., & Tumer, N.E. (2015). Pokeweed Antiviral Protein: Its Cytotoxicity Mechanism and Applications in Plant Disease Resistance. **Toxins**. Vol. 7(3), pp. 755-772. doi,10.3390/toxins7030755.

61. Digrak, M., Mehmet, A., Ilcim, A., & Sen, S. (1999). Antibacterial and Antifungal Effects of Various Commercial Plant Extracts. **Pharmaceutical Biology**. Vol. 37(3), pp. 2016-220. DOI:10.1076/phbi.37.3.216.6307.

62. Ding, L. J., Ding, W., Zhang, Y. O., & Luo, J. X. (2012). Bioguided fractionation & isolation of esculentoside P from Phytolacca americana L. **Industrial Crops & Products**. Vol. 44, pp. 534-541. Chongqing: China. Elsevier Publishing. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.027.

63. Domashevskiy, A.V., Miyoshi, H., & Goss, D.J. (2012). Inhibition of pokeweed antiviral protein (PAP) by turnip mosaic virus genome-linked protein (VPg). **Journal of Biological Chemistry**. Vol. 287(35), pp. 29729-29738. doi: 10.1074/jbc.M112.367581

64. Ebert, T.A., Kevan, P.G., Bishop, B.L., Kevan, S.D., & Downer, R.A. (2007). Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (Apis mellifera). **Journal of Apicultural Research**. Vol. 46(4), pp. 220-224. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.46.4.02

65. Edeoga, H.O., Okwu, D.E., & Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 4(7), pp. 685-688. http://dx.doi.org/10.5897/AJB2005.000-3127.

66. El-Bolok, D., & Mahfouz, H. (2021). EFFICACY OF SOME PLANT EXTRACTS AGAINSTVarroa destructorAND THEIR SIDEEFFECT ON HONEYBEE COLONIES. **Zagazig Journal of Agricultural Research**. Vol. 48(4), pp. 1023-1032. DOI:10.21608/zjar.2021.204542

67. El-Minisy, A.M., El-Sawy, A., El-Shabrawi, H.M., Soliman, M.H., El-Assal, S., & Mahfouze, H.A. (2017). In vitro Propagation and Molecular Analysis of Pokeweed (Phytolacca Americana) Plant. **Middle East Journal of Agricultural Research.** Vol. 6(2), pp. 424-432.

68. Erler, S., & Moritz, R.F.A. (2016). Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (Apis mellifera). **Apidologie**. Vol. 47, pp. 389–411. https://doi.org/10.1007/s13592-015-0400-z

69. Evans, J.D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**. Vol. 103, pp. S62-S72. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.019

70. Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J–L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees Apis mellifera. **Insect Molecular Biology**. Vol. 15(5), pp. 645–656. doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x

71. Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., & Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**. Vol. 63(6), pp. 965-981.

72. Fernandez, N., Eguaras, M., & Hernandez, D. (1993). Distribution patterns of Varroa jacobsoni Oud on Apis mellifera L. during winter in Argentina. **Apidologie (France)**. Vol. 24(4), pp. 397–401. DOI:10.1051/apido:19930406

73. Fisher, B., Turner, R.K., & Morling, P. (2009). Defining and Classifying ecosystem services for decision making. **Ecological Economics.** Vol. 68(3), pp. 643-653. https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.09.014

74. Florea, V and Donea, V. (2010). **Phytolacca americana L**. In The culture of medicinal plants. Chisinau: Moldova. Bons Offices SRL. pp. 255-263.

75. Flores J. M., Gámiz, V., Jiménez-Marín, A., Flores-Cortés, A., Gil-Lebrero, S., Garrido, J. J., & Hern&o, M. D. (2021). Impact of Varroa destructor & associated pathologies on the colony collapse disorder affecting honey bees.

Research in Veterinary Science. Vol. 135, pp. 85–95. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.01.001.

76. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Statistics Division. (2015). FAOSTAT. (March 2016).

77. Fournier, P. (1948). **Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France**. Vol 3. Lechevalier, Paris. Pp. 636.

78. Fries, I., & Camazine, S. (2001). Implications of Horizontal and Vertical Pathogen Transmission for Honey Bee Epidemiology. **Apidologie**. Vol. 32(3), pp. 199–214.

79. Fuchs, S. (1992). Choice in Varroa jacobsoni Oud. between honey bee drone or worker brood cells for reproduction. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. Vol. 31(6), pp. 429–435. DOI:10.1007/BF00170610

80. Fujiyuki, T., Takeuchi, H., Ono, M., Ohka, S., Sasaki, T., Nomoto, A., & Kubo, T. (2004). Novel insect picornalike virus identified in the brains of aggressive worker honey bees. **Journal of Virology**. Vol. 78(3), pp. 1093–1100. doi: 10.1128/JVI.78.3.1093–1100.2004

81. Gätschenberger, H., Azzami, K., Tautz, J., & Beier, H. (2013). Antibacterial immune competence of honey bees (Apis mellifera) is adapted to different life stages and environmental risks. **PLoS ONE**. Vol. 8(6), pp. e66415. doi:10.1371/journal.pone.0066415.

82. Ghasemi, V., Moharramipour, S., & Tahmasebi, G.H. (2010). Acaricidal activity of essential oil from *Mentha longifolia* (Lamiaceae) against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its effect on *Apis mellifera* (Hym.: Apidae). **Journal of Entomological Society of Iran**. Vol. 30(2), pp. 31–45.

83. Goldstein, S.W., Jenkins, G.L., & Thompson, M.R. (1937). A Chemical and Pharmaceutical Study of Phytolacca Americana, N.F. **Journal of American Pharmaceutical Association**. Vol. 26(4), pp. 306–312. https://doi.org/10.1002/jps.3080260407

84. Gomes, P.B., Noronha, E.C., de Melo, C.T.V., Bezerra, J.N.S., Neto, M.A., Lino, C.S., *et al.*, (2008). Central effects of isolated fractions from the root

of Petiveria alliacea L. (tipi) in mice. **Journal of Ethnopharmacol**ogy. Vol. 120(2), pp. 209–214. DOI: 10.1016/j.jep.2008.08.012

85. Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, & lack of flowers. **Science**. Vol. 347(6229), pp. 1255957. https://doi.org/10.1126/science.1255957

86. Govindarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A. K., Mehrotra, S., & Pushpangadan, P. (2003). Studies on the antioxidant activities of Desmodium gangeticum. **Biological & Pharmacutical Bulletin.** Vol. 26(10), pp. 1424–1427. Madhya Pradesh: India. **DOI:10.1248/bpb.26.1424**.

87. Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. Vol. 27(1), pp. 1–93. DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.008

88. Guzman-Novoa, E. (2011). Genetic basis of disease resistance in the honey bee (Apis mellifera). **Comprehensive biotechnology**, 2nd ED. Elsevier. (4): pp. 763–767.

89. Haddad, N.J., Noureddine, A., AlShagour, B., Loucif-Ayad, W., ElNiweiri, M.A.A., Anaswah, E., *et* al., (2017). Distribution and variability of deformed wing virus of honeybees (Apis mellifera) in the Middle East and North Africa. **Insect Science**. Vol. 24(1), pp. 103– 113. DOI: 10.1111/1744-7917.12277

90. Haider, S.R., Reid, H.J., & Sharp, B.L. (2012). TricineSDS-PAGE. **Methods in Molecular Biology**. Vol. 869, pp. 81– 91. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_8.

91. Hall, D.M., & Steiner, R. (2019). Insect pollinator conservation policy innovations at subnational levels: Lessons for lawmakers. **Environmental Science and Policy.** Vol. 93, pp. 118–128. doi:10.1016/j.envsci.2018.12.026.

92. Hamissou, M., & Kurdmongkoltham, P. (2015). Molecular and cytotoxicity investigations of Phytolacca americana (l.) root, leaf, and berry extracts. **International Journal of Pharmacology and Toxicology**. Vol. 3(2), pp. 11. DOI:10.14419/ijpt.v3i2.5160

93. Hammond, G., & Blankenship, M. (2009). **Apis mellifera honey bee**. Animal Diversity Web. https://animaldiversity.org/accounts/Apis_mellifera/

94. Haraguchi, M., Motidome, M., & Gottlieb, O.R. (1988). Triterpenoid saponins and flavonol glycosides from *Phytolacca thyrsiflora*. **Phytochemistry**. Vol. 27(7), pp. 2291–6. https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80145-6

95. Harborne, J.B. (1984). Methods of Plant Analysis. Harborne. **Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. Pp. 1-36. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7_1

96. Hayta, S., Tasar, N., Cakilcioglu, U., & Gedik, O. (2014). Morphological, karyological features and pollen morphology of endemic Ebenus haussknechtii Bornm. Ex hub.-Mor. From Turkey: A traditional medicinal herb. **Journal of Herbal Medicine**. Vol. 4(3), pp. 141-146. DOI:10.1016/j.hermed.2014.04.006

97. Hendrickson, J.M., & Hilbert, K.F. (1931) Pokeweed berries not poisonous for chickens. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Vol. 78, pp. 556-558.

98. Hepburn, H.R., & Radloff, S.E. (2011). **Honeybees of Asia**. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp. 669. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16422-4

99. Hernandez, J., Hattendorf, J., Aebi, A., & Dietemann, V. (2022). Compliance with recommended *Varroa destructor* treatment regimens improves the survival of honey bee colonies over winter. **Research in Veterinary Science**. Vol. 144, pp. 1–10. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.025

100. Highfield, A. C., El Nagar, A., Mackinder, L. C. M., Noel, L., Hall, M. J. Ha, Martin, S. J., & Schroeder, D. C. (2009). *Deformed wing virus* implicated in overwintering honeybee colony losses. **Applied & Environmental Microbiology**. Vol. 75(22), pp. 7212-7220. Doi:10.1128/AEM.02227-09

101. Hoffmann, J.A. (2003). The immune response of Drosophila. **Nature**. Vol. 426(6962), pp. 33–38. DOI: 10.1038/nature02021

102. Hultmark, D. (2003). Drosophila immunity: Paths and patterns. **Current Opinion in Immunology**. Vol. 15(1), pp. 12–19. DOI: 10.1016/s0952-7915(02)00005-5

103. Hussein, R.A. & El-Anssary, A.A. (2018). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. **herbal medicine edited by Philip F. Builders**. Pp. 11-30. London, IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.76139

104. Infantidis, M.D. (1983). Ontogenesis of the mite Varroa jacobsoni in worker and drone honeybee brood cells. **Journal of Apicultural Research**. Vol. 22(3), pp. 200–206.

105. Ingle, K.P., Deshmukh, A.G., Padole, D.A., Dudhare, M.S., Moharil, M.P.,& Khelurkar, V.C. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification, and detection of bioactive compounds from plant extracts. **Journal of Pharmacognosy Phytochemistry**. Vol. 6(1), 32-36.

106. Irvin, J.D., & Uckun, F.M. (1992). Pokeweed antiviral protein: Ribosome inactivation and therapeutic Applications. **Pharmacology & Therapeutics**. Vol. 55, pp. 279–302.

107. Ishag, H.Z., Li, C., Huang, L., Sun, M.X., Ni, B., Guo, C.X., & Mao, X. (2013). Inhibition of Japanese encephalitis virus infection in vitro and in vivo by pokeweed antiviral protein. **Virus Research**. Vol. 171(1), pp. 89–96. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.032

108. Isman, M.M., & Machial, C.M. (2006). Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization. **Naturally Occurring Bioactive Compounds**. Vol. 3, pp. 29-44.

109. Jack, C.J., & Ellis, J.D. (2021). Integrated pest management control of Varroa destructor (Acari: Varroidae), the most damaging pest of (Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae)) colonies. **Journal of Insect Science**. Vol. 21(5), pp. 6. https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab058

110. Jaeckle, K.A., & Freemon, F.R. (1982). Pokewood poisoning. **Southern Medical Journal**. Vol. 74(5), pp.639-640. https://doi.org/10.1097/00007611-198105000-00038

111. Jakimiuk, K, Ptaszynska, A.A., Wiater, A., Kunat-Budzynska, M., & Tomczyk, M. (2022). Scleranthus perennis extracts prolonged the honeybee lifespan. **Planta Medica**. Vol. 88(15), pp. 1571-1572. DOI:10.1055/s-0042-1759347

112. Johnson, J.D., & Kim, Y. (2005). The role of leaf chemistry in Melampsora medusae infection of hybrid poplar: effects of leaf development and fungicide treatment. **Canadian Journal of Forest Research**. Vol. 35(4), pp. 763–771. DOI:10.1139/x05-009

113. Kevan, P. G., & Viana, B. F. (2003). The global decline of pollination services. **Biodiversity.** Vol. 4(4), pp. 3-8. Ontario: Canada. https://doi.org/10.1080/14888386.2003.9712703.

114. Kim, Y.O., Johnson, J.D., & Lee, E.J. (2005). Phytotoxic effects and chemical analysis of leaf extracts from three Phytolaccaceae species in South Korea. **Journal of Chemical Ecology**. Vol. 31(5), pp. 1175-1186. doi: 10.1007/s10886-005-4255-z.

115. Kingsbury, J.M., & Hillman, R.B. (1965). Pokeweed (Phytolacca) poisoning in a dairy herd. **Cornell Vet**. Vol.55(4), pp. 534-538.

116. Kirrane, M.J., de Guzman, L.I., Rinderer, T.E., Frake, A.M., Wagnitz, J., & Whelan, P.M. (2012). Age and reproductive status of adult Varroa mites affect grooming success of honey bees. **Experimental and Applied Acarology**. Vol. 58(4), pp. 423–430. DOI: 10.1007/s10493-012-9591-4

117. Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings: Biological Sciences.** Vol. 274(1608), pp. 303-313. doi: 10.1098/rspb.2006.3721.

118. Koch, P.E., Bonness, M.S., Lu, H., & Mabry, T.J. (1996). Protoplasts from Phytolacca dodecadra L'Herit (endod) and Phytolacca Americana L. (pokeweed). **Plant Cell Reports**. Vol. 15(11), pp. 824-828. DOI: 10.1007/BF00233148

119. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyan&am, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food & Bioproducts Processing.** Vol. 89(3), pp. 217-233. Sabah: Malaysia. Elsevier Publishing. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008

120. Krochmal, A., & LeQuesne , P. W. (1970). pokeweed (Phytolacca americana): Possible Source of a Molluscicide. **U.S.D.A. FOREST SERVICE RESEARCH PAPER NE-177**.

121. Kunzelman, J.I., Durako, M.J., Kenworthy, W.J., Stapleton, A., & Wright, J.L. (2005). Irradiance-induced changes in the photobiology of Halophila johnsonii. **Marine Biology**. Vol. 148, pp. 241-250.

122. Lady Bird Johnson Wildflower Center (Citado el 11 de jul 2017). Phytolacca americana. Recuperado de http://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=PHAM4.

123. Lampe, K.F., & Fagerstrom, R. (1968). **PLANT TOXICITY AND DERMATTIS: a manual for physicians**. Baltimore:US. William and Wilkens. pp. 231.

124. Lanzi, G., De Miranda, J.R., Boniotti, M.B., Cameron, C.E., & Lavazza, A. (2006). Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (Apis mellifera L.). **Journal of Virology**. Vol. 80(10), pp. 4998–5009. doi: 10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006

125. Laughton, A.M., Boots, M., & Siva-Jothy, M.T. (2011). The ontogeny of immunity in the honey bee, Apis mellifera L. following an immune challenge. **Journal of Insect Physiology**. Vol. 57(7), pp. 1023-1032. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.04.020

126. Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Masson, C., Chappe, B., & Ourisson, G. (1989). Attraction of the parasitic mite Varroa to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. **Science**. Vol. 245(4918), pp. 638–639. doi: 10.1126/science.245.4918.638.

127. Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of Drosophila melanogaster. **Annual Review of Immunology**. Vol. 25, pp. 697-743. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615

128. Lewis, W.H., & Smith, P.R. (1979). Poke root herbal tea poisoning. **JAMA**. Vol. 242(25), pp. 2759-2760. DOI: 10.1001/jama.242.25.2759

129. Lin, H., Dusse, C., & Huang, Z.Y. (2004). Short-term changes in juvenile hormone titers in honey bee workers due to stress. **Apidologie**. Vol. 35(3), pp. 319-327. https://doi.org/10.1051/apido:2004018

130. Liu, C.H., Mishra, A.K., Tan, R.X., Tang, C., Yang, H., & Shen, Y.F. (2006). Repellent and insecticidal activities of essential oils from Artemisia princeps and Cinnamomum camphora and their effect on seed germination of wheat and broad bean. **Bioresource Technology**. Vol. 97(15), pp. 1969–1973. doi: 10.1016/j.biortech.2005.09.002.

131. Liu, Y., Luo, J., Xu, C., Ren, F., Peng, C., Wu, G., & Zhao, J. (2000). Purification, Characterization, and Molecular Cloning of the Gene of a Seed-Specific Antimicrobial Protein from Pokeweed. **Plant Physiology**. Vol. 122(4), Pp.1015–1024. doi: 10.1104/pp.122.4.1015

132. Lodge, J.K., Kaniewski, W.K., & Tumer, N.E. (1993). Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Vol. 90, pp. 7089–7093.

133. Lourenço, A.P., Guidugli-Lazzarini, K.R., Freitas, F.C.P., Bitondi, M.M.G., Simoes, Z.L.P. (2013). Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Vol. 43(5), pp. 474–482. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.03.001.

134. Lu Y.-H., Wu C.-P., Tang C.-K., Lin Y.-H., Maaroufi H.O., Chuang Y.-C., Wu Y.-L. (2020). Identification of Immune Regulatory Genes in *Apis mellifera* through Caffeine Treatment. **Insects**. Vol. 11, pp. 516. doi: 10.3390/insects11080516

135. Macht, D.I. (1937) A pharmacological study of Phytolacca. **The Journal of American Pharmaceutical Association**. Vol. 26(7), pp. 594–599. https://doi.org/10.1002/jps.3080260704

136. Mack, R.B. (1982). Toxic encounters of the dangerous kind. Pokeweed. **North Carolina Medical Journal**. Vol. 43(5), pp. 365.

137. Maggi, M., Peralta, L., Ruffinengo, S., Fuselli, S., & Eguaras, M. (2012). Body size variability of Varroa destructor and its role in acaricide tolerance. **Parasitology Research**. Vol. 110(6), pp. 2333–2340. DOI: 10.1007/s00436-011-2768-7

138. Maginnis, M.S. (2018). Virus–Receptor Interactions: The Key to Cellular Invasion. **Journal of Molecular Biology**. Vol. 430(17), pp. 2590-2611. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.024

139. Majeed, T., & Bhat, N.A. (2022). **Plant Extracts: Applications in the Food Industry**, ch 12, Health benefits of plant extract. Pp. 269-294. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822475-5.00013-2

140. Mamet, T., Ge, Z.Z., Zhang, Y., & Li, C.M. (2018). Interactions between highly galloylated persimmon tannins and pectins. **International Journal of Biological and Macromolecules**. Vol. 106, pp. 410-417. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.039

141. Maness, L. (2012). Antiproliferative and Apoptotic Effects of Phytolacca Americana Extracts and their Fractions on Breast and Colon Cancer Cells. **Research Journal of Medicinal Plant**. Vol. 6(1), pp.17-26. DOI:10.3923/rjmp.2012.17.26.

142. Marinas, I., Baicea, C., Oprea, E., Geana, I., Gird, C.E., & Mariana, C. (2021). CHEMICAL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHYTOLACCA AMERICANA L. FRUITS AND LEAVES EXTRACTS. **FARMACIA**. Vol. 69(5), pp. 883-889. https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.5.9

143. Martin, S. J. (2001). The role of Varroa & viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. **Journal of Applied Ecology**. Vol. 38(5), pp. 1082- 1093. https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x

144. Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., *et al.* (2012). Global honey bee viral l&scape altered by a parasitic mite. **Science**. Vol. 336(6086), pp. 1304-1306. https://doi.org/10. 1126/ scien ce. 12209 41

145. Martin, S., & Brettell, L. (2019). Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. **Annual Review of Virology**. Vol. 6, pp. 49-69. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015700

146. Martin, S.J. (1994). Ontogenesis of the mite Varroa jacobsoni Oud. in worker brood of the honeybee Apis mellifera L. under natural conditions. **Experimental and Applied Acarology**. Vol. 18, pp. 87–100.

147. Matusiewicz, M., Margas, E., Mazurek, M., Wesolowska, L., & Skupinska, M. (2016). Viral infections of Apis mellifera, its importance, dynamics, diagnostics and treatment opportunities. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**. Vol. 97(3), pp. 211- 225.

148. McMenamin, A. J., & Genersch, E. (2015). Honey bee colony losses & associated viruses. **Current Opinion in Insect Science**. Vol: 8, pp. 121–129. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.015

149. Moreno, C. (2016). **Important and Health of Honey Bee (Apis Mellifera): A Review**. Scientific Writing and Presentations in English. DOI:10.13140/RG.2.2.24378.49603

150. Mortensen, A., Schmehl, D., & Elhis, J. (2013). **Featured Creatures: European Honey Bee**. Entomology and Nematology Department, University of Florida. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/eurohoneybee.htm

151. Moshi, M.J., & Mhame, P.P. (2013). Legislation on medicinal plants in Africa. **Medicinal Plant Research in Africa**. pp. 843–858. Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-12-405927-6.00023-0

152. Mourtzinos, I., Prodromidis, P., Grigorakis, S., Makris, D.P., Biliaderis, C.G., & Moschakis, T. (2018). Natural food colorants derived from onion wastes: Application in a yoghurt product. **ELECTROPHORESIS**. Vol. 39(15), 1975–1983. https://doi.org/10.1002/elps.201800073

153. Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2017). **Janeway`s Inmunobiology**. 9th ED. New York: US. Garland Science. Pp. 904.

154. Natural Remedies (citado el 14 junio de 2017). Pokeweed's Humble Beginnings. Recuperado de https://www.naturalremedies.org/pokeweed/

155. Nétien, G., Traisnel, M., & Vérain, A. (1986). **Médicaments homéopathiques**. 2nd Ed. Paris: France. Lavoisier–Techniques et documentation. pp 510.

156. Oldroyd, B.P. (1999). Coevolution while you wait, Varroa jacobsoni, a new parasite of western honeybees. **Trends in Ecology and Evolution**. Vol. 14(8), pp. 312–315. DOI: 10.1016/s0169-5347(99)01613-4

157. Oldroyd, B.P., & Nanork, P. (2009). Conservation of Asian Honey bees. **Apidologie.** Vol. 40(3), pp. 269-312. DOI:10.1051/apido/2009021

158. Onaran, A., & Saglam, H.D. (2016). Antifungal Activity of Some Plant Extracts against Different Plant Pathogenic Fungi. **International Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engineering**. Vol. 3(2), pp. 284-287.

159. Ongus, J.R., Peters, D.J., Bonmatin, J.M., Bengsch, E.J., Vlak, J.M., & Oers, M.M.V. (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite Varroa destructor. **Journal of General Virology**. Vol. 85(Pt12), pp. 3747– 3755. DOI: 10.1099/vir.0.80470-0

160. Pandey, A.K., Singh, P., & Tripathi, N.N. (2014). Chemistry and bioactivities of essential oils of some Ocimum species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Vol. 4(9), pp. 682–694. DOI:10.12980/APJTB.4.2014C77

161. Pasca, C., Matei, I.A., Diaconeasa, Z., Rotaru, A., Erler S., & Dezmirean, D.S. (2021). Biologically Active Extracts from Different Medicinal Plants Tested as Potential Additives against Bee Pathogens. **Antibiotics (Basel)**. Vol. 10(8), pp. 960. DOI:10.3390/antibiotics10080960.

162. Pascual, G., Silva, D., Vargas, M., Aranda, M., Cañumir, J.A., & López, M.D. (2022). Dietary Supplement of Grape Wastes Enhances Honeybee Immune System and Reduces Deformed Wing Virus (DWV) Load. **Antioxidants (Basel)**. Vol. 12(1), pp. 54. doi: 10.3390/antiox12010054.

163. Patra, J.K., Kim, E.S., Oh, K., Kim, H.J., Kim, Y., & Baek, K.H. (2014). Antibacterial effect of crude extract and metabolites of Phytolacca americana on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 14, pp. 343. https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-343

164. Patterson, F.D. (1929). Pokeweed causes Heavy losses in swine herd. Veterinary Medicine Small Animal Clinician. Vol. 24, pp.114.

165. Penuelas, J., & Estiarte, M. (1998). Can elevated CO2 affect secondary metabolism and ecosystem function? **Trends in Ecology and Evolution**. Vol. 13(1), pp. 20–24. DOI: 10.1016/s0169-5347(97)01235-4

166. Piechocka, J., Szymandera-Buszka, K., Kobus-Cisowska, J., Gramza-Michałowska, A., & Jędrusek-Golińska, A. (2019). The Effect of Thiamine Concentration on the Antioxidative Activity Indices in Tea Extracts. **Antioxidants**. Vol. 8(11), pp. 555. https://doi.org/10.3390/antiox8110555

167. Popova, M., Reyes, M., Le Conte, Y., & Bankova, V. (2014). Propolis chemical composition and honeybee resistance against Varroa destructor. **Natural Product Research**. Vol. 28(11), pp. 788-794. DOI: 10.1080/14786419.2014.881366

168. Pour P.M., Fakhri S., Asgary S., Farzaei M.H., Echeverría J. (2019). The Signaling Pathways, and Therapeutic Targets of Antiviral Agents: Focusing on the Antiviral Approaches and Clinical Perspectives of Anthocyanins in the Management of Viral Diseases. *Front.* **Pharmacol**. Vol. 10, pp. 1207. **doi: 10.3389/fphar.2019.01207.**

169. Poyet, J.L., & Hoeveler, A. (1997). cDNA cloning and expression of pokeweed antiviral protein from seeds in Escherichia coli and its inhibition of protein synthesis in vitro. **FEBS Letters**. Vol. 406(1-2), pp. 97–100. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00250-0

170. Pritchard, D. (2016). Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. **Journal of Apicultural Research**. Vol. 55(1), pp. 1-11. DOI:10.1080/00218839.2016.1196016

171. Qayyoum, M. A., Khan, B. S., & Bashir, M. H. (2013). Efficacy of Plant Extracts Against Honey Bee Mite, Varroa *destructor* (Acari: Varroidae). **World Journal of Zoology**. Vol. 8(2), pp. 212-216. Faisalabad: Pakistan. IDOSI Publications. DOI: 10.5829/idosi.wjz.2013.8.2.7484

172. Rahimi, A., Mirmoayedi, A., & Khanjani, M. (2014). Dispersion type of Varroa mite (Acari, Varroidae) Among the Bee hives in Kurdistan Province, Iran. **International Journal of Farming and Allied Sciences**. Vol. 3, pp. 255–259.

173. Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbronson, C., Mowery, J.D., Cohon, A., *et al.*, (2018). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Vol. 116(5), pp. 1792–1801. doi: 10.1073/pnas.1818371116.

174. Rasool Gassan, B. A. (2012). Medicinal Plants (Importance & Uses). **Pharmaceutica Analytica Acta.** Vol. 3(10), pp. e139. Penang: Malaysia. DOI: 10.4172/2153-2435.1000e139.

175. Ravichandran, S., Bhargavi, K. M., Rai, A., P&ey, T., Rajput, J., & Sri, R. M. M. (2023). Medicinal plants for curing human diseases. **Insight – Chinese Medicine.** Vol. 6(1), pp. 570. Punjab: India. PiscoMed Publishing. DOI:10.18282/i-cm.v6i1.570

176. Ravikiran, G., Raju A. B., & Venugopal, Y. (2011). Phytolacca Americana: A Review. **International Journal of Research in Pharmaceutical & Biomedical Sciences**. Vol. 2(3), pp. 942-946. &hra Pradesh: India.

177. Richards, J.C. (2001). **Curriculum Development in Language Teaching.** Cambridge University Press. Pp. 334.

178. Roberge, R., Brader, E., Martin, M.L., Jehle, D., Evans, T., Harchelroad, F., Magreni, G., Gesualdi, G., Belardi, C., Sayre, M., & Hartmann, A. (1986). The root of evil — pokeweed intoxication. **Annals of Emergency Medicine.** Vol. 15(4), pp. 470-473. https://doi.org/10.1016/S0196-0644(86)80191-3

179. Rosado-Aguilar, J. A., Aguilar-Caballero, A., Rodriguez-Vivas, R. I., Borges-Argaez, R., Garcia-Vazquez, Z., & Mendez-Gonzalez, M. (2010). Acaricidal activity of extracts from Petiveria alliacea (Phytolaccaceae) against the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol**. Vol. 168(3-4), pp. 299–303. Yucatan: Mexico. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.11.022

180. RosenKranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology & control of Varroa destructor. **Journal of Invertebrate Pathology**. Vol. 103, pp. S96-S119. Elsevier Publishing. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016

181. Roth, M.A., Wilson, J.M., Tignor, K.R., & Gross, A.D. (2020). Biology and management of Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) in Apis

mellifera (Hymenoptera: Apidae) colonies. **Journal of Integrated Pest Management**. Vol. 11(1), pp. 1–8. https://doi.org/10.1093/jipm/pmz036

182. Rothenbuhler, W. (1964). Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. **Animal Behaviour**. Vol. 12, pp. 578–583.

183. Rothenburg, S., & Brennan, G. (2020). Species-Specific Host–Virus Interactions: Implications for Viral Host Range and Virulence. **Trends in Microbiology**. Vol. 28(1), pp. 46–56. doi: 10.1016/j.tim.2019.08.007.

184. Rupp, M., Palm, T., & Michiels, H.G. (2017). **Die Kermesbeere – eine invasive Art in lichten Wäldern.** AFZ-DerWald. Vol. 9, pp. 38–42.

185. Salim, A.A., Chin, Y-W., & Kinghorn, A.D. (2008). Drug Discovery from Plants. **Bioactive Molecules and Medicinal Plants**. pp. 1–24. Berlin, Heidelberg: Springer. DOI:10.1007/978-3-540-74603-4_1

186. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional Complementary Alternative Medicine**. Vol. 8(1), pp. 1–10.

187. Schirmel, J. (2020). Differential effects of American pokeweed (Phytolacca americana) invasion on ground-dwelling forest arthropods in southwest Germany. **Biological Invasions**. Vol. 22(4), pp. 1–10. https://doi.org/10.1007/s10530-019-02180-w.

188. Schmehl, D.R., Tomé, H.V., Mortensen, A.N., Martins, G.F., & Ellis, J.D. (2016). Protocol for the in vitro rearing of honey bee (Apis mellifera L.) workers. **Journal of Apicultural Research**. Vol. 55(2), pp. 113–129. DOI:10.1080/00218839.2016.1203530

189. Sedlacek-Bassani, J., GRASSI, T.L.M., DINIZ, J.C.P., & PONSANO, E.H.G. (2020). Spices as natural additives for beef burger production. **Food Science and Technology Campinas**. Vol. 40(4), 817-821. https://doi.org/10.1590/fst.21019

190. Shaddel-Telli, A.A., Maheri-Sis, N., Aghajanzadeh-Golshani, A., Abolfazl, A.D., Hosein, C., & Mozhgan, M. (2008). Using Medicinal Plants for

Controlling Varroa Mite in Honey Bee Colonies. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. Vol. 7(3), pp. 328-330.

191. Sharaf EL-Din, H., & Elenany, Y.E. (2020). Assessment of Newly Registered Varroa destructor Infestation Control Acaricides in The Colonies of Honey Bees Apis mellifera L. Under Egyptian Conditions. **Journal of Plant Protection and Pathology**. Vol. 11(10), pp. 489-491. DOI:10.21608/JPPP.2020.124895

192. Sharma, A., Nagraik, R., Sharma, S., Sharma, G., P&ey, S., Azizov, S., *et al*. (2022). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Ficus palmata*: Antioxidant, Antibacterial & antidiabetic studies. **Results in Chemistry**. Vol. 4. Solan: India. Elsevier B. V. Publishing https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100509.

193. Shi, M., Lin, X., Tian, J., Chen, L., & Chen, X. (2016a). Redefining the invertebrate RNA virosphere. **Nature**. Vol. 540(7634), pp. 539-543. DOI: 10.1038/nature20167

194. Simone-Finstrom, M.D., Foo, B., Tarpy, D.R., & Starks, P.T. (2014). Impact of food availability, pathogen exposure, and genetic diversity on thermoregulation in honey bees (Apis mellifera). **Journal of Insect behavior**. Vol. 27(4), pp. 527-539. DOI:10.1007/s10905-014-9447-3

195. Skalicky, V. (1972). Líčidlo jedlé (Phytolacca esculenta VAN HouTTE), nový zplanělý druh květeny ČSSR a NDR a rozšíření druhů Phytolacca esculenta VAN HouTTE a P. americana L. v ČSSR Speise-Kermesbeere (Phytolacca esculenta VAN HOUTTE), eine neue verwilderte Art der Flora der ČSSR und DDR und Verbreitung der Arten Phytolacca esculenta VAN HOUTTE und P. americana L. in der ČSSR. Preslia, Praha. Vol. 44, pp. 364-369. (in Czech with German summary)

196. Skowronek, P., Wójcik, L & Strachecka, A. (2022). Impressive Impact of Hemp Extract on Antioxidant System in Honey Bee (*Apis mellifera*) Organism. **Antioxidants (Basel)**. Vol. 11(4), pp. 707. DOI: 10.3390/antiox11040707

197. Smith, G.W., & Constable, P.D. (2002). Suspected pokeweed toxicity in a Boer goat. **Veterinary and Human Toxicology**. Vol. 44(6), pp. 351-353.

198. Smith, K.M., Loh, E.H., Rostal, M.K., Zambrana-Torrelio, C.M., Mendiola, L., & Daszak, P. (2013). Pathogens, pests, and economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses. **EcoHealth**. Vol. 10(4), pp. 434-445. DOI:10.1007/s10393-013-0870-2

199. Spivak, M., & Reuter, G.S. (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies Apis mellifera bred forhygienic behavior. **Apidologie**. Vol. 32(6), pp. 555–565.

200. Starks, P.T., Blackie, C.A., & Seeley, T.D. (2000). Fever in honeybee colonies. **Naturwissenschaften**. Vol. 87(5). Pp. 229-231. doi: 10.1007/s001140050709.

201. Stein, Z.L.G. (1979). Pokeweed-induced gastroenteritis. **American Journal of Hospital Pharmacy**. Vol. 36(10), pp. 1303.

202. Strachecka, A., Olszewski, K., & Paleolog, J. (2015). Curcumin Stimulates Biochemical Mechanisms of *Apis Mellifera* Resistance and Extends the Apian Life-Span. **Journal of Apicultural Science**. Vol. 59(1), pp. 129-141. DOI:10.1515/JAS-2015-0014

203. Strand, M.R. (2008). The insect cellular immune response. **Insect Science**. Vol. 15(1), pp. 1-14. https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x

204. Sun, B., Ricardo da Silva, J.M., & Spranger, I. (1998). Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 46(10), pp. 4267-4274. https://doi.org/10.1021/jf980366j

205. Sussner, U., Abel, G., Schulte, R., & Kreis, W. (2004). Isolation and Characterisation of a Cysteine Protease Phytolacain G from Phytolacca americana Roots. **Planta Medica**. Vol. 70(10), pp. 942-947. doi: 10.1055/s-2004-832621.

206. Swamy, M. K. & Sinniah, U. R. (2015). A comprehensive review on the phytochemical constituents & pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth: an aromatic medicinal plant of industrial importance. **Molecules**. Vol. 20(5), pp. 8521–8547. Serdang: Malaysia. https://doi.org/10.3390/molecules20058521

207. Takhtajan, A. (1997). **Diversity and classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York. 620.

208. Tanner, R., & Fried, G. (2020). **Study on Invasive Alien Species – Development of risk assessments to tackle priority species and enhance prevention**. European Union. pp. 771-869.

209. TELTOW, G.J., IRVIN, J.D., & ARON, G.M. (1983). Inhibition of Herpes Simplex Virus DNA Synthesis by Pokeweed Antiviral Protein. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. Vol. 23(3), pp. 390-396. doi: 10.1128/aac.23.3.390

210. Tentcheva, D., Gauthier, L., Bagny, L., Fievet, J., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., & Bergoin, M. (2006). Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in Apis mellifera and Varroa destructor. **Apidologie**. Vol. 37(1), pp. 41-50. DOI:10.1051/apido:2005057.

211. Tipaz-Tipaz, E., Restrepo-Burgos, C., Solarte-Niquinas, P., & Mena-Guerrero, N. (2019). Phytochemical characterization of Phytolacca Americana leaves & determination of their antifungal potential. **Informador Tecnico**. Vol. 84(1), pp. 18-34. Narino: Colombia. https://doi.org/10.23850/22565035.1804

212. Tomlinson, J.A., Walker, V.M., Flewett, T.H., & Barclay, G.R. (1974). The inhibition of infection by cucumber mosaic virus and influenza virus by extracts from Phytolacca americana. **Journal of General Virology**. Vol. 22(2), pp. 225-232. DOI: 10.1099/0022-1317-22-2-225

213. Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A. Y., Chantawannakul, P., & McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. Trends Parasitol. Vol. 36(7), pp. 592-606. DOI: 10.1016/j.pt.2020.04.004

214. Trunjaruen, A., Luecha, P., & Taratima, W. (2022). Micropropagation of pokeweed (*Phytolacca americana* L.) and comparison of phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity between pokeweed callus and other parts. **PeerJ.** Vol.10, pp. e12892. http://doi.org/10.7717/peerj.12892

215. Tyler, V.E. (1987). **The New Honest Herbal: A sensible guide to herbs and related Remedies**. 2nd ED. Philadelphia: US. Geaorge F.Stickley. pp. 254.

216. Uckun, F.M., Rajamohan, F., Pendergrass, S., Ozer, Z., Waurzyniak, B., & Mao, C. (2003). Structure-based design and engineering of a nontoxic recombinant pokeweed antiviral protein with potent antihuman immunodeficiency virus activity. **Antimicrob Agents Chemother**. Vol. 47(3), pp. 1052-1061. DOI: 10.1128/AAC.47.3.1052-1061.2003

217. Uckun, F.M., Rustamova, L., Vassilev, A.O., Tibbles, H.E., & Petkevich, A.S. (2005). CNS activity of Pokeweed anti-viral protein (PAP) in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). **BMC Infectious Diseases**. Vol.5, pp. 9. doi: 10.1186/1471-2334-5-9.

218. Unger, P., & Guzman-Novoa, E. (2010). Maternal effects on the hygienic behavior of Russian x Ontario hybrid honeybees (Apis mellifera L.). **Journal of Heredity**. Vol. 101(1), pp. 91-96. doi:10.1093/jhered/esp092.

219. Ussery, M.A., & Irvin, J.D. (1977). Hardesty, B. Inhibition of poliovirus replication by a plant antiviral peptide. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Vol. 284, pp. 431-440.

220. Valle, E., Vergnano, D., & Nebbia, C. (2016). Suspected Pokeweed (Phytolacca americana L.) Poisoning as the Cause of Progressive Cachexia in a Shetland Pony. **Journal of Equine Veterinary Science**. Vol. 42, Pp. 82-87. DOI:10.1016/j.jevs.2016.04.013

221. van Acker, S.A., van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**. Vol. 20(3), pp. 331-342. doi: 10.1016/0891-5849(95)02047-0.

222. Van Wyk A.S., & Prinsloo, G. (2018). Medicinal plant harvesting, sustainability and cultivation in South Africa. **Biological Conservation**. Vol. 227, pp. 335-342. DOI:10.1016/j.biocon.2018.09.018

223. Vanichpakorn, P., Ding, W., & Cen, X.X. (2010). Insecticidal activity of five Chinese medicinal plants against Plutella xylostella L. larvae. **Journal of**

Asia-Pacific Entomology. Vol.13, pp. 169-173. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2009.12.006

224. Vizioli, J., & Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. **Trends in Pharmacological Sciences**. Vol. 23(11), pp. 494-496. DOI: 10.1016/s0165-6147(02)02105-3

225. Watanabe, K., Kawasaki, T., Sako, N., & Funatsu, G. (1997). Actions of Pokeweed Antiviral Protein on Virus infected Protoplasts. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. Vol. 61 (6), pp. 994 997. https://doi.org/10.1271/bbb.61.994

226. Weaver, D.K., Subramanyam B. (2000). Botanicals. Eds: B. Subramanyam, & D.W. Hagstrum. **Alternatives to Pesticides in Stored-Product IPM**. pp: 303-320. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4353-4_11.

227. Williams, G. R., Troxler, A., Retschnig, G., Roth, K., Yanez, O., Shutler, D., *et al.* (2015). Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. **Scientific Reports**. Vol. 5:14621. https://doi.org/10.1038/srep1 4621

228. Wishon, Lisa Maness. (2010). **Anticancer Activity Of Phytolacca Americana Root Extracts And Their Fractions On Breast And Colon Cancer Cells.** Doctoral dissertation, North Carolina Agricultural and Techniccal State University. Pp. 114. https://digital.library.ncat.edu/dissertations/5

229. Wren, R.C. (1900). **Potter's Encyclopedia of Botanical Drugs and Preparations**. Potter and Clarke, Ltd., London, pp: 381-391.

230. Wright, C.W. (2005). Plant derived antimalarial agents: New leads and challenges. **Phytochemistry Reviews**. Vol. 4(1), pp. 55-61. DOI:10.1007/s11101-005-3261-7

231. Yanez, O., Jaffe, R., Jarosch, A., Fries, I., Moritz, R.F.A., Paxton, R., & de Miranda, J.R. (2012). Deformed wing virus and drone mating lights in the honey bee (Apis mellifera), implications for sexual transmission of a major honey bee virus. **Apidologie**. Vol. 43(1), pp. 17-30. DOI:10.1007/s13592-011-0088-7

232. Yañez, O., Piot, N., Dalmon, A., de Miranda, J.R., Chantawannakul, P., Panziera, D., *et al.*, (2020). Bee viruses: routes of infection in hymenoptera. **Frontiers in Microbiol**ogy. Vol. 11, pp. 943. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00943

233. Yang, W.H., Wieczorck, M., Allen, M.C., & Nett, T.M. (2003). Cytotoxic activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-pokeweed antiviral protein conjugates in cell lines expressing GnRH receptors. **Endocrinology**. Vol. 144(4), pp. 1456-1463. doi: 10.1210/en.2002-220917.

234. Zarling, J. M., Moran, P. A., Haffar, O., Sias, J., Richman, D. D., Spina, C. A., *et al.* (1990). Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4 positive cells by monoclonal antibodies. **Nature**. Vol. 347(6288), pp. 92-95. London: United Kingdom.

235. Zheleva-Dimitrova, D.Z. (2013). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of Amorpha fruticosa L. and Phytolacca americana L. **Pharmacognosy Magazine**. Vol. 9(34), pp. 109-113. doi: 10.4103/0973-129

236. Zhou, X., Seto, S.W., Chang, D., Kiat, H., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K., & Bensoussan, A. (2016). Synergistic effects of Chinese herbal medicine: a comprehensive review of methodology and current research. **Frontiers in Pharmacology**. Vol. 7. doi: 10.3389/fphar.2016.00201

Abstract

This research was carried out between 2021 and 2024 in the Biodiversity Laboratory of Plant Protection Department at the Faculty of Agricultural Engineering at Damascus University. The aim of this study was to determine some chemical compounds of Phytolacca americana L. and to evaluate the effect of aqueous extracts of this plant on lifespan, stimulation of the immune system of honeybee workers (Apis mellifera) and control of the Varroa mite Varroa destructor Oud.

Bee samples were collected from the apiary of Faculty of Agriculture, Damascus University between March and September of the years (2021 to 2023). A set of specialized primers was used to detection of the most widespread honey bee viruses in the world. Chemical analysis of the aqueous extracts of Phytolacca americana L. parts (leaves - fruits - roots - branches) show that all extracts contained different amounts of phenols, tannins and saponins. The highest content of phenols and tannins was found in aqueous extract of leaves and reached 128 µg/ml and 79.2 µg/ml, respectively.

The aqueous extracts of the different parts showed a significant positive effect on the average lifespan of honeybee workers compared to the control but there were no significant differences between the two treatment methods (spraying or feeding). The highest effect was achieved with the leaf extract at a concentration of 100 ppm, where the average number of worker bees remaining alive was 76%. The average

extension of the lifespan of the worker bees was 52.6% compared to the untreated control.

The leaf extract at a concentration of 100 ppm also gave positive results by spraying to control Varroa mites, with an average relative effectiveness of 83.3% compared to the control treated with distilled water spraying. The average ratio between pre- and post-application shedding (double), which is the number of times the number of Varroa mites falling after 24 hours of treatment compared to the average natural shedding before treatment, was 6.2 times compared to the control, which was 1.6 times.

In addition, when studying the effectiveness of leaf extract at a concentration of 100 ppm in stimulating the immune system of honey bee workers, antimicrobial peptides (heminopticin, abacin, defensin and apidecin) were detected, and the results showed an increase in the number of honey bee workers that survived and those fed a DWV virus suspension with the plant extract survived for 12 days, compared to the workers fed only a sugar solution and survived for 10 days, and the workers fed a sugar solution and a virus suspension lived only three days.

Keywords: Phytolacca americana L., honey bees, Varroa, DWV virus, plant extracts, phenols.

Syrian Arab Republic

Damascus University

Faculty of Agricultural Engineering

Department of Plant Protection

Effect of *phytolacca Americana* extract on the honey bee Immune system and determination of its protected role against of some pests

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Agricultural engeeniring – Plant Protection

By

Eng: Mai Omar Sharaf

Supervisors

Dr. Nawras Al-Abrass
Researcher
National Commission for Biotechnology (NCBT)
Damascus, Syria

PHD: Ahmad Mouhanna
professor
Department of plant protection
Damascus University

Damascus 2024