المستخلصات النباتية ودورها في تحفيز إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات لدى شغالات نحل العسل *Apis mellifera* L.

همام شعبان برهوم[2,1]، هشام أديب الرز[1] وأحمد محمد مهنا[1]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية؛

(2) مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: A.M.Mouhanna@gmail.com

الملخص

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، 36(3): 250–258.

هدفت هذه الدراسة لمعرفة دور بعض المستخلصات النباتية في تحفيز الجهاز المناعي لنحل العسل بالإضافة لتأثيرها في طول فترة حياتها. جمعت عينات من شغالات نحل العسل في شهر نيسان/أبريل لعام 2016. استخدم لذلك خمسة مستخلصات نباتية (زيت نبات الشيح الأبيض العشبي، زيت نبات الزعتر البري، زيت نبات النارنج، المستخلص المائي لأوراق نبات الغار والمستخلص المائي لأوراق نبات المليسة). تراوحت الجرعة النصفية المميتة بين 117.25 جزء بالمليون لزيت نبات الشيح الأبيض العشبي و476.1 جزء بالمليون للمستخلص المائي لأوراق نبات الغار وذلك بعد 24 ساعة من معاملة شغالات النحل. تفوقت جميع المستخلصات النباتية المدروسة على الشاهد معنوياً من حيث زيادة متوسط طول فترة حياة شغالة نحل العسل. كما أظهرت النتائج قدرة المستخلصات النباتية في تخليق وتركيب الببتيدات المضادة للميكروبات وذلك بشكل متفاوت تبعاً للتركيز المستخدم والفترة الزمنية. تعد هذه الدراسة أولية حيث ستمهد لإجراء المزيد من الدراسات بهدف وضع البرامج الوقائية والعلاجية المناسبة لنحل العسل.

كلمات مفتاحية: الببتيدات المضادة للميكروبات، الجهاز المناعي، نحل العسل، المستخلصات النباتية.

المقدمة

يسهم نحل العسل بدورٍ أساسيٍ في عملية تلقيح النباتات والتي تشكل جزءاً مهماً من السلسلة الغذائية (Morse, 1997). انحصرت أهمية نحل العسل سابقاً في إنتاج العسل، وعرف بعدها أهمية المنتجات الأخرى (الشمع وحبوب الطلع والغذاء الملكي)، التي لا تقل أهمية عن العسل من الناحية الاقتصادية. تُعدُّ تربية نحل العسل مصدراً هاماً في دخل المزارع الصغيرة والمتوسطة وذلك لقلة تكاليف الإنتاج، حيث ازداد الإنتاج العالمي من العسل بشكل مطرد عبر العقود الخمسة الماضية. يشكل الإنتاج في سورية ما قيمته 0.173% من الإنتاج العالمي للعسل (FAOSTAT, 2016). يتعرض الإنتاج العالمي من المحاصيل الزراعية لخسائر ملموسة من أحد أسبابها انخفاض أعداد خلايا نحل العسل، حيث عرفت هذه الظاهرة بمتلازمة اضطراب وفقد المستعمرات Colony Collapse Disorder syndrome (CCDs) (Cox-Foster *et al*., 2007). في سورية انخفضت أعداد خلايا النحل منذ عام 2011 حتى عام 2016 حوالي 27.3% (المجموعة الإحصائية‘ 2016)، إلا أن الأرقام الحقيقية أكثر من ذلك، بالرغم من أن المسبب الرئيس لهذه الظاهرة لم يحدد بشكل دقيق حتى الآن.

أشارت بعض الدراسات إلى أن الأسباب تعود لتداخل إجهادات أحيائية ولا أحيائية في آن واحد (van Engelsdorp & Meixner, 2010)، في حين أشار Nazzi وآخرون (2012) إلى أن أهم الأسباب قد يعود للإصابة الكامنة بفيروسات نحل العسل. وعليه تركزت الدراسات اللاحقة حول كشف وتحديد فيروسات نحل العسل المنتشرة، وكذلك حول آليات زيادة القدرة المناعية لنحل العسل تجاه الفيروسات، الأمر الذي يساعد على زيادة قوة البنية الدفاعية لنحل العسل وإنتاجيته.

توجد في نحل العسل، كغيره من الكائنات الحية، آليات دفاعية تحميه من الإجهادات الأحيائية واللا أحيائية (كالأمراض والطفيليات والمبيدات الحشرية وغيرها)، وتبين أن لهذه الدفاعات دوراً مهماً في الحماية على مستوى المستعمرة، وليس بالضرورة على مستوى الأفراد (Wilson-Rich *et al*., 2007). كما أن التخصصية العالية في عمل نحل العسل تساعد في كثير من الحالات في الحدّ من انتشار المرض

http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-036.3.250258
© 2018 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

ضمن مستعمراته كتنظيف المستعمرة بإزالة اليرقات المصابة والتخلص منها (Panasiuk *et al*., 2010).

تشير الدراسات الحديثة إلى أن الجهاز المناعي الطبيعي للحشرات له القدرة على تنشيط الاستجابات المناعية طويلة الأمد تجاه العامل الممرض وهذا يعاكس الاعتقادات السابقة بأن الحشرات تفتقر للذاكرة المناعية (Rodrigues *et al*., 2010). ساعد تحليل تسلسل النيكليوتيدات لكامل "جينوم" نحل العسل على التعرف على مكونات الجهاز المناعي وآلية تطورها وارتباطها بالإشارات الخلوية (Evans *et al*., 2006). وصِفَ حتى الآن أكثر من 1000 ببتيد مضاد للميكروبات ضمن جميع الكائنات الحية (Wimley & Hristova, 2011)، منها حوالي 200 ببتيد ضمن الحشرات (Li *et al*., 2012). كما تبيّن أن "جينوم" بعض الحشرات يشفر عدداً كبيراً من الببتيدات كالتي تتبع جنس ذبابة الخل *Drosophila* وجنس البعوض *Anopheles*. بالمقابل فإن عدد هذه الببتيدات ينخفض عند بعضها الآخر كنحل العسل (Evans *et al*., 2006).

كشف في نحل العسل عن أربع عائلات ببتيدية ضمن السائل اللمفاوي، كما وجدت أربعة ببتيدات مختلفة في الغذاء الملكي تنتج من قبل الشغالات (Romanelli *et al*., 2011)، وقد أثبت كفاءة معظمها ضد طيف واسع من البكتيريا، ووحيدات الخلية Protozoa والفطور، والفيروسات (Casteels *et al*., 1993, 1989).

أجريت عدة دراسات حول انتشار فيروسات نحل العسل في سورية (Barhoum *et al*., 2017). تأتي هذه الدراسة المخبرية كخطوة أولية بهدف معرفة دور المستخلصات النباتية التي تملك خصائص مضادة للعوامل الممرضة ومنها الفيروسية في تحفيز الجهاز المناعي لنحل العسل عن طريق الكشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات بالإضافة لدراسة تأثيرها في طول فترة حياة نحل العسل.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات

جمعت عينات من شغالات نحل العسل بشكل عشوائي من منحل كلية الزراعة، جامعة دمشق، ونفذ البحث في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية والهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، وذلك خلال شهر نيسان/أبريل لعام 2016. شملت كل عينة 15 شغالة وضعت ضمن طبق "بتري" 15x15 سم. غذيت الشغالات بمحلول سكري خلال فترة التجربة التي أجريت ضمن ظروف المختبر (رطوبة نسبية 18–37%، حرارة 17–25°س) (Ebert *et al*., 2007).

المستخلصات النباتية

استخدمت ثلاثة أنواع من الزيوت العطرية النباتية وهي زيت نبات الشيح الأبيض العشبي (*Artemisia herba-alba*) وزيت نبات الزعتر البري (*Thymus serpyllum*) وزيت نبات النارنج (*Citrus aurantium*)، والتي استخلصت وفق طريقة التقطير بالبخار (Sefidkon *et al*., 2004) باستخدام جهاز التقطير Soxhlet لمدة 90 دقيقة. أجري الاستخلاص على 100 غ من الأوراق الجافة لكل نبات. تم الحصول على مستخلصين مائيين هما ماء ورق نبات الغار (*Laurus nobilis*) وماء ورق نبات المليسة (*Aloysia citriodora*) وحضرت وفق طريقة Hernandez وآخرون (1994)، حيث وزن 20 غ من أوراق كل نبات، ومن ثم طحنت بإضافة 100 مم من الماء البارد، وتركت لمدة ثلاث ساعات عند حرارة المختبر، بعدها عرضت للطرد المركزي بسرعة 1500 د/د لمدة عشرة دقائق وأخذ الرائق العلوي.

تقويم المستخلصات النباتية ورسم منحنيات الحياة

قُومت سمية الزيوت والمستخلصات للنباتات المدروسة تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Prisco وآخرون (2013) وذلك لمعرفة التراكيز التي تحفز الجهاز المناعي ولا يكون لها أثر سلبي أو قاتل في شغالة نحل العسل. مزجت الزيوت العطرية الثلاثة بالأسيتون وحضرت التراكيز التالية: 50، 150، 250، 350، 450 و 550 جزء بالمليون. بعدها عوملت كل شغالة بـ 1 ميكرولتر من كل تركيز عند منطقة الظهر بالإضافة إلى شاهد يحتوي على الأسيتون فقط، وبالمثل بالنسبة للمستخلصين المائيين، إلا أن الشاهد كان ماء مقطر. حضنت الشغالات في جو المختبر (رطوبة نسبية 18–37% وحرارة 17–25 °س) (Ebert *et al*., 2007) لمدة 28 ساعة، وكررت التجربة ثلاث مرات. قدرت الجرعة النصفية المميتة ($LD_{50\%}$) بعد 24 ساعة باستخدام تحليل بروبيت ورسمت منحنيات الحياة وفق تحليل كابلان–ماير (Kaplan-Meier analysis) باستخدام برنامج XLSTAT (Addinsoft, 2015).

تحفيز الببتيدات المضادات للميكروبات

استخدمت ثلاثة تراكيز من كل مستخلص نباتي وطبق كل تركيز بشكل منفصل على عينة من شغالات النحل (15 شغالة) بمعاملة منطقة الظهر لكل شغالة بواحد ميكرولتر من المستخلص وذلك ضمن أطباق "بتري" 15×15 سم مجهزة بفتحات تهوية ومحلول مغذي ضمن الظروف البيئية المذكورة سابقاً. يوضح الجدول 1 التراكيز المستخدمة لكل مستخلص نباتي.

جدول 1. تراكيز المستخلصات النباتية المستخدمة.

Table1. Concentrations of plant extracts used.

التركيز الأول (جزء بالمليون) 1st concentration (ppm)	التركيز الثاني (جزء بالمليون) 2nd concentration (ppm)	التركيز الثالث (جزء بالمليون) 3rd concentration (ppm)	Plant extract	المستخلص النباتي
20	60	100	*Artemisia herba-alba*	زيت الشيح الأبيض العشبي
40	120	200	*Thymus serpyllum*	زيت الزعتر البري
50	150	250	*Citrus aurantium*	زيت النارنج
100	200	300	*Laurus nobilis*	المستخلص المائي لأوراق الغار
60	160	260	*Aloysia citriodora*	المستخلص المائي لأوراق المليسة
0	0	0	Control	الشاهد

جمع السائل اللمفاوي لشغالات نحل العسل

جمع السائل اللمفاوي لشغالات نحل العسل خلال الفترات الزمنية 2، 4، 8، 12، 16 ،20 و 24 ساعة وذلك عبر إجراء جرح طفيف في منطقة البطن للشغالة، ومن ثم سحب السائل اللمفاوي عبر الماصة بمعدل 5–10 ميكرولتر/الشغالة ونقلت مباشرة إلى أنبوب ابندورف (0.5 مل) يحتوي على واحد ميكرولتر من مادتي PTU (P-7629) و Aprotinin (A-4529) بتركيز 0.1 ميللي غرام/مل، اللذان يمنعان عملية التّصبّغ أو التحول إلى "الميلانين" Melanization لعينة السائل اللمفاوي. بعدها حفظت العينات عند حرارة –20 °س لحين الاستخدام.

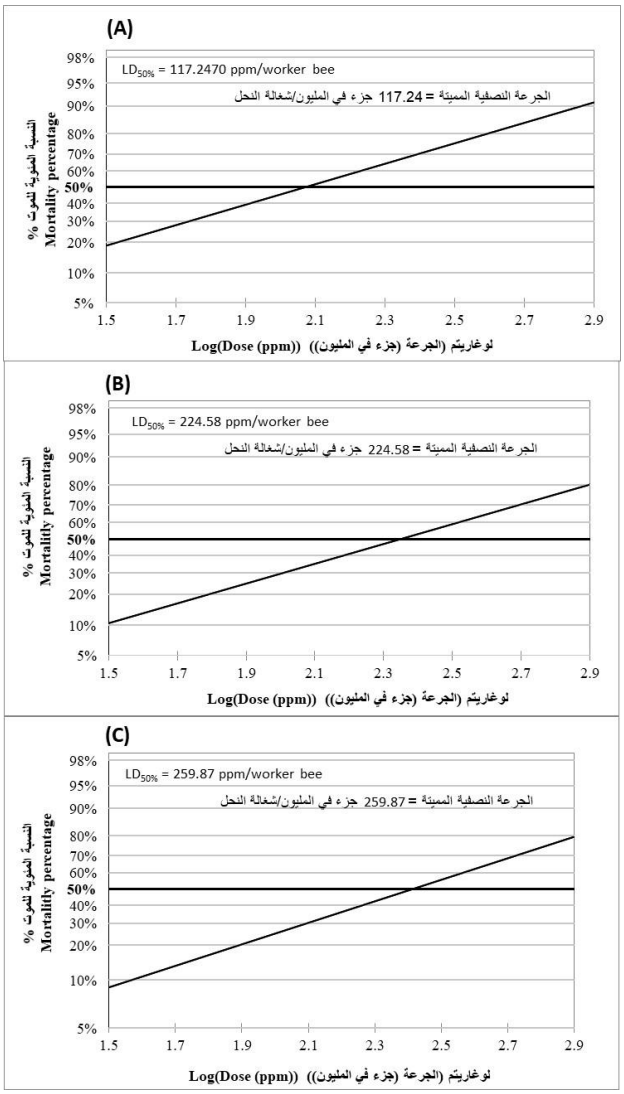
الكشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات

كشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات عبر هلامة "البولي أكريلامايد"SDS Polyacrylamide Gel وفق الطريقة الموصوفة من قبل Haider وآخرون (2012)، وذلك بحل عينة السائل اللمفاوي بمحلول 100 mM Tris-HCl, pH 6.8، يحتوي على 4% SDS، 17% glycerol و 0.8 M من 2-mercaptoethanol، بعدها سخنت لمدة ثلاث دقائق عند حرارة 95 °س، وحقنت ضمن هلامة الأكريلاميد ورحلت باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي Biorad. استخدم سلم الوزن الجزيئي البروتيني المعياري 1060–26600 كيلو دالتون (Sigma M3546).

النتائج

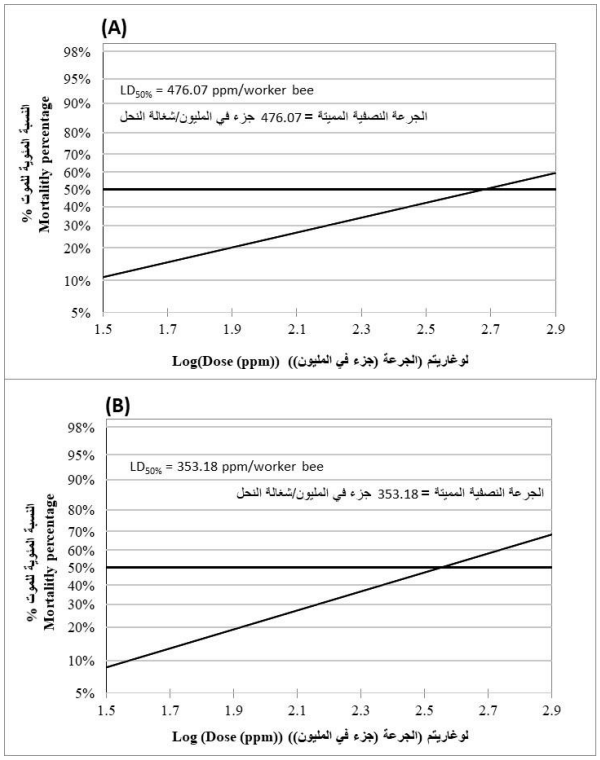
تقويم سمية المستخلصات النباتية المستخدمة

بينت النتائج تفاوتاً في سمية المستخلصات النباتية عند استخدام زيت نبات الشيح الأبيض العشبي، والزعتر البري والنارنج، حيث بلغت الجرعة النصفية المميتة ($LD_{50\%}$) 117.25، 224.58، 259.87 جزء بالمليون/شغالة النحل، على التوالي (شكل 1)، في حين بلغت الجرعة النصفية المميتة عند استخدام المستخلص المائي لأوراق نباتي الغار والمليسة 476.1، 353.18 جزء بالمليون/شغالة النحل، على التوالي (شكل 2).



شكل 1. الجرعة النصفية المميتة لزيت نبات الشيح الأبيض العشبي (A)، والزعتر البري (B)، والنارنج (C).

Figure1. The lethal dose LD_{50} for plant oils of *A. herba-alba* (A), *T. serpyllum* (B) and *C. aurantium* (C).

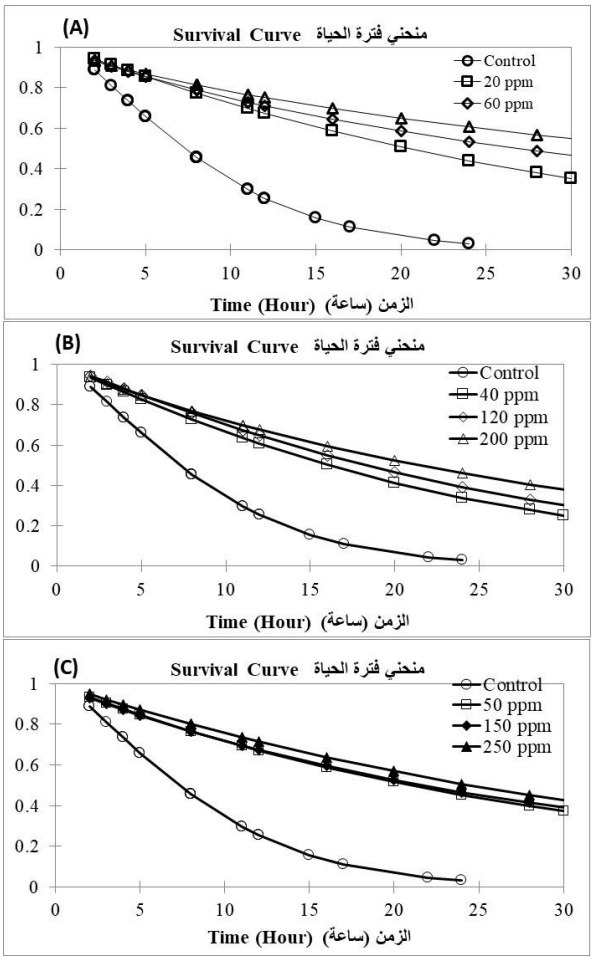


شكل 2. الجرعة النصفية المميتة للمستخلص المائي لأوراق نبات الغار (A) والمليسة (B).

Figure 2. Lethal dose LD_{50} for aqueous extract of plant leaves of *L. nobilis* (A) and *A. citriodora* (B).

تأثير المستخلصات النباتية في طول فترة حياة شغالات النحل

اختيرت ثلاثة تراكيز من كل مستخلص نباتي (جدول 1) بهدف دراسة تأثيرها في طول فترة حياة شغالة النحل. حسب متوسط طول فترة حياة شغالة النحل Mean survival time، كما حسب وسيط طول فترة الحياة Median survival time والذي يشير إلى الفترة الزمنية التي يكون عندها نصف عدد العينة المدروسة على قيد الحياة. أظهرت النتائج تبعاً لمنحنيات طول فترة الحياة التأثير الإيجابي للمستخلصات النباتية حيث ارتفعت قيم كل من متوسط طول فترة حياة الشغالة والوسيط مقارنة بالشاهد في جميع المستخلصات النباتية المستخدمة (شكل 3 و4). فكان أعلاها المستخلص المائي لأوراق نبات المليسة والذي وصل إلى 18.55 ساعة/شغالة النحل وذلك من حيث مستوى متوسط طول فترة حياة شغالة النحل ومتفوقاً معنوياً على مستخلص زيت نبات الزعتر (16.73 ساعة/شغالة النحل) والشاهد (8.71 ساعة/شغالة النحل) (جدول 2). في حين لم يكن هناك فروق معنوية مع بقية المستخلصات المدروسة. أما على مستوى وسيط طول فترة الحياة فقد كان أعلاها عند استخدام مستخلص زيت نبات الشيح الأبيض العشبي (27.78 ساعة) تلاه المستخلص المائي لأوراق نبات المليسة (25.41 ساعة) متفوقان معنوياً على مستخلص زيت نبات الزعتر (18.55 ساعة/شغالة النحل) والشاهد (7.2 ساعة)، ولم يكن هناك فروقاً معنويةً مع بقية المستخلصات المدروسة (جدول 2). عند دراسة الارتباط والانحدار بين متوسط ووسيط طول فترة الحياة عند استخدام المستخلصات النباتية تبين وجود ارتباطاً معنوياً قوياً بينهما (R=0.86، p-value< 0.01)، ويظهر الشكل 5 مخطط ومعادلة الانحدار الناتجة عن الارتباط بين متوسط ووسيط طول فترة الحياة والتي بلغ فيها معامل التحديد (التأثير) R^2=0.74 أي أن 74% من قيم متوسط ووسيط طول فترة الحياة تعود لاستخدام المستخلصات النباتية المدروسة.



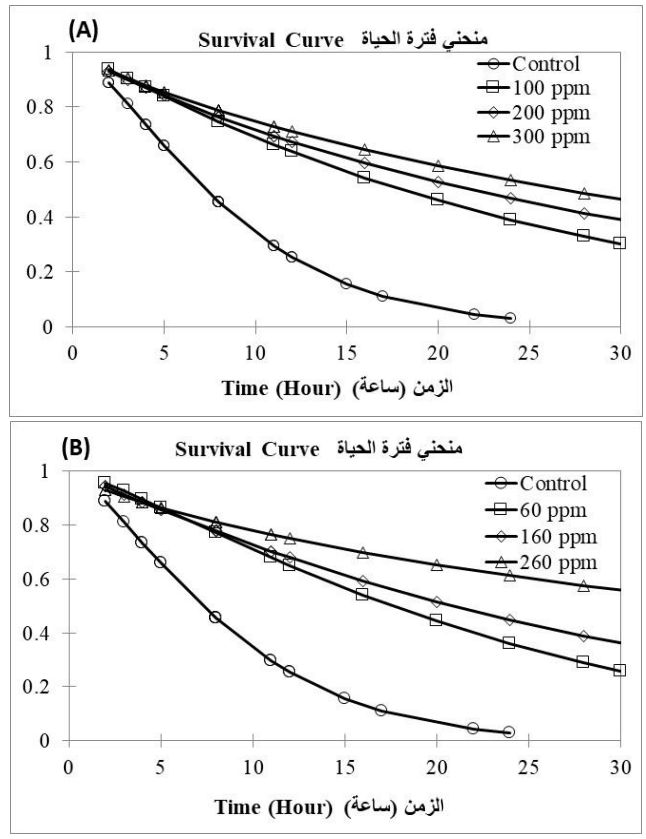
شكل 3. منحنى طول فترة الحياة لزيت نبات الشيح الأبيض العشبي (A)، والزعتر البري (B)، والنارنج (C).

Figure 3. Survival curve for plant oils of *A. herba-alba* (A), *T. serpyllum* (B) and *C. aurantium* (C).

المستخلصات النباتية وقدرتها على تخليق الببتيدات المضادة للميكروبات في نحل العسل.

أظهرت النتائج قدرة المستخلصات النباتية في تحفيز تخليق الببتيدات المضادة للميكروبات وذلك بشكل متفاوت تبعاً للتركيز المستخدم. فقد استطاع زيت نبات الشيح الأبيض العشبي تحفيز عملية تخليق الببتيدات في شغالات النحل بجميع التراكيز المستخدمة، تلاه بعد ذلك المستخلص

المائي لنبات المليسة الذي حرض على تركيب ثلاث ببتيدات هما "الهيمينوبتايسين"، "الاباسين" و"الديفينسين" باستثناء ببتيد "الأبيدايسين" وذلك بجميع التراكيز المستخدمة.أما زيت نبات النارنج فلم يحرض عملية تخليق ببتيد "الهيمينوبتايسين"، وكذلك الأمر لم يحفز زيت الزعتر البري والمستخلص المائي لأوراق نبات الغار على تركيب كل من الببتيدين "الهيمينوبتايسين" و"الأبيدايسين" (جدول 3).



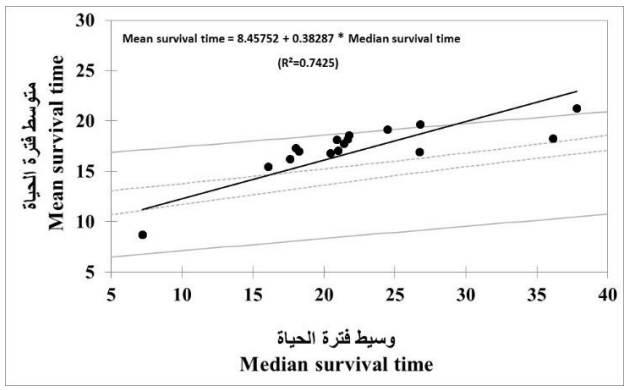
شكل 4. منحنى طول فترة الحياة للمستخلص المائي لأوراق نبات الغار (A) والمليسة (B).

Figure 4. Survival curve for aqueous plant leaf extracts of *L. nobilis* (A) and *A. citriodora* (B).

بلغت أعلى نسبة تشابه استناداً إلى وجود أو غياب الببتيد حوالي 0.68 بين الببتيدين "الديفنسين" و"الأباسين" وأقل نسبة تشابه 0.36 بين "الأبيدايسين" و"الديفنسين".

وبالنسبة لزمن ظهور هذه الببتيدات في السائل اللمفاوي لشغالة النحل فقد كان هناك تفاوتاً وذلك تبعاً للتركيز المستخدم. فعند استخدام زيت نبات الشيح الأبيض العشبي تبين أن ببتيد "الهيمينوبتايسين"(12 kDa) وصل إلى التركيز الذي يسمح بالكشف عنه بعد 20 ساعة من المعاملة بالتركيز 20 جزء بالمليون، وبعد أربع ساعات بالمعاملة 60 جزء بالمليون، وبعد ساعتين عند المعاملة بالتركيز 100 جزء بالمليون.

أما ببتيد "الأبايسين"(5.8 kDa) فظهر بعد 8 ساعات من المعاملة بالتراكيز 20 و60 جزء بالمليون، واستمر لمدة 16 ساعة عند التركيز 100جزء بالمليون، أما ببتيد "الديفنسين"(4.8 kDa) فقد ظهر بعد ساعتين عند المعاملة بالتراكيز الثلاثة 20 و60 و100 جزء بالمليون، أما ببتيد "الأبايديسن"(2 kDa) فقد ظهر بعد 16 ساعة عند المعاملة بتركيز 20 جزء بالمليون، وبعد 20 ساعة عند المعاملة بالتركيز 60 جزء بالمليون، وبعد ساعتين عند المعاملة بالتركيز 100 جزء بالمليون (شكل 6).



شكل 5. مخطط ومعادلة الانحدار بين متوسط ووسيط طول فترة الحياة.

Figure 5. Line and equation of regression between Mean and Median survival time.

جدول 2. متوسط ووسيط طول فترة حياة شغالات النحل

Table 2. Mean and Median of survival time for workers bee.

المستخلص النباتي	Plant extracts	متوسط طول فترة حياة (ساعة/شغالة النحل) Mean survival time (Hour/worker bee)	طول فترة الحياة الوسطي(ساعة) Median survival time (Hour)
زيت الشيح الأبيض العشبي	*Artemisia herba-alba*	18.260 ab	27.780 a
زيت الزعتر البري	*Thymus serpyllum*	16.743 b	18.550 b
زيت النارنج	*Citrus aurantium*	18.157 ab	22.373 ab
المستخلص المائي لأوراق الغار	*Laurus nobilis*	17.600 ab	22.163 ab
المستخلص المائي لأوراق المليسة	*Aloysia citriodora*	18.551 a	25.412 a
الشاهد	Control	8.710 c	7.200 c

القيم في الجدول التي يتبعها الأحرف نفسها في العمود نفسه لا يوجد بينها فرق معنوي عند احتمال 5%.

Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.05.

جدول 3. الببتيدات المضادة للميكروبات المحفزة بالمستخلصات النباتية.

Table 3. Antimicrobial peptides stimulated by plant extracts.

Apidaecin	Defensin	Abaecin	Hymenoptaecin	PPM	Plant extract	المستخلص النباتي
+	+	+	+	20	*Artemisia herba-alba*	زيت الشيح الأبيض العشبي
+	+	+	+	60		
+	+	+	+	100		
+	-	+	-	50	*Citrus aurantium*	زيت النارنج
+	+	+	-	150		
+	+	+	-	250		
-	+	-	-	40	*Thymus serpyllum*	زيت الزعتر البري
-	+	+	-	120		
-	+	-	-	200		
-	+	+	-	100	*Laurus nobilis*	المستخلص المائي لأوراق الغار
-	+	+	-	200		
-	-	+	-	300		
-	+	+	+	60	*Aloysia citriodora*	المستخلص المائي لأوراق المليسة
-	+	+	+	160		
-	+	+	+	260		
-	-	-	-	0	Control	الشاهد
-	-	-	-	0		
-	-	-	-	0		

+Peptide present, -Peptide absent

+وجود الببتيد، -غياب الببتيد

المناقشة

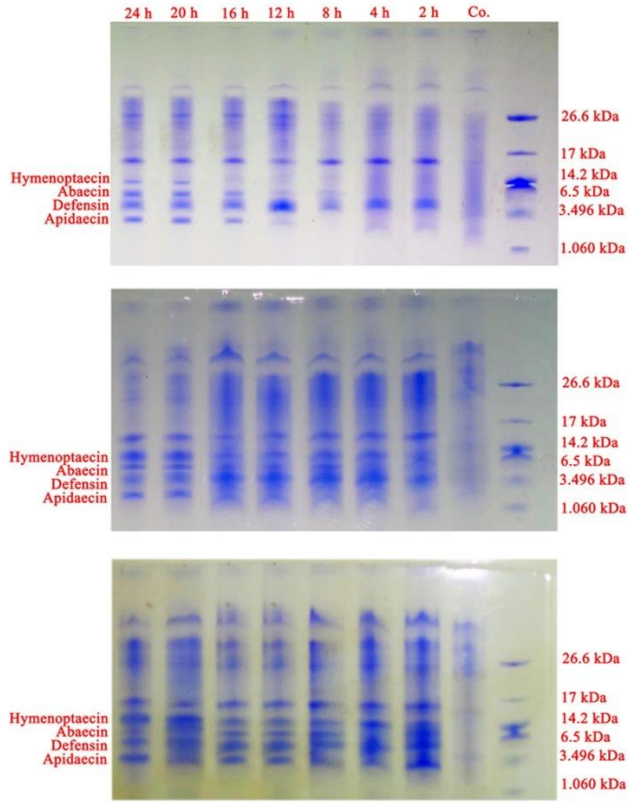
تحتوي النباتات الطبية والعطرية العديد من المركبات الكيميائية التي تملك خواصاً عديدة منها كمضادات للميكروبات الممرضة بهدف حماية نفسها، بشكل رئيسي، من المسببات المرضية (Nazzaro *et al*., 2013). يقوم النبات بتكوين هذه المواد تحت ظروف أحيائية وغير أحيائية خاصة (Nazzaro *et al*., 2013؛ Holey & Patel, 2005). تشير الدراسات الحديثة إلى احتمالية أن يكون للمستخلصات النباتية دوراً كذلك الأمر كمضادات فيروسية (Bohme *et al*., 2014) منها نبات الشيح الأبيض العشبي (Abou El-Hamd *et al*., 2010) والنارنج (Song *et al*., 1996) والزعتر البري (Khare, 2007) والمليسة (Allahverdiyev *et al*., 2014) والغار (Loizzo *et al*., 2008)، على الرغم من أن آلية عملها تجاه الفيروسات مانزال تحتاج للعديد من الدراسات. اختلفت الجرعة النصفية المميتة للمستخلصات النباتية المدروسة على شغالة النحل فبلغت 117.25 جزء بالمليون لزيت نبات الشيح الأبيض العشبي، 224.58 جزء بالمليون لزيت الزعتر البري، 259.87 جزء بالمليون لزيت النارنج، 476.1 جزء بالمليون للمستخلص المائي لأوراق نبات الغار و 353.18 جزء بالمليون للمستخلص المائي لأوراق نبات المليسة وذلك بعد 24 ساعة من المعاملة. رغم ارتفاع سمية زيت نبات الشيح الأبيض العشبي، إلا أن تأثيره في طول فترة حياة شغالة النحل كان إيجابياً من حيث متوسط طول فترة الحياة (18.26 ساعة/شغالة النحل) ووسيط طول فترة الحياة (27.78 ساعة).

ظهر تأثير المستخلصات النباتية في طول فترة حياة شغالة النحل بشكل معنوي مقارنة بالشاهد (جدول 2) خلال مدة التجربة (48 ساعة). وقد أشار Ebert وآخرون (2007) إلى ارتفاع وسيط طول فترة حياة شغالات النحل عند معاملتها بعدة زيوت نباتية وأحماض عضوية، كما بين أن الجرعات النصفية المميتة انخفضت مع الوقت. أظهر Kevan وآخرون (1999) أن الجرعة النصفية المميتة للزعتر البري *T. serpyllum* على شغالات النحل بلغت 100 جزء بالمليون خلال 72 ساعة، في حين بلغت 210.3 جزء بالمليون خلال أربع ساعات (Gashout & Guzman-Novoa, 2009).

كان للمستخلصات النباتية المدروسة القدرة على تحفيز تركيب الببتيدات المضادة للميكروبات ضمن السائل اللمفاوي لشغالة النحل وكان أفضلها زيت نبات الشيح تلاه المستخلص المائي لنبات المليسة ومن ثم زيت النارنج والزعتر ومستخلص نبات الغار. تسهم هذه الببتيدات بدورٍ مهمٍ في تحفيز الجهاز المناعي والدفاعي الطبيعي (الفطري) لنحل العسل، حيث تشير هذه النتائج إلى إمكانية استخدام هذه المستخلصات كمضادات تجاه فيروسات نحل العسل. هذا وبينت الدراسات الحديثة بأن الإشارتين الخلويتين Imd وToll لاتحرضان فقط البكتيريا والفطور وإنما أيضاً فيروسات نحل العسل وبخاصة فيروس الجناح المشوه *Deformed wing virus* (Kuster *et al*., 2014)، وفيروس شلل النحل الحاد بفلسطين *I-Acute bee paralysis virus* (Chen *et al*., 2014).

بالمقابل فإن عمل الجهاز المناعي لنحل العسل تجاه الإصابة الفيروسية غير مفهوم بشكل دقيق حتى الآن نظراً لعدم وجود استجابات واضحة (Azzami *et al*., 2012)، حيث أشار Nazzi وآخرون (2012) لتثبيط الجهاز المناعي عند الإصابة الفيروسية، في حين بين Boncristiani وآخرون (2013) زيادة تعبير المورثات المناعية عند الإصابة بفيروسات نحل العسل. كما أشار Brutscher وآخرون (2017) إلى وجود الكثير من المورثات التي ترمز مستقبلات خلوية تسهم بدورٍ في نقل الإشارات الخلوية التي يسهم قسم منها في زيادة مناعة الخلية، وبالتالي الحشرات الكاملة لنحل العسل تجاه الإصابة الفيروسية.

لا بد من الإشارة إلى أن هذه الدراسة هي دراسة أولية، وهي الأولى من نوعها من حيث دراسة تأثير المستخلصات النباتية في طول فترة حياة شغالة النحل، وقدرتها على تحفيز الببتيدات المضادة للميكروبات، وهي تمهد لإجراء المزيد من الدراسات من أجل وضع البرامج الوقائية والعلاجية لنحل العسل من حيث الموازنة بين فترة المعاملة والجرعة التي يجب اعطاؤها للخلية من جهة، ومعرفة الأفضل بين الجرعات المستمرة أوالجرعات ذات التركيز العالي من جهة أخرى. بالإضافة لدراسة كفاءة هذه المستخلصات كمضادات فيروسية تجاه فيروسات نحل العسل الأكثر انتشاراً محلياً وعالمياً



شكل 6. الببتيدات المضادة للميكروبات المحفزة في السائل اللمفاوي لشغالة النحل عند استخدام زيت نبات الشيح الأبيض العشبي.

Figure 6. Stimulated antimicrobial peptides in the hemolymph of worker bee when treated with *A. herba-alba* plant oil extract.

Abstract

Barhoum, H.Sh., H. Adib Al-Roz and A.M. Mouhanna. 2018. Plant extracts and their role in stimulating the production of antimicrobial peptides in honey bee workers, *Apis mellifera* L. Arab Journal of Plant Protection, 36(3): 250-258.

This study aimed to investigate the role of some plant extracts on the stimulation of the honey bee immune system in addition to their effect on survival time of worker bees. Honey bee samples were collected during April 2016. The following five plant extracts were used: plant oils of *Artemisia herba-albam*, *Thymus serpyllum*, *Citrus aurantium*, and aqueous extract of plant leaves of *Laurus nobilis* and *Aloysia citriodora*. The lethal dose (LD_{50}) of studied plant extracts 24 hours after treatment ranged between 117.25 ppm for the *A. herba-alba* plant oil and 476.1 ppm for the aqueous extract of *L. nobilis* leaves. All studied plant extracts had a significant effect on increasing both the mean and median survival time of honey bees as compared to the control. The results showed the ability of plant extracts to induce the synthesis and assembly of antimicrobial peptides in a different manner depending on the concentration used and the period of application. This is a preliminary study which will pave the way for further studies in order to develop appropriate preventive and curative programs for honey bees.

Keywords: Antimicrobial peptides, immune system, honey bees, plant extracts.

Corresponding author: Ahmad M. Mouhanna, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University. A.M.Mouhanna@gmail.com

References

Addinsoft, 2015**.** XLSTAT 2015: data analysis and statistics software for Microsoft Excel. Addinsoft, Paris, France.

Allahverdiyev, A., N. Duran, M. Ozguven and S. Koltas. 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. Phytomedicine, 11: 657-61. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.07.014

المراجع

المجموعة الإحصائية، 2016. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق، سورية.

Abou El-Hamd, H.M., M.A. El-Sayed, M.E. Hegazy, S.E. Helaly, A.M. Esmail and N.S. Mohamed. 2010. Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba*. A review. Records of Natural Products, 4:1-25. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2544.8806

mellifera. Insect Molecular Biology, 15: 645–656. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x

FAOSTAT, 2016. http://www.fao.org/faostat/en/#compare

Gashout, H.A. and E. Guzmán-Novoa. 2009. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Journal of Apicultural Research, 48: 263-269.

Haider, S.R., H.J. Reid and B.L. Sharp. 2012. Tricine-SDS-PAGE. Methods in Molecular Biology, 869: 81-91. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_8

Hernandez, M., R. Lopez, R.M. Abanas, V. Paris and A. Arias. 1994. Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* Leaf extracts. Journal of Ethnopharmacology, 41:115-119.

Holley, R.A. and D. Patel. 2005. Improvement in Shelf-Life and Safety of Perishable Foods by Plant Essential Oils and Smoke Antimicrobials. Food Microbiology, 22: 273–292.

Kevan, P.G., M. Nasr and S.D. Kevan. 1999. Natural Oils and Other Substances for Mite Control in Honey Bees: Botanicals for Mite Control. Hivelights, 12: 1-4.

Khare, C.P. 2007. *Thymus serpyllum* Linn. In: Indian Medicinal Plants. Springer, New York, NY, 739 pp.

Kuster, R.D., H.F. Boncristiani and O. Rueppell. 2014. Immunogene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae. Journal of Experimental Biology, 217: 1710-1718. https://doi.org/10.1242/jeb.097766

Li, Y., Q. Xiang, Q. Zhang, Y. Huang and Z. Su. 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. Peptides, 37: 207–215. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001

Loizzo, M.R., A.M. Saab, R. Tundis, G.A. Statti, F. Menichini, I. Lampronti, R. Gambari, J. Cinatl and H.W. Doerr. 2008. Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. Chemistry & Biodiversity, 5: 461-470. https://doi.org/10.1002/cbdv.200890045

Morse, R.A. 1997. Guida moderna per l'apicultore (sic). Edizioni Edagricole,Morton, J., Ball, R., Brown, M., Wilkins, S., 2005. Managing Varroa. DEFRA-CSL, 36 pp.

Nazzaro, F., F. Fratianni, L. De Martino, R. Coppola and V. De Feo. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals, 6: 1451–1474. https://doi.org/10.3390/ph6121451

Nazzi, F., S.P. Brown, D. Annoscia, F. Del Piccolo, G. Di Prisco, P. Varricchio and F. Pennacchio. 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honey bee colonies: PLoS Pathog 8(6): e1002735. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002735

Panasiuk, B., W. Skowronek, M. Bienkowska and D. Gerula. 2010. Process of cleaning dead brood from cells in a honey bee colony. Journal of Apicultural Science, 54: 5–11.

Azzami, K., W. Ritter, J. Tautz and H. Beier. 2012. Infection of honey bees with *Acute bee paralysis virus* does not trigger humoral or cellular immune responses. Archives of Virology,157: 689-702. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1223-0

Barhoum, H.S., H.A. Alrouz and A.M. Mouhanna. 2017. Survey of honeybee viruses in Syria. Asian Journal of Agriculture and Biology, 5: 257-262.

Bohme, K., J. Barros-Vel´azquez, P. Calo-Mata and S.P. Aubourg. 2014. Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: mechanisms and applications. Antimicrobial Compounds, Springer, Berlin, Germany, Pages 51-81. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40444-3_3

Boncristiani, H.F., J.D. Evans, Y. Chen, J. Pettis, C. Murphy, D.L. Lopez, M.D. Simone-Finstrom, M. Strand, D.R. Tarpy and O. Rueppell. 2013. In-vitro infection of pupae with *Israeli acute paralysis virus* suggests variation for susceptibility and disturbance of transcriptional homeostasis in honey bees (*Apis mellifera*). PLoS ONE 8(9): e73429. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073429

Brutscher, L.M., K.F. Daughenbaugh and M.L. Flenniken. 2017. Virus and dsRNA-triggered transcriptional responses reveal key components of honey bee antiviral defense. Scientific Reports, 7: 6448. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06623-z

Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs and P. Tempst. 1993. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honey bee (*Apis mellifera*). Journal of Biological Chemistry, 268: 7044–7054.

Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck and P. Tempst. 1989. Apidaecins: Antibacterial peptides from honey bees. EMBO Journal, 8: 2387–2391.

Chen, Y.P., J.S. Pettis, M. Corona, W.P. Chen, C.J. Li, M. Spivak, P.K. Visscher, G. DeGrandi-Hoffman, H. Boncristiani, Y. Zhao, D. van Engelsdorp, K. Delaplane, L. Solter, F. Drummond, M. Kramer, W.I. Lipkin, G. Palacios, M.C. Hamilton, B. Smith, S.K. Huang, H.Q. Zheng, J.L. Li, X. Zhang, A.F. Zhou, L.Y. Wu, J.Z. Zhou, M.L. Lee, E.W. Teixeira, Z.G. Li and J.D. Evans. 2014. *Israeli acute paralysis virus*: epidemiology. Pathogenesis and implications for honey bee health. PLoS Pathogens,10: e1004261. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004261

Cox-Foster, D.L., S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P.L. Quan, T. Briese, M. Hornig, D.M. Geiser, V. Martinson and D. vanEngelsdorp. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science, 318: 283–287. https://doi.org/10.1126/science.1146498

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

Evans, J.D., K. Aronstein, Y.P. Chen, C. Hetru, J.L. Imler, H. Jiang and D. Hultmark. 2006. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis*

Song, D.K., H.W. Suh, J.S. Jung, M.B. Wie, K.H. Son and Y.H. Kim. 1996. Antidepressant-like effects of p-synephrine in mouse models of immobility tests. Neuroscience Letters, 23: 107-110.

Van Engelsdorp, D. and M.D. Meixner. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. Journal of Invertebrate Pathology, 103: S80-S95. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011

Wilson-Rich, N., M. Spivak, N.H. Fefferma and P.T. Starks. 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. Annual Review of Entomology, 54: 405–423. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301

Wimley, W.C. and K. Hristova. 2011. Antimicrobial peptides: Successes, challenges and unanswered questions. The Journal of Membrane Biology, 239: 27–34. https://doi.org/10.1007/s00232-011-9343-0

Prisco, D.G., V. Cavaliere, D. Annoscia, P. Varricchio, E. Caprio, F. Nazzi, G. Gargiulo and F. Pennacchio. 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110: 18466-71. https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110

Rodrigues, J., F.A. Brayner, L.C. Alves, R. Dixit and C.M. Barillas. 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitos. Science, 329: 1353-1355. https://doi.org/10.1126/science.1190689

Romanelli, A., L. Moggio, R.C. Montella, P. Campiglia, M. Iannaccone, F. Capuano and R. Capparelli. 2011. Peptides from royal jelly: Studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. Journal of Peptide Science, 17: 348–352. https://doi.org/10.1002/psc.1316

Sefidkon, F., M. Dabiri and S.A. Mirmostafa. 2004. The Composition of *Thymus serpyllum* L. Oil. Journal of Essential Oil Research, 16: 184-185. https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698691

Received: February 14, 2018; Accepted: October 16, 2018

تاريخ الاستلام: 2018/2/14؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2018/10/16