تأثير المستخلص المائي للأجزاء المختلفة لنبات *Phytolacca americana* في طول مدة حياة شغالات نحل العسل (*Apis mellifera*) وقدرته على تحفيز إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات

مي عمر شرف[1]، نورس الأبرص[2] وأحمد محمد مهنا[1،3*]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، دمشق، سورية؛ (2) الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية؛

(3) الجامعة السورية الخاصة، دمشق، سورية.

*البريد الإلكتروني للباحث المراسل: A.M.Mouhanna@gamil.com

الملخص

شرف، مي عمر، نورس الأبرص وأحمد محمد مهنا. 2025. تأثير المستخلص المائي للأجزاء المختلفة لنبات *Phytolacca americana* في طول مدة حياة شغالات نحل العسل (*Apis mellifera*) وقدرته على تحفيز إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات. مجلة وقاية النبات العربية، 43(4):552–560. https://doi.org/10.22268/AJPP-001344

تمّ اختبار تأثير المستخلصات المائية لأجزاء نبات الصبغة الأمريكية (*Phytolacca americana* L.) (الأوراق، الأفرع، الجذور والثمار) في طول مدّة حياة شغالات نحل العسل (*Apis mellifera*)، والقدرة على إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات. استخدمت ثلاثة تراكيز (10، 50 و 100 جزء في المليون) من كل مستخلص لكل جزء من النبات. تمّت معاملة النحل بطريقتين، إضافة المستخلص إلى الغذاء ورش الشغالات بالمستخلص. أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين طريقتي المعاملة. لذا استخدمت طريقة التغذية لسهولة التطبيق. تفوقت جميع المستخلصات المدروسة على الشاهد معنوياً بطريقة التغذية وبلغت أعلى زيادة في عمر الشغالات (67.8%) عند استخدام مستخلص الأوراق بتركيز 100 جزء في المليون. كما ثبتت قدرة مستخلص الأوراق على إطالة مدة حياة شغالات نحل العسل المعدى بالفيروس Deformed wing virus (DWV) مع محلول سكري ومستخلص الأوراق، والتي بقيت حيّةً لمدة 12 يوماً من المعاملة مقارنةً مع الشغالات المغذّاة على محلول سكري فقط والتي بقيت حية لمدة عشرة أيام، والشغالات التي تغذت على محلول سكري ومعلق فيروسي والتي بقيت حيّة لمدة ثلاثة أيام فقط من المعاملة. بالإضافة لقدرة مستخلص الأوراق على تخليق عدد من الببتيدات المضادة للميكروبات. تمهّد هذه الدراسة الأولية لإجراء مزيدٍ من الدراسات بهدف وضع البرامج الوقائية والعلاجية المناسبة للنحل.

كلمات مفتاحية: مستخلص مائي، *Phytolacca americana* L.، نحل العسل، الببتيدات المضادة للميكروبات.

المقدمة

ينتمي نبات الصبغة الأميركية (*Phytolacca americana* L.) إلى فصيلة Phytolaccaceae والتي تضم 35 جنساً (Choe *et al*., 2020؛ Roberge *et al*., 1986) و 150 نوعاً (Karami *et al*., 2013)، وهو نبات عشبي معمر ثنائي الفلقة، تعدّ أميركا الشمالية الموطن الأصلي لنبات الصبغة الأميركية، ثم انتشر في أماكن كثيرة من العالم (Balogh & Juhasz, 2008). أما في سورية، فهو نبات مدخل ولا توجد مراجع توثق كيف تمّ دخوله إلى سورية والشرق الأوسط.

أدرج هذا النبات كنبات طبي رسمياً في الولايات المتحدة وفي دستور الأدوية الفرنسي والياباني (Fournier, 1948). عزلت من أوراقه النامية في الربيع والصيف ومن بذوره مركبات بروتينية أطلق عليها Pokeweed antiviral protein وصنفت ضمن ثلاث مجموعات (PAP I، PAP II، PAP-S) (Barbieri *et al*., 1982). بينت الدراسات أن بروتينات PAP ذات خواص مضادة للفيروسات تعمل على تخريب الحمض النووي لفيروس نقص المناعة المكتسب HIV−1 وفيروس شلل الأطفال والهربس (Zhabokritsky *et al*., 2014)، كما أن لهذه البروتينات تأثير مثبط على بكتيريا *Escherichia coli* (Hamissou & Kurdmongkoltham, 2015). يجذب نبات الصبغة الأميركية أنواع عديدة من النحل (Deyrup *et al*. 2002) ويمتلك خصائصاً كمبيد للرخويات (Fang *et al*., 2011).

تشكل كل من مركبات الـ Phenols، Flavonoids، Betalains، Betacyannins، Betaxanthins، Carotenoids، Saponins وTannins أهم المركبات الكيميائية الموجودة في النبات

https://doi.org/10.22268/AJPP-001344
© 2025 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

(Marinas *et al.*, 2021). ويحتوي على العديد من المركبات السامة كالـ Alkaloid (Phytolaccin) والراتنج (Phytolaccatoxin) و Saponin (Phytolaccagenin) والبروتين السام (Lectin)، والتي تتركز بشكل أساسي في الجذور والثمار والبذور. بالإضافة إلى ذلك، يحتوي هذا النبات على مشتقات حمض السينامیك والفلافونويد ذات التأثيرات الفسيولوجية (Balogh & Juhasz, 2008).

يعدّ نحل العسل من الحشرات المهمة من الناحية البيئية والاقتصادية حيث يسهم في تلقيح النباتات وإنتاج العسل وحبوب الطلع والغذاء الملكي بالإضافة إلى أنه يسهم في عملية التأبير (Delaplane & Mayer, 2000). لذلك تُعدُّ تربية نحل العسل مصدراً مهماً في دخل المزارع الصغير والمتوسط وذلك لقلة تكاليف الإنتاج. ومن جانب آخر تشكل قوة وصحة المستعمرات السبب الرئيسي في نجاح عملية التأبير.

توجد في نحل العسل 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 تساعد التخصصية العالية في عمل النحل في الحد من انتشار المرض ضمن مستعمراته كتنظيف المستعمرة بالتخلص من اليرقات المصابة (Panasiuk *et al.*, 2010). كشف في نحل العسل عن أربع عائلات ببتيدية ضمن السائل اللمفاوي (Romanelli *et al.*, 2011)، وقد أثبتت كفاءة معظمها ضدّ طيف واسع من البكتيريا، والفطور والفيروسات وبعض الطفيليات (Ageitos *et al.*, 2017).

يصاب النحل بالعديد من الأمراض من ممرضات مختلفة، وقد توجهت الدراسات نحو استخدام المستخلصات النباتية في مواجهة هذه الأمراض. تتألف المستخلصات النباتية من خليط من المواد الكيميائية التي تنتمي لمجموعات مختلفة (Akhtar *et al.*, 2014؛ Degenhardt *et al.*, 2009)، وتمتلك القدرة على تثبيط تطور مجموعة من العوامل الممرضة (Arumugam *et al.*, 2016؛ Degenhardt *et al.*, 2009؛ Lang & Buchbauer, 2012؛ Swamy & Sinniah, 2015). يأتي من جملة هذه الممرضات فيروس الجناح المشوه (DWV)، وهو من أكثر الفيروسات خطورةً على نحل العسل (Dainat *et al.*, 2012؛ De Miranda & Genersch, 2010؛ Martin *et al.*, 2012). ينتشر هذا الفيروس بسرعة بين أفراد نحل العسل، وهو المسؤول عن موت المستعمرات خلال فصل الشتاء (Highfield *et al.*, 2009؛ Martin, 2001).

وجد مهنا (2023) أن لبعض المستخلصات النباتية، مثل زيت نبات الشيح، القدرة على تحفيز تركيب الببتيدات المضادة للميكروبات ضمن السائل اللمفاوي لشغالة نحل العسل، وتسهم هذه الببتيدات في تحفيز الجهاز المناعي والدفاعي الطبيعي لنحل العسل. بينت الدراسات أن لإضافة مستخلص البابونج إلى تغذية النحل قدرة عالية في تحسين قوة الطوائف من خلال دوره في السيطرة على مسببات الأمراض، ومن جانب آخر يمكن أيضاً تجربة استخدام القرفة في مكافحة الفاروا (Al-Ghamdi *et al.*, 2021).

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية

جمعت عينات نبات الصبغة الأميركية (*Phytolacca americana* L.) من النبات البالغ من مناطق وجودها في ريف مدينة حمص، قرية الحواش خلال شهري نيسان/أبريل وأيار/مايو 2021.

عينات النحل

جمعت عينات من شغالات نحل العسل (*Apis mellifera*) بشكل عشوائي من منحل كلية الزراعة، جامعة دمشق. شملت كل عينة 25 نحلة وضعت في أطباق بقطر 9 سم. غذيت الشغالات بمحلول سكري خلال فترة التجربة، والتي أجريت ضمن ظروف المختبر السائدة في هذه الفترة (رطوبة نسبية 18–37%، حرارة 17–25°س) (Ebert *et al.*, 2007)، حيث أنه في منطقة إجراء التجربة، يسبب ارتفاع الحرارة انخفاض الرطوبة وموت الشغالات.

تحضير مستخلص نبات الصبغة الأميركية

حُضِّر المستخلص المائي بنسبة 1: 5 وفقاً لطريقة Harborne (1984)، بعد جمع العينات، حيث تم فصل الأجزاء النباتية (ثمار، أوراق، أغصان، جذور)، ثم أخذ 50 غ من كل جزء نباتي وتمّ طحنه وإضافة 250 غ ماء مقطر معقم له ووضع ضمن هزازة آلية لمدة 24 ساعة عند 200 دورة/دقيقة ومن ثمّ تثفيله عند سرعة 3000 دورة/دقيقة وترشيحه، وبعدها وضع المستخلص في أنابيب اختبار سعة 50 مل وحفظت عند درجة حرارة −20°س.

تأثير المستخلصات في طول مدّة حياة شغالة نحل العسل

استخدمت أجزاء نباتية مختلفة (ثمار، أوراق، أغصان، جذور) من نبات الصبغة الأميركية، حيث أجريت عملية الاستخلاص المائي لكل جزء على حدة. حضرت ثلاثة تراكيز من كلّ منها (10، 50 و 100 جزء في المليون). تمّ الاختبار بإضافة التراكيز المختلفة للأجزاء النباتية إلى المحلول السكري المحضر لتغذية النحل، أما الشاهد فكان محلولاً سكرياً فقط، نفذت التجربة مخبرياً بوضع النحل في أطباق بتري صغيرة (قطر 5 سم)، والتي وضعت بدورها ضمن أطباق أكبر (قطر 15 سم وارتفاع

10 سم) التي وضع فيها النحل (شكل 1)، مع مراعاة صنع ثقوب من الأعلى لضمان تنفس الحشرات. حضرت 3 مكررات لكل تركيز، ولكل جزء نباتي، وللشاهد غير المعامل، ضمّ كل مكرر 25 نحلة، بمجموع 13 معاملة بما فيها معاملة الشاهد، و 39 مكرر وتمت مراقبة نشاط النحل وتسجيل القراءات يومياً لمدة 15 يوم (Ebert *et al*., 2007).

اختبرت المستخلصات أيضاً بالتراكيز نفسها بطريقة الرش، حيث وُضعت الحشرات ضمن أطباق (قطر 15 سم وارتفاع 10سم) مثقبة من الأعلى لضمان تهوية الحشرات وبداخلها أطباق بتري صغيرة (قطر 5 سم) تحتوي على محلول سكري للتغذية، ورُشت بالمستخلصات المذكورة والتراكيز المذكورة بطريقة عشوائية.

شكل 1. طبق بتري صغير يحوي المحلول السكري والمستخلص النباتي التي وضع فيها النحل.

Figure 1. A small Petri dish (5 cm in diameter) contained the sugar solution and plant extract in which the bees were placed.

الحصول على عينة نقية مصابة بفيروس الجناح المشوه (DWV) فقط وتحضير المعلق الفيروسي

اختيرت عينات مصابة طبيعياً بفيروس الجناح المشوه (DWV) السلالة المنتشرة Type A فقط دون أية فيروسات أخرى وذلك من تجارب سابقة (مهنا وآخرون، 2023)، وعينات نحل جمعت من مناحل قريبة من محيط كلية الزراعة بجامعة دمشق، وتم التأكد من إصابتها بفيروس DWV بواسطة اختبار RT-PCR وباستخدام بادئات موصوفة سابقاً (جدول 1).

اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي مع النسخ العكسي (RT-PCR)

استخلص الحمض النووي الفيروسي RNA من نحل العسل باستخدام طقم الأدوات QIAamp® Viral RNA Mini Kit (No. 52904) المصنع من قبل شركة Qiagen وفق الخطوات الموصى بها. ولإنتاج الحمض النووي التكميلي (cDNA)، استخدم طقم الأدوات 2-steps RT-PCR (RTPL12) المصنع من شركة Vivantis. أجري تفاعل البلمرة التسلسلي في حجم نهائي قدره 25 µl باستخدام مزيج من مواد التفاعل GoTaq® Green Master Mix من إنتاج شركة Promega. وضعت العينات في جهاز المدور الحراري وفق المراحل التالية: المرحلة الأولى– دورة واحدة عند حرارة 94˚س ولمدة 3 د، المرحلة الثانية– 30 دورة كما يلي: فصل سلاسل الـ DNA 30 ثانية عند حرارة 94˚س ثم التحام البادئ 30 ثانية عند حرارة 50–55˚س تلاها مرحلة الإستطالة لمدة 90 ثانية وحرارة 72˚س. أما المرحلة الثالثة، فكانت دورة واحدة عند حرارة 72˚س لمدة 7 دقائق. رُحّل حوالي 5 ميكروليتر من نواتج تفاعل البلمرة التسلسلي على هلامة الآغاروز 1.5%، ووثقت النتائج بتصوير هلامة الآغاروز باستخدام الأشعة فوق البنفسجية للتأكد من وجود أو عدم وجود إصابة فيروسية لنحل العسل.

جدول 1. التتابع النيكليوتيدي للبادئين المستخدمين في الكشف عن فيروس DWV في شغالات النحل.

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers used to detect DWV in honey bee workers.

الوزن الجزيئي للجزء المضخم (زوج قاعدي) Amplicon Molecular weight (bp)	التتابع النكليوتيدي من طرف '5 إلى طرف '3 Nucleotide sequence from 5' to 3'	اسم الفيروس Virus name
194	CTTACTCTGCCGTCGCCCA CCGTTAGGAACTCATTATCGCG	DWV
395	TTTGCAAGATGCTGTATGTGG GTCGTGCAGCTCGATAGGAT	DWV

تحضير المعلق الفيروسي

حضر المعلق الفيروسي بطحن خمسة شغالات مصابة بالفيروس DWV فقط بالآزوت السائل، ضمن جفنة خزفية ونقلت إلى أنابيب اختبار ثم أضيف لها 20 مل من الماء المقطر المعقم، وثقلت بسرعة 5000 دورة/د لمدة ثلاث دقائق، ثم أخذ الرائق ووضع في أنابيب اختبار جديدة وحفظت عند حرارة –70°س.

تحفيز البتيدات المضادة للميكروبات

أجريت معاملة الشغالات بالمستخلص النباتي الذي أعطى أعلى نسبة حياة باختبار تأثير المستخلصات على طول مدّة حياة شغالة نحل العسل فقط ومن ثم العدوى بالمعلق الفيروسي، حيث وضعت عينات النحل (كل عينة 15 شغالة) في أطباق مثقبة للتنفس وتحوي على ما يلي: (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 أضيف بعد 24 ساعة لأطباق التغذية محلول سكري يحتوي على 5 مل من المعلق الفيروسي. أجريت التجربة ضمن ظروف المختبر (رطوبة نسبية 18–37%، درجة حرارة 17–25°س) (Ebert *et al*., 2007).

جمع السائل اللمفاوي لشغالات نحل العسل

جمع السائل اللمفاوي لشغالات النحل بعد فترات 2، 4، 8، 12، 16 و 24 ساعة من المعاملة حسب ما نشر سابقاً (Lin *et al*., 2004)، وذلك عبر إجراء جرح طفيف في منطقة البطن للشغالة، ومن ثم سحب السائل اللمفاوي باستخدام الماصة بمعدل 5–10 ميكروليتر/الشغالة ونقلت مباشرة إلى أنبوب ابندورف (0.5 مل) يحتوي على واحد ميكرولتر من مادتي Phenylthiourea (PTU) (P-7629) و Aprotinin (A-4529) بتركيز 0.1 مغ/مل، اللذان يمنعان عملية التصبغ أو التحول إلى الميلانين (Melanization)، وحفظت بعدها العينات عند درجة حرارة −20°س.

الكشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات

كشف عن الببتيدات المضادة للميكروبات عبر هلامة البولي أكريلامايد (SDS Polyacrylamide Gel) وفق الطريقة الموصوفة من قبل Haider *et al.* (2012)، وذلك بحل عينة السائل اللمفاوي بمحلول pH 6.8، 100 mM Tris-HCl يحتوي على 4% SDS، 17% glycerol و 0.8 M من 2-mercaptoethanol، ثم سخنت لمدة ثلاث دقائق عند حرارة 95°س، وحقنت ضمن هلامة الأكريلامايد ورحلت باستخدام جهاز الترحيل الكهربائيMini gel من شركة Bio-Rad. استخدم سلم المؤشر الجزيئي البروتيني (5–245 kDa) المصنع من قبل شركة Jena Bioscience. استخدم برنامج Addinsoft-XLSTAT 2015 لإجراء اختبار one Way ANOVA لدراسة النسبة المئوية للحياة عند مستوى ثقة 5%.

النتائج

تأثير طريقة استخدام مستخلص نبات الصبغة الأميركية (الرش والتغذية) في طول مدّة 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 و 100 جزء في المليون) تبين أنه لا توجد أية فروق معنوية بين الطريقتين من حيث مدّة بقاء الحشرة على قيد الحياة (جدول 2). لذلك تم اعتماد طريقة التغذية لسهولة التعامل.

جدول 2. دراسة فاعلية طريقة استخدام المستخلصات النباتية (الرش أو التغذية) في طول مدّة حياة شغالات نحل العسل.

Table 2. Effectiveness of plant extracts applying method (spraying or feeding) in extending the life span of honeybees workers.

طريقة المعاملة Treatment method	متوسط عدد الشغالات التي بقيت حية Average number of survived bees
شاهد Control	45.3 b
رش Spray	65.6 a
تغذية Feeding	63.9 a

القيم التي يتبعها نفس الاحرف في نفس العمود لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

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

تأثير مستخلص الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأميركية في مدّة حياة شغالة نحل العسل

استمرت التجربة مدة أكثر من 15 يوم لحين موت جميع الشغالات في جميع المكررات. ولوحظ أنه بعد اليوم السابع ارتفع معدل الموت بين المكررات وبخاصةٍ في الشاهد المعامل بالمغذى على محلول سكري فقط. لذلك تمّت مقارنة تأثير المستخلصات على طول مدّة حياة النحل بعد سبعة أيام كون أعداد النحل الحيّ كانت متقاربة.

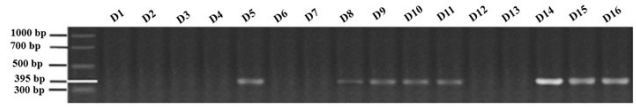
بعد سبعة أيام من معاملة شغالات نحل العسل، وعند مقارنة المعاملة بالتراكيز المختلفة 10، 50 و 100 جزء في المليون للمستخلصات النباتية من الأجزاء المختلفة لنبات الصبغة الأميركية من أوراق، جذور، أفرع وثمار تبين تفوق كل من المعاملة بمستخلص الأوراق والتركيز 100 جزء في المليون حيث بلغ متوسط عدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة 19 وبنسبة مئوية 76%. يليها في المرتبة الثانية الشغالات المعاملة بمستخلص الجذور وبالتراكيز 50 و100جزء في المليون، حيث بلغ متوسط عدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة 18.7 و 17.7% وبنسبة 73.3 و 70.0%، على التوالي، وبفروق معنوية مقارنةً بالشاهد والذي بلغ متوسط عدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة 11.7 وبنسبة 45.3% (جدول 3). وبناءً على هذه النتائج تمّ اختيار التركيز 100 جزء في المليون من مستخلص الأوراق من بين المعاملات الثلاث المتفوقة لأنها تفوقت على معاملة الجذور.

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 في العينات المدروسة بهدف استخدامها لإحداث العدوى، وجود تفاعل لدى

عدد من العينات (D5، D8، D9، D10، D11، D14، D15 و D16)، وظهرت حزمة واحدة بوزن جزيئي 395 زوج قاعدي، 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.

.



شكل 2. الرحلان الكهربائي لمنتجات اختبار RT-PCR للكشف عن فيروس DWV في عينات النحل.

Figure 2. Electrophoresis of RT-PCR test products for DWV detection in bee samples.

تأثير مستخلص نبات الصبغة الأميركية مع معلق فيروسي في طول مدّة حياة شغالة نحل العسل

تمت مراقبة نشاط الشغالات التي غذيت بمستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية بتركيز 100 جزء في المليون مع المعلق الفيروسي وسجلت القراءات وجميع المشاهدات يومياً ولمدة 14 يوماً كما في تجربة تأثير المستخلصات في طول مدّة حياة شغالة نحل العسل. أظهرت النتائج بعد ثلاثة أيام من المعاملة ما يلي (جدول 4): بلغت النسبة المئوية لعدد الشغالات التي بقيت على قيد الحياة وتغذت على محلول سكري فقط 73.3%، 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%. وفي اليوم السابع من بدء التجربة، بلغت النسبة المئوية للشغالات التي بقيت على قيد الحياة وتغذت على محلول سكري فقط 46.6%، بينما بلغت 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%.

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 حية حتى اليوم الخامس عشر من بدء التجربة.

جدول 3. فاعلية التراكيز المختلفة لمستخلصات الأجزاء النباتية على حياة شغالات نحل العسل خلال مدّة سبعة أيام.

Table 3: Effectiveness of different plant parts extracts at different concentrations on the life span of honey bee workers during a seven days' period.

الجزء النباتي Plant Part	التركيز Concentration	متوسط عدد الشغالات التي بقيت حية Average number of survived bee workers	النسبة المئوية (%) لعدد الشغالات التي بقيت حية Proportion (%) of survived bee workers	مقدار الزيادة في عمر الشغالات كنسبة مئوية % Increase rate (%) in the age of bee workers
أوراق Leaves	10	16.3	62.7 de	38.4
	50	16.7	68.7 bcd	51.6
	100	19.0	76.0 a	67.8
جذور Roots	10	14.0	54.0 f	19.2
	50	18.7	73.3 ab	61.8
	100	17.7	70.0 abc	54.5
أفرع Twigs	10	13.3	55.3 f	22.1
	50	15.0	64.0 cde	41.3
	100	16.7	68.0 bcd	50.1
ثمار Fruits	10	14.7	59.3 ef	30.9
	50	15.0	58.7 ef	29.6
	100	14.7	66.7 bcd	47.2
شاهد Control	-	11.7	45.3 g	

القيم التي يتبعها نفس الاحرف في نفس العمود لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

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

جدول 4. دراسة فاعلية تأثير مستخلص نبات الصبغة الأميركية مع معلق فيروسي في طول مدّة حياة شغالة نحل العسل.

Table 4. Effectiveness of *Phytolacca americana* extract mixed with a viral suspension on the life span of honeybee workers.

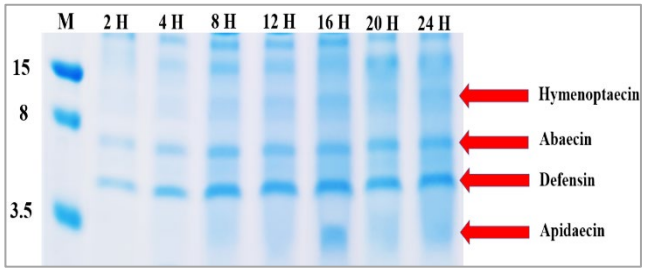
المدة الزمنية (يوم) Time duration (days)					المعاملات Treatments
15	12	10	7	3	
-	-	-	-	-	% لعدد النحلات التي بقيت حية عند التغذية بمحلول سكري مع معلق فيروسي % of survived bees after feeding on a sugar solution with viral suspension
-	-	-	46.6	73.3	% لعدد الشغالات التي بقيت حية عند التغذية بمحلول سكري % of survived bees after feeding on a sugar solution
-	-	20	60	80	% لعدد الشغالات التي بقيت حية عند التغذية بمحلول سكري مع مستخلص نباتي ومعلق فيروسي % of survived bees after feeding on a sugar solution containing a plant extract and a virus suspension
-	20	40	80	93.3	% لعدد الشغالات التي بقيت حية عند التغذية بمحلول سكري مع مستخلص نباتي % of survived bees after feeding on a sugar solution containing a plant extract

تحفيز الببتيدات المضادة للميكروبات

حفزت المعاملة بمستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية بتركيز 100 جزء في المليون أربعة ببتيدات وهي الهيمينوبتايسين 12 kDa، الأباسين 5.8 kDa، الديفينسين 4.8 kDa والأبايديسين 2 kDa خلال مراحل التجربة المختلفة (شكل 3). 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 5). كما حرضت المعاملة بمستخلص النبات (100 جزء في المليون) مع إجراء العدوى بفيروس DWV على ظهور الببتيدات الأربعة (الهيمينوبتايسين، والأباسين، والديفينسين، والأبايديسين)، وإن المقاومة للبكتيريا الممرضة يحدّ من الأمراض التي تسببها تلك البكتيريا مما يحافظ على حيوية ونشاط النحل ويمنع من حدوث الموت جراء تلك الأمراض، وذلك بعد ساعتين من المعاملة واستمر ظهور الببتيدات الأربعة حتى نهاية التجربة بعد 24 ساعة، في حين لم تحفز العدوى بفيروس الجناح المشوه ولا المعاملة بالماء المقطر أياً من الببتيدات الأربعة السابقة (جدول 5).

المناقشة

في السنوات القليلة الماضية، ازداد الاهتمام باستخدام البدائل الطبيعية من أجل تعزيز تكاثر وقوة النحل ومقاومة الأمراض والاستهلاك الغذائي (Stanimirović *et al*., 2019 ؛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 ؛Basualdo *et al*., 2014).



شكل 3. الببتيدات المضادة للميكروبات المحفزة في السائل اللمفاوي لشغالة النحل بعد المعاملة بمستخلص نبات الصبغة الأمريكية فقط بمدد زمنية مختلفة (2-24 ساعة). M = سلم مؤشر الوزن الجزيئي البروتيني.

Figure 3. Induced antimicrobial peptides in the lymphatic fluid of worker bees at different periods (2-24 hours) after treatment with *Phytolacca americana* extract. M= Protein molecular weight ladder.

جدول 5. تحفيز ببتيدات المقاومة (الهيمينوبتايسين، الأباسين، الديفينسين والأبايديسين) بالمعاملة بمستخلص الصبغة الأمريكية فقط.

Table 5. Stimulating antimicrobial peptides (heminoptesin, abacin, defensin and abadecin) production following treatment with *Phytolacca americana* extract alone.

المدّة الزمنية (ساعة) Time duration (hours)							الببتيدات المضادة للميكروبات Antimicrobial peptides
24	20	16	12	8	4	2	
+	+	+	+	+	+	+	Hymenoptaecin
+	+	+	+	+	+	+	Abaecin
+	+	+	+	+	+	+	Defensin
+	+	+	+	+			Apidaecin

أشارت الدراسات لقدرة 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 لمدة 20 يوماً والنحل السليم 26 يوماً، أما بعد تناوله للمستخلص، فقد عاش النحل المصاب حتى 26 يوماً والنحل السليم لمدة 34 يوماً (Jakimiuk *et al*., 2022).

في عام 2015 وجد Strachecka *et al.* (2015) أنّه عند إضافة الكركم إلى المحلول السكري لتغذية النحل، عاش النحل لمدة أطول وكان أقل إصابة بالنوزيما. كذلك في عام 2022 وجد Skowronek *et al.* أن وضع مستخلص القنب داخل الخلية في بشكل شرائط مبللة بالمستخلص أو إضافته إلى محلول التغذية أدى لزيادة 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. تتوافق هذه النتائج مع نتائج هذه الدراسة من حيث أن المعاملة بالمستخلصات النباتية لأجزاء نبات الصبغة الأميركية (*Phytolacca americana* L.) أدت إلى زيادة مدّة حياة شغالات نحل العسل وكان لمستخلص الأوراق بتركيز 100 جزء في المليون 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%.

وجد برهوم وآخرون (2018) عند دراسة تأثير إضافة مستخلص زيت الشيح الأبيض (*Artemisia herba-alba*)، النارنج (*Citrus aurantium*)، الزعتر البري (*Thymus serpyllum*)، الغار (*Laurus nobilis*) والمليسة (*Aloysia citriodora*) أن لها تأثيرات معنوية على طول مدّة حياة شغالة النحل مقارنة بالشاهد وعلى تحفيز تركيب الببتيدات المضادة للميكروبات. تتوافق هذه النتائج مع نتائج الدراسة التي بيّنت دور مستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية عند التركيز 100 جزء في المليون في تحفيز الجهاز المناعي لشغالات نحلة العسل لناحية ظهور الببتيدات المضادة للميكروبات (الهيمينوبتايسين، الأباسين، الديفينسين، والأبايديسين).

أشارت نتائج الدراسة إلى الدور المهمّ لمستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية بتركيز 100 جزء في المليون في طول مدّة حياة شغالة نحل العسل بالإضافة لإمكانية استخدام مستخلص الجذور بتركيز 50 و 100 جزء في المليون في زيادة طول مدّة الحياة. ودور مستخلص أوراق نبات الصبغة الأمريكية بتركيز 100 جزء في المليون في تحفيز إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات والتي لها دور في تعزيز مناعة النحل واحتمالية الحدّ من انتشار فيروس الجناح المشوه (DWV).

Abstract

Sharaf, M.O., N. Al-Abras and A.M. Mouhanna. 2025. Effect of Aqueous Extract of Different Plant Parts of the *Phytolacca Americana* L. on the Life Span of Honeybee Workers and its Ability to Stimulate the Production of Antimicrobial Peptides. Arab Journal of Plant Protection, 43(4):552-560. https://doi.org/10.22268/AJPP-001344

This study aimed to determine the effect of aqueous extracts of the different plant parts of *Phytolacca americana* L. on the life span of honeybee workers and the ability to produce antimicrobial peptides. Two methods were used in treating the bees (adding the extract to the bee food and by spraying, with three concentrations used (10, 50 and 100 ppm) of each plant extract (leaves, twigs, roots and fruits). The results obtained showed that there were no significant differences between the two treatment methods. Therefore, the feeding method was adopted because of ease of application. By using the feeding method, all tested extracts were significantly superior compared to the control, and the highest increase in life span of worker bee (67.8 %) was reached by using the leaf extract at a concentration of 100 ppm. In addition, it was shown that the leaf extract was able to prolong the lifespan of honey bee workers fed with the Deformed wing virus (DWV), which remained alive for 12 days after treatment, compared to the workers that were fed a sugar solution only, which remained alive for ten days, and the workers that were fed a sugar solution and a viral suspension, which remained alive only three days after treatment. The results also showed the ability of the extracts to induce production of antimicrobial peptides. This is a preliminary study that will pave the way for further studies with the aim of developing appropriate bee treatments.

Keywords: Aqueous extract, *Phytolacca americana* L., honeybee, antimicrobial peptides.

Affiliation of authors: *M.O. Sharaf[1], N. Al-Abras[2] and A.M. Mouhanna[1,3*]. (1) Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Syria; (2) General Biotechnology Authority, Damascus, Syria; (3) Syria Private University, Damascus, Syria. *Email address of the corresponding author: A.M.Mouhanna@gamil.com*

المراجع

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. https://doi.org/10.22268/AJPP-036.3.250258

References

*[**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. (In Arabic)].* https://doi.org/10.22268/AJPP-036.3.250258

Choe, S., S. Jeong, M. Jang, H. Yeom, S. Moon, M. Kang, W. Yang and S. Kim. 2020. Identification of phytolaccosides in biological samples from pokeweed intoxication patients using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 1149:122123. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122123

Dainat, B., J.D. Evans, Y.P. Chen, L. Gauthier and P. Neumann. 2012. Dead or alive: *Deformed wing virus* and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. Applied and Environmental Microbiology, 78(4):981-987. Doi:10.1128/AEM.06537-11

De Miranda, J.R. and E. Genersch. 2010. *Deformed wing virus*. Journal of Invertebrate Pathology, 103:S48-S61. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012

Degenhardt, J., T.G. Kollner and J. Gershenzon. 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. Phytochemistry, 70(15-16):1621-1637. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030

Delaplane, K.S. and D.F. Mayer. 2000. Crop Pollination by Bees. Entomologia Experimentalis et Applicata, 99(1):127-129. https://doi.org/10.1023/A:1018931100125

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

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

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

Fang, W.W., J. Chen, B.X. Hang, C.G. Li, X.J. Yang, C.X. Zhang and H. Yao. 2011. [Molluscicidal effect of Phytolacca americana linn leaf against *Oncomelania hupensis* and its acute toxicity]. Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi, 23(4):449-452.

Fournier, P. 1948. Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France Volume 3. Paris, France.

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

Hamissou, M. and P. Kurdmongkoltham. 2015. Molecular and cytotoxicity investigations of *Phytolacca americana* (L) root, leaf, and berry extracts. International Journal of Pharmacology and Toxicology, 3(2):11-16. https://doi.org/10.14419/ijpt.v3i2.5160

Harborne, J. 1984. Methods of Plant Analysis. Pp. 1-36 *In:* Phytochemical Methods, J. B. Harborne (ed.). Springer, Dordrecht, Germany. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7_1

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

*[**Mouhanna, A.M**. 2023. Immune system of honeybees and mechanisms for stimulating it. The Fourteenth Conference of the Arab Beekeepers Union, 13-15 November 2023, Cairo, Egypt. (In Arabic)].*

مهنا، أحمد محمد، مي شرف، أوس حسن ونورس 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 تشرين الأول/نوفمبر 2023، القاهرة ، مصر.

*[**Mouhanna, A.M., M, Sharaf, A, Hassan and N, Al-Abrass.** 2023. A detailed study of the deformed wing virus (DWV) and the role of the American dye plant in stimulating the immune system of honey bees in Syria. The Fourteenth Conference of the Arab Beekeepers Union, 13-15 November 2023, Cairo, Egypt. (In Arabic)].*

Ageitos, J.M., A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata and T.G. Villa. 2017. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. Journal of Biochemistry and Pharmacology, 133:117-138. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018

Akhtar, M.S., B. Degaga, and T. Azam. 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. Biological Sciences and Pharmaceutical Research, 2(1):1-7.

Al-Ghamdi, A.A., H.F. Abou-Shaara and M.J. Ansari. 2021. Effects of sugar feeding supplemented with three plant extracts on some parameters of honey bee colonies. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(4):2076-2082. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.050.

Arumugam, G., M.K. Swamy and U.R. Sinniah. 2016. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. Molecules, 21(4):369. https://doi.org/10.3390/molecules21040369

Balogh, L. and M. Juhasz. 2008. American and Chinese pokeweed (*Phytolacca americana*, *Phytolacca esculenta*). Pp. 35-46 *In:* The Most Important Invasive Plants in Hungary. Z. Botta-Dukat and L. Balogh (eds.). Hungarian Academy of Sciences. Hungary.

Barbieri, L., G.M. Aron, J.D. Irvin and F. Stirpe. 1982. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed). Biochemistry Journal, 203(1):55-59. https://doi.org/10.1042/bj2030055

Basualdo, M., S. Barragán and K. Antúnez. 2014. Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher Nosema ceranae abundance in honeybees. Environmental Microbiology Reports, 6(4):396-400. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12169

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

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(5):348-352. https://doi.org/10.1002/psc.1316

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

Skowronek, P., L. Wójcik and A. Strachecka. 2022. Impressive Impact of hemp extract on antioxidant system in honey bee (*Apis mellifera*) organism. Antioxidants (Basel), 11(4):707. https://doi.org/10.3390/antiox11040707

Stanimirović, Z., U. Glavinić, M. Ristanić, N. Aleksic, N.M. Jovanović, B. Vejnović and J. Stevanović. 2019. Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. Acta Veterinaria, 69:1-31. https://doi.org/:10.2478/acve-2019-0001

Strachecka, A., K. Olszewski and J. Paleolog. 2015. Curcumin stimulates biochemical mechanisms of *Apis Mellifera* resistance and extends the apian life-span. Journal of Apicultural Science, 59(1):129-141. https://doi.org/10.1515/JAS-2015-0014

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

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

Zhabokritsky, A., S. Mansouri and K.A. Hudak. 2014. Pokeweed antiviral protein alters splicing of HIV-1 RNAs, resulting in reduced virus production. RNA, 20(8):1238-1247. https://doi.org/10.1261/rna.043141.113

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

Jakimiuk, K, A.A. Ptaszynska, A. Wiater, M. Kunat and M. Tomczyk. 2022. Scleranthus perennis extracts prolonged the honeybee lifespan. Planta Medica, 88(15):1571-1572. https://doi.org/10.1055/s-0042-1759347

Karami, M., M.A. Shamerani, S.H. Alemy, A.R. Gohari and S.E. Vostacolaee. 2013. Comparison antinociceptive activity of the aqueous methanolic extracts of Salvia Hypoleuca and Phytolacca americana in mice. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 17(20):2755-2759.

Lang, G. and G. Buchbauer. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. Flavour and Fragrance Journal, 27(1):13-39. https://doi.org/10.1002/ffj.2082

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

Marinas, I.C., E. Oprea, E.I. Geana, C.M. Luntraru, C.E. Gird, C.E and M.C. Chifiriuc. 2021. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of *Phytolacca americana* L. fruits and leaves extracts. Farmacia, 69(5):883-889. https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.5.9

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

Martin, S.J, A.C. Highfield, L. Brettell, E.M. Villalobos, G.E. Budge, M. Powell, S. Nikaido and D.C. Schroeder. 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. Science, 336(6086):1304-1306. https://doi.org/10.1126/science.1220941

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(1):5-11.

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

Received: January 22, 2024; Accepted: July 20, 2024

تاريخ الاستلام: 2024/1/22؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2024/7/20