


Paper Type: Original Article



Effects of Feeding Gamma Irradiated Pollen on the Functional Traits of Honey Bee Colony

Parvin Shawrang^{*1} , Maryam Sadeghi², Mehdi Behgar¹, Hamed Majidi Zahed¹

¹Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Iran; ^{*}(Associate Professor: Corresponding author: pshawrang@aeoi.org.ir).

²University of Tehran, College of Agriculture & Natural Resources, Iran.

Citation:

Shawrang, p., Sadeghi, M., Behgar, M. & Majidi Zahed, H. (2024). Effects of feeding gamma irradiated pollen on the functional traits of honey bee colony. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 4), PP. 11-20

Received: 2023.11.21

Accepted: 2024.03.10

Abstract

Introduction: The protein quality of honey bee diet affects the growth and performance of the colony. This research was conducted with the aim of studying the effects of gamma irradiated pollen nutrition on bee colony performance.

Methods: 32 bee hives were grouped for 4 treatments and 8 repetitions. The experimental treatments were 1- diet without pollen, 2- diet containing raw pollen, 3- diet containing gamma irradiated pollen, 4- diet containing Microfeed protein supplement. Functional characteristics of the colony include the extent of queen spawning, the number of population frames, the weight and body composition of nurse bees, the level of malondialdehyde and the antioxidant capacity of the body, hygienic behavior, the level of Nosema parasite contamination, the microbial population of the digestive tract, the growth of acini glands, Vitellogenin gene expression, diet digestibility were determined. The data were analyzed in the form of a completely randomized design.

Results: The use of gamma irradiated bee pollen by increasing the digestibility and removing parasitic contamination caused an increase in colony performance, health behavior and health of the digestive tract, increased vitellogenin gene expression, and increased bee body weight at the time of birth.

Conclusion: The use of gamma irradiated pollen plays an important role in controlling the parasitic infection of the hive and increasing its performance.

Keywords: Gamma irradiation, Microfeed, Nosema, Vitellogenin



اثرات تغذیه با گرده پرتوفاوری شده گاما بر صفات عملکردی کلنی زنبور عسل

پروین شورنگ^{۱*}، مریم صادقی^۲، مهدی بهگر^۱، حامد مجیدی زاهد^۳

^۱دانشیار، پژوهشکده کشاورزی هسته ای پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، ایران.

(*نویسنده مسئول: pshawrang@aeoi.org.ir)

^۲دانشجو، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم دامی، ایران.

^۳کارشناس، پژوهشکده کشاورزی هسته ای پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۳۰

چکیده

مقدمه: کیفیت پروتئین جیره زنبورعسل رشد و عملکرد کلنی را تحت تأثیر قرار می دهد. این پژوهش با هدف مطالعه اثرات تغذیه گرده پرتوفاوری شده بر عملکرد کلنی زنبور انجام شد.

روش‌ها: تعداد ۳۲ کندوی زنبورعسل برای ۴ تیمار و ۸ تکرار گروه بندی شد. تیمارهای آزمایشی ۱- جیره بدون گرده ۲- جیره حاوی گرده- خام ۳- جیره حاوی گرده پرتوفاوری شده ۴- جیره حاوی مکمل پروتئینی میکروفید بود. صفات عملکردی کلنی، وزن و ترکیبات بدن زنبورهای پرستار، رفتار بهداشتی، سطح آلودگی میکروبی و انگلی، رشد غدد آسینی، بیان ژن ویتلوژنین، قابلیت هضم جیره تعیین شد. داده ها در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شد.

یافته‌ها: استفاده از گرده زنبورعسل پرتوفاوری شده با افزایش قابلیت هضم و حذف آلودگی های انگلی سبب افزایش عملکرد کلنی، رفتار بهداشتی و سلامت دستگاه گوارش، افزایش بیان ژن ویتلوژنین و افزایش وزن بدن زنبور در زمان تولد شد.

نتیجه‌گیری: استفاده از گرده پرتوفاوری شده نقش مهمی در کنترل آلودگی کندو و افزایش عملکرد آن دارد.

کلیدواژه‌ها: پرتوتابی گاما، نوزما، میکروفید، ویتلوژنین

مقدمه

کیفیت پروتئین جیره زنبور عسل به شدت رشد و تکامل غده هیپوفارنژیال، تخمدان‌ها، طول عمر، هضم و مصرف گرده و شاخص همولنف را تحت تأثیر قرار می‌دهد. کیفیت پروتئین گرده بستگی به منبع آن (نوع گل) دارد. برخی منابع گرده مثل کلزا گرده با کیفیت پایین‌تری دارند [1]. پرتوتابی با واسرشت کردن پروتئین و به سطح آوردن گروه‌های آبگریز نقش مهمی در افزایش قابلیت هضم و در دسترس قرار دادن پروتئین برای جایگاه‌های فعال آنزیم‌های گوارشی هضم‌کننده پروتئین دارد [2]. ویتلوژنین یک فسفولیپوپروتئین است که در صفات زنده‌مانی و طول عمر زنبور عسل نقش دارد. ویتلوژنین در ناحیه چربی شکمی سنتز و به داخل همولنف ترشح می‌شود [3]. ویتلوژنین در زنبورهای پرستار ۷ تا ۱۰ روزه در بالاترین سطح قرار دارد و کمترین مقدار در زنبورهای چراگر با طول عمر کوتاه تولید می‌شود. زنبورهای پرستار قادر به ذخیره ویتلوژنین در چربی بدن و همولنف خود هستند که سبب مقاومت آن‌ها در برابر عوامل تنش‌زا مثل آسیب متابولیکی اکسیداتیو و گرسنگی، مقاومت به بیماری و افزایش طول عمر می‌شود [4]. ذخایر چربی و بیان ژن ویتلوژنین تحت تأثیر کیفیت جیره است [5]. هدف مطالعه حاضر مطالعه اثرات تغذیه گرده پرتو فراوری شده بر عملکرد کلنی زنبور عسل و بیان ژن ویتلوژنین بود.

مواد و روش‌ها

تهیه گرده زنبور عسل پرتو فراوری شده

نمونه‌های گرده زنبور عسل از شرکت اسپادانا تهیه شد و با استفاده از سامانه پرتوتابی چندمنظوره گاما مرکز بناب دارای چشمه کبالت-۶۰ با اکتیویته ۱۷۰ کیلوکوری با دز ۲۵ کیلوگری گاما و نرخ متوسط ۰/۵ گری در ثانیه با دقت بیش از ۹۰ درصد پرتوتابی شد.

انجام آزمایش عملکرد

تعداد ۳۲ کندوی زنبور عسل با ملکه یکساله خواهری و ۵ قاب جمعیت و ذخایر غذایی یکسان برای ۴ تیمار و ۸ تکرار گروه‌بندی شد. تیمارهای آزمایشی ۱-جیره شاهد (بدون استفاده از گرده) ۲-جیره حاوی گرده خام ۳-جیره حاوی گرده پرتو فراوری شده ۴-جیره حاوی مکمل پروتئینی میکروفرید بود. جیره‌ها به صورت هفتگی به مدت ۴۲ روز تغذیه شدند و در پایان دوره آزمایش (۹ هفته) مقدار مصرف جیره اندازه‌گیری شد. وسعت تخم‌ریزی ملکه و تعداد قاب جمعیت، هر ۳ هفته یک بار تعیین شد. برای اندازه‌گیری وسعت تخم‌ریزی ملکه از قاب مشبک شده استفاده شد. تعداد مربع‌های حاوی تخم شمارش شده و مساحت مورد نظر نیز محاسبه شد. جمعیت زنبور کارگر با شمارش تعداد قاب جمعیت در هر کندو تعیین شد.

برای اندازه‌گیری وزن و ترکیبات بدن، سطح مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورهای پرستار، تعداد ۲۰ زنبور تازه متولد شده از هر کلنی با ترازوی دقیق (AND Scale GE220, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد. ماده خشک زنبورها با استفاده از آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس تعیین شد. نمونه‌ها پس از خشک شدن در آون به دسیکاتور منتقل شده و پس از سرد شدن توزین شد. برای اندازه‌گیری چربی خام ابتدا ۰/۵ گرم نمونه گرده بر روی کاغذ صافی در داخل دستگاه سوکسله قرار داده شد و با استفاده از دی اتیل اتر به مدت ۳ ساعت شستشو شد. پس از عصاره‌گیری نمونه‌ها در آون خشک و اختلاف وزن قبل و بعد از عصاره‌گیری به‌عنوان درصد چربی یادداشت شد [6]. برای اندازه‌گیری پروتئین حقیقی گرده مقدار ۰/۰۱ گرم گرده با ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج مخلوط و به مدت ۳ دقیقه حرارت داده شد. نمونه با دور ۱۰ هزار به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ و مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول رویی با ۳ میلی‌لیتر معرف برادفورد که شامل ۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بریلیانت بلو، ۴۰ میلی‌لیتر متانول و ۱۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک است مخلوط شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر بعد از صفر کردن دستگاه با محلول بلانک در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. در نمونه بلانک به جای نمونه آب مقطر اضافه شد. سپس با توجه به نمودار استاندارد با استفاده از آلومین سرم گاوی، غلظت پروتئین حقیقی نمونه‌ها برآورد شد [6].

برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورها ابتدا ۱۰ حجم بافر استات (۳۰۰ میکرو مول در لیتر با pH ۳/۶) با یک حجم از ماده تری پیریدیل تریازین (TPTZ) محلول در اسیدکلریدریک (40 mM) مخلوط شد. سپس به این محلول ۱ میلی‌لیتر محلول کلرید فریک (20 mM) اضافه گردید. لاشه زنبورها در هاون چینی ریخته و با ازت مایع و ساییدن پودر شدند و در محلول سرم فیزیولوژی حل شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول صاف شده به ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول کار اضافه شد تا واکنش آغاز گردد. مقدار جذب با اسپکتروفتومتر (JENWAY 6705 UV/VIS, USA) در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت شد [7].

برای تعیین محتوی مالون‌دی‌آلدئید از روش تیوباربیتوریک‌اسید استفاده شد [6]. در این روش یک مولکول تیوباربیتوریک‌اسید با دو مولکول مالون‌دی‌آلدئید واکنش داده و رنگ صورتی نمایان می‌شود. برای این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه (قبلاً در سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی روش تهیه نمونه ذکر شد) با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک‌اسید (EDTA)، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکسی‌تولون‌بوتیل (BHT) و ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) به هر فالكون اضافه شد. فالكون‌ها در $1000 \times g$ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس در لوله‌های آزمایش درب دار به ۱ میلی‌لیتر از محلول بالای فالكون ۲ میلی‌لیتر محلول تری‌بوتیل‌آمین (TBA) اضافه شد. لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و پس از خنک شدن با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از منحنی استاندارد و با توجه به مقادیر جذب نوری، محتوی مالون‌دی‌آلدئید (نانومول در میلی‌لیتر) محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری قطر غدد هیپوفارنژیال ابتدا در زیر لوپ هر جفت غدد هیپوفارنژیال از سر زنبورهای کارگر برداشته شد و بر روی لام شیشه‌ای همراه یک قطره سرم فیزیولوژیک گذاشته شد و زیر میکروسکوپ مجهز به دوربین دیجیتال قطر آسینی‌های غدد اندازه‌گیری شد. برای هر زنبور، به طور تصادفی تعداد ۱۰ آسینی به ازای هر غده اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری سطح آسینی میانگین حداکثر طول و حداکثر عرض آسینی در عدد ۳/۱۴ ضرب شد.

مطالعه رفتار بهداشتی کلنی زنبورهای کارگر با اندازه‌گیری میزان حذف شفیره‌های مرده به روش کشتن شفیره‌ها با ازت مایع و شمارش تعداد شفیره‌های خارج شده توسط زنبوران کارگر انجام گرفت. سطح آلودگی انگلی کلنی و سلامت دستگاه گوارش زنبورها با نمونه‌برداری از دستگاه گوارش ۱۰ نمونه زنبور از هر کلنی و مشاهده وضعیت روده‌ها از نظر تورم و التهاب و همچنین شمارش اسپور نوزما انجام شد. اندازه‌گیری اسپورهای نوزما به روش مشاهده میکروسکوپی و شمارش اسپورها بر روی لام هموسایتومتر انجام شد [8]. در این روش میانگین اسپورها در هر مربع که حاصل تقسیم کل اسپورهای شمارش شده تقسیم بر کل مربع‌های شمارش شده است در عدد ۴ میلیون ضرب می‌شود تا میانگین اسپور برای هر زنبور به دست آید.

تعیین قابلیت هضم جیره

برای تعیین قابلیت هضم جیره، زنبورهای پرستار جوان از کلنی‌ها جمع‌آوری و در قفس‌های پلاستیکی حمل ملکه قرار داده شد. کلیه قفس‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۵۵ درصد رطوبت قرار گرفتند [9]. برای تعیین مصرف و هضم جیره از ۳ قفس و در هر قفس ۱۰ زنبور از هر کندو استفاده شد. زنبورها در داخل قفس با کیک گرده حاوی ۴ نوع گرده (پرتوتابی نشده و پرتوتابی شده با ۳ دز مختلف) به مدت ۷۲ ساعت تغذیه شدند. بعد از ۳ روز انکوباسیون و تغذیه از کیک گرده نمونه‌برداری از رکتوم انجام شد. مقدار کیک گرده قبل از قرارگیری در قفس توزین شد. برای محاسبه مقدار کیک مصرفی بعد از ۳ روز باقیمانده کیک گرده نیز توزین شد. سپس برای تخلیه دستگاه گوارش ۷۲ ساعت گرسنگی اعمال شد. در زمان گرسنگی آب و عسل به زنبورها داده شد. در پایان گرسنگی، محتویات رکتوم زنبورها جمع‌آوری شد. برای محاسبه مقدار کیک گرده مصرفی، تفاوت وزن کیک گرده در روز اول و سوم به تعداد زنبورهای داخل قفس تقسیم شد.

اندازه‌گیری بیان ژن ویتلوژنین

قسمت شکمی زنبورها بعد از خارج کردن لوله گوارشی با استفاده از ازت مایع و هاون چینی پودر شد جهت استخراج RNA از روش پیشنهادی شرکت پارس طوس استفاده شد. برای این منظور، ۷۵۰ میکرولیتر محلول RL به تیوب ۱/۵ حاوی نمونه اضافه شد و پس از ۵ دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، ۱۵۰ میکرولیتر کلروفورم به مخلوط اضافه و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شد. در مرحله بعد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۴۰۰ میکرولیتر از محلول بالایی به تیوب ۱/۵ جدید منتقل شد و سپس ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به مخلوط اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. محتویات خارج شده از انتهای ستون اسپین که در داخل تیوب قرار گرفته بود تخلیه شد و در مرحله بعدی ۷۰۰ میکرولیتر محلول PW به ستون اسپین اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد و مجدد محتویات خارج شده از انتهای ستون اسپین که در داخل تیوب قرار گرفته بود تخلیه شد. در مرحله بعدی جهت حذف بافر شستشو، در دمای ۴ درجه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. سپس ستون اسپین در داخل تیوب ۱/۵ جدید قرار گرفت و ۳۰ میکرولیتر آب دیپس به ستون اسپین اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد. در مرحله آخر جهت شستشوی RNA از ستون، در دمای ۴ درجه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد و RNA به فریزر -۷۰ منتقل شد. کیفیت RNA استخراج شده شامل غلظت و نسبت‌های مختلف طول موج ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ با استفاده از دستگاه نانودراپ کنترل شد [10].

برای ساخت cDNA از کیت استخراج شرکت پارس طوس استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده (با غلظت ۵ نانوگرم در میلی لیتر) جهت جداسازی اتصالات سنجاق سری RNA به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس بر اساس دستور کیت پارس طوس ابتدا ۵ میکرولیتر RNA، ۱۰ میکرولیتر Buffer-Mix (2x)، ۲ میکرولیتر Enzyme Mix و ۳ میکرولیتر آب دیپس (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) به تیوب استریل ۰/۲ منتقل و به طور کامل ورتکس شد و سپس با استفاده از دستگاه PCR (Biometra, T-Gradient- USA) در دمای ۲۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه گرماگذاری شد در مرحله بعدی در دمای ۴۷ درجه به مدت ۶۰ دقیقه گرماگذاری گردید و در مرحله آخر، با گرم شدن نمونه در دمای ۸۵ درجه برای ۵ دقیقه واکنش متوقف گردید و بلافاصله نمونه در دمای ۴ درجه یخچال خنک شد [10].

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی [11]
Table 1- Characteristics of primers used in real-time polymerase chain reaction [11]

Gene	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
ACTB	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	AGAATTGACCCACCAATCCA
Vg	GTTGGAGAGCAACATGCAGA	TCGATCCATTCCCTTGATGGT

ACTB: beta-actin gene, Vg : vitellogenin

برای انجام واکنش کمی Real time PCR از توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های رمزکننده ویتلوژنین و آغازگر ژن خانه‌دار بتا‌کتین (ACTB) استفاده گردید (جدول ۱). از دستگاه Real time PCR شرکت BMS (مدل MIC، استرالیا) و چرخه حرارتی (جدول ۲) برای این منظور استفاده شد. ترکیبات مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (۲X)، ۱ میکرولیتر آغازگر پیشرو، ۱ میکرولیتر آغازگر پسرو، ۴ میکرولیتر cDNA و تا حجم ۲۰ میکرولیتر آب دیونیزه دوبار تقطیر بود.

جهت محاسبه میزان بیان ژن از روش CT مقایسه‌ای (Comparative CT (2- $\Delta\Delta$ CT)) استفاده شد و داده‌های بدست آمده با نرم‌افزار Rest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۲- چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی

Table 2- Thermal cycle of polymerase chain reaction in real time

Temperature (°C)	Time	Stage	Cycles
94	10 Minutes	Initial Denaturation	1
95	15 Seconds	Denaturation	
58-62	30 Seconds	Annealing	35
72	60 Seconds	Extension	
72	5 Minutes	Final Extension	1

تجزیه و تحلیل آماری

از مدل آماری $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ و طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. در این مدل Y_{ij} = صفت اندازه‌گیری شده؛ μ = میانگین کل برای هر صفت؛ T_i = اثر نوع منبع پروتئین i و e_{ij} = خطای آزمایشی است. داده‌های آزمایشی به کمک نرم افزار آماری SAS و رویه GLM تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

عملکرد کلنی

وسعت تخم‌ریزی ملکه و تعداد قاب جمعیت داخل کندو (جدول ۳) در بین تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). بیشترین وسعت تخم‌ریزی ملکه مربوط به تیمار گرده خام و پرتوفراوری شده بود ($P < 0.05$). ملکه توسط زنبورهای پرستار تغذیه می‌شود. زنبورهای پرستار زنبورهای جوانی هستند که با تولید ژل رویال و خوراندن آن به ملکه شرایط را برای فعالیت ملکه و تخم‌ریزی فراهم می‌کنند. هر چه کیفیت گرده بهتر و قابلیت هضم آن بیشتر باشد تخم‌ریزی ملکه نیز متناسب با آن افزایش می‌یابد. دلیل این رابطه رسیدن مواد مغذی بیشتر به زنبورهای پرستار و تولید بیشتر ژل رویال است [12]. در گروه‌هایی که گرده دریافت کردند، با توجه به نقش کیفیت پروتئین گرده در تولید ژل رویال و پروتئین‌سازی، تغذیه ملکه بیشتر شده و در پی آن تخم‌ریزی ملکه بیشتر شده است. وسعت تخم‌ریزی ملکه در تیمار میکروفرید بیشتر از تیمار شاهد و کمتر از تیمار گرده بود ($P < 0.05$). تعداد قاب جمعیت در تیمارهای گرده خام و پرتوفراوری شده بیشتر از تیمار شاهد و میکروفرید بود ($P < 0.05$). بین تیمار میکروفرید و شاهد نیز تفاوت معنی‌دار بود و تیمار میکروفرید تعداد قاب جمعیت بیشتری داشت ($P < 0.05$). استفاده از گرده پرتوتایی شده وسعت تخم‌ریزی ملکه را ۴/۲ درصد و تعداد قاب جمعیت داخل کندو را ۶/۵ درصد نسبت به گرده خام افزایش داد. کیفیت پروتئین گرده با اثری که بر زنبور پرستار و در نهایت تخم‌ریزی ملکه دارد سبب افزایش جمعیت نوزادان و جمعیت زنبور در کلنی شده است. با توجه به اثر کیفیت پروتئین بر طول عمر زنبور، افزایش جمعیت کلنی می‌تواند به دلیل افزایش طول عمر زنبور نیز باشد. از نظر خوشخوراکی جیره‌های حاوی گرده خام، و میکروفرید تفاوتی نداشت ($P > 0.05$) ولی بیشتر از جیره شاهد بود. گرده پرتوفراوری شده بیشترین خوشخوراکی را داشت و نسبت به جیره شاهد و جیره گرده خام به ترتیب ۱۲ و ۲ درصد پذیرش بیشتری داشت (جدول ۳).

جدول ۳- وسعت تخم‌ریزی ملکه و تعداد قاب جمعیت داخل کندو

Table 3- Queen's egg-laying area and the number of population frames inside the hive

Treatment	Ration consumption (gr)	Number of colony population frames	Extent of queen spawning (cm ²)
Control	2072 ^c	5.4 ^c	5089 ^d
Raw Pollen	2270 ^b	6.1 ^a	5375 ^b
Irradiated Pollen	2321 ^a	6.5 ^a	5606 ^a
Microfeed	2296 ^b	5.9 ^b	5221 ^c
SEM	632.1	0.17	43.62

Different letters in each column indicates a significant difference ($P < 0.05$)

در این مطالعه با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورها، تغذیه ملکه با توان بیشتر انجام شده و سطح تخم‌ریزی افزایش یافته است. از طرفی زنبورهای پرستار با تولید ژل رویال و تغذیه شهد و گرده به لاروها، شرایط تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی (فرمون لاروها) را برای فعالیت ملکه و تخم‌ریزی بیشتر فراهم می‌کنند. وجود فرمون لاروها ملکه را به تخم‌ریزی بیشتر ترغیب می‌کند و هر چه لاروها بهتر تغذیه شوند فرمون بیشتری تولید می‌کنند و ملکه به تخم‌ریزی بیشتر ترغیب می‌شود. چنین شرایطی در فصل بهار که ورودی گرده و شهد به کلنی زیاد می‌شود بیشتر دیده می‌شود [13].

طبق نتایج (جدول ۴) ترکیب شیمیایی بدن زنبورهای پرستار تحت تأثیر نوع منبع پروتئینی جیره قرار گرفت. وزن بدن زنبورهای پرستار در تیمار گرده پرتوفراوری شده بیشترین بود و نسبت به تیمار گرده خام ۱۴ درصد افزایش داشت. درصد ماده خشک بدن زنبورهای پرستار نیز در تیمار گرده پرتوفراوری شده بیشترین بود (۳۶/۴۲ درصد) و نسبت به تیمار گرده خام (۳۳/۸۸ درصد) افزایش ۷ درصدی داشت. استفاده از گرده پرتوفراوری شده سبب افزایش ذخایر چربی و پروتئین بدن زنبورهای پرستار شد ($P < 0.05$). افزایش ذخایر چربی و پروتئین بدن زنبور پرستار در تیمار گرده پرتوفراوری شده نسبت به گرده خام به ترتیب ۲/۷ و ۲/۴ درصد بود. ذخایر چربی و پروتئین بدن زنبور پرستار در تیمار گرده خام و میکروفرید تفاوت معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۴- وزن و ترکیب شیمیایی بدن زنبورهای پرستار

Table 4- Body weight and chemical composition of nurse bees

Treatment	antioxidant capacity (mM Trolox)	Malondialdehyde (nmol/ml)	Body protein (%)	body fat (%)	body moisture (%)	body weight (mg)
Control	3.2 ^c	0.041	44.7 ^c	7.7 ^c	69.17 ^a	98 ^c
Raw Pollen	4.2 ^a	0.026	49.2 ^b	7.4 ^b	66.12 ^b	114 ^b
Irradiated Pollen	4.1 ^a	0.022	50.4 ^a	7.6 ^a	63.58 ^c	130 ^a
Microfeed	3.9 ^b	0.025	48.1 ^b	7.3 ^b	68.31 ^{ab}	117 ^b
SEM	0.28	0.0051	1.39	0.18	2.42	6.4

Different letters in each column indicates a significant difference (P<0.05)

استفاده از منابع مختلف پروتئین سبب کاهش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدئید بدن زنبورهای پرستار نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0.05$). محتوی مالون‌دی‌آلدئید بدن زنبورهای پرستار در تیمارهای دریافت‌کننده منابع پروتئینی تفاوت معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورهای پرستار در تیمار گرده بیشتر از تیمار شاهد و میکروفید بود ($P < 0.05$). بین تیمار گرده خام و گرده پرتوفراوری شده تفاوت معنی‌دار از نظر مقدار مشاهده نشد ($P > 0.05$).

وزن بدن زنبور پرستار شاخص مهمی برای وضعیت متابولیسی و فیزیولوژیکی بدن طی فرآیند رشد و نمو درون حجره است. وزن بدن زنبورهای پرستار بین ۸۱ تا ۱۵۱ میلی‌گرم متغیر است [14]. استفاده از منابع پروتئینی سبب افزایش وزن بدن زنبور پرستار در این مطالعه شد. وزن بدن زنبور پرستار با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبور (جدول ۴) و بیان نسبی ژن ویتلوژنین (شکل ۱) ارتباط دارد؛ زیرا افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن سبب بهبود وضعیت تغذیه‌ای و کاهش هدررفت انرژی برای نگهداری و جهت‌دهی آن برای تولید پروتئین و چربی می‌شود که در نهایت ذخایر ویتلوژنی بدن زنبور را در بافت چربی افزایش می‌دهد [15]. کاهش تغذیه لاروها و افزایش دمای منطقه پرورش لارو سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در لاروها می‌شود و آنها را حساس به عفونت‌های باکتریایی مانند لوک اروپایی و قارچ‌ها می‌کند یا اینکه سبب تاخیر در رشد و کسب مواد مغذی لازم برای رشد بعد از پوشاندن دهانه حجره با موم می‌شود [16]. این وقایع با کاهش تغذیه و صرف انرژی برای نگهداری، سبب کاهش مصرف انرژی برای رشد و در نهایت سبب کاهش وزن زنبور در زمان تولد می‌شود. با تغذیه مناسب انرژی موجود در مواد مغذی دریافت شده توسط لارو صرف رشد و نمو شده و شرایط فیزیولوژیکی و متابولیسی برای رشد لارو مهیا و در نهایت زنبور در زمان تولد وزن مناسبی پیدا می‌کند. از طرفی زنبورهای پرستار که وظیفه تغذیه لاروها و نگهداری شفیره‌ها را بر عهده دارند با دریافت پروتئین توانایی بهتری داشته و توانسته‌اند تغذیه بهتری انجام دهند. مجموع این عوامل سبب شده در تیمار منابع مختلف پروتئین، زنبورهای پرستار وزن بهتری داشته باشند.

استفاده از منابع مختلف پروتئین سبب کاهش محتوی مالون‌دی‌آلدئید در زنبور شد. محتوی مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش تغذیه‌ای در بدن زنبور افزایش می‌یابد و دلیل آن تولید شدن رادیکال‌های آزاد و پراکسید شدن چربی‌های موجود در غشاهای سلولی و در بدن زنبور است. افزایش محتوی مالون‌دی‌آلدئید در بدن سبب کاهش رشد و کاهش زنده‌مانی زنبور می‌شود [17].

از نظر حذف شفیره‌های مرده در ۱۲ ساعت اول شمارش (جدول ۵)، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P < 0.05$). مقایسه میانگین تیمارها در این مدت نشان داد که کندوهای دریافت‌کننده منابع پروتئینی نسبت به شاهد درصد حذف شفیره مرده بیشتری داشتند. در بین تیمارهای منابع پروتئینی نیز بیشترین درصد حذف شفیره مرده مربوط به تیمار گرده بود. نتایج رفتار بهداشتی کلنی‌ها در ارتباط با نتایج جمعیت کلنی‌ها است [18].

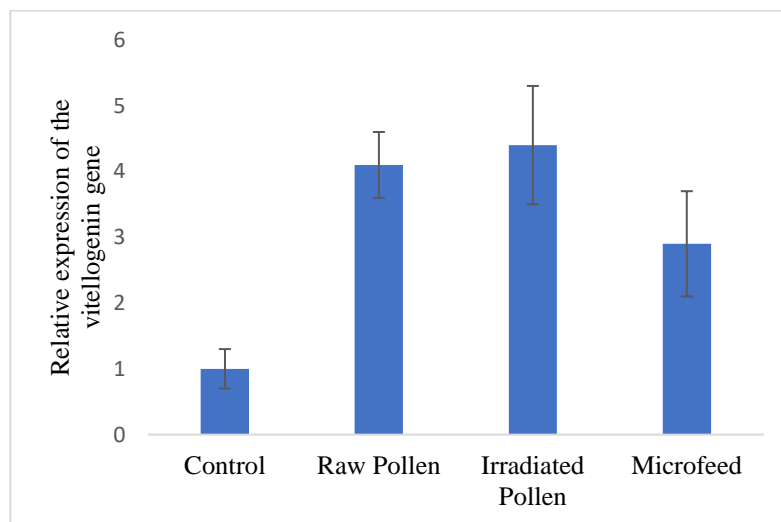
طبق نتایج مشاهدات میکروسکوپی و شمارش اسپور نوزما در روده برای هر زنبور (جدول ۵) در تیمار شاهد و گرده خام اسپورهای نوزما بیشتر بود ($P < 0.05$) در کندوهایی که گرده پرتوفراوری شده و میکروفید دریافت کرده بودند اسپورهای نوزما کاهش یافت. استفاده از منابع پروتئینی عاری از آلودگی‌های انگلی نقش مهمی در کنترل آلودگی کلنی دارد. گرده یکی از منابع انتقال و انتشار آلودگی نوزما بین کندوهای مختلف است.

جدول ۵- شمارش اسپور نوزما در روده هر زنبور و درصد حذف شفیره‌های مرده

Table 5- Number of Nozma spores in the intestine of each bee and percentage of removal of dead pupae

Treatment	Removal of dead pupae (%)	Nosema spores in each bee ($\times 10^6$)
Control	25.12 ^c	4.254 ^a
Raw Pollen	37.51 ^a	4.364 ^a
Irradiated Pollen	38.72 ^a	2.517 ^b
Microfeed	32.48 ^b	1.652 ^b
SEM	2.358	0.9230

Different letters in each column indicates a significant difference ($P < 0.05$)



شکل ۱- بیان نسبی ژن ویتلوژنین در بدن زنبورهای تغذیه شده با منابع مختلف پروتئین

Figure 1- The relative expression of the vitellogenin gene in the body of bees fed with different protein sources

قابلیت هضم جیره، سطح و قطر آسینی غدد هایپوفارنژیال

قابلیت هضم جیره، سطح و قطر آسینی غدد هایپوفارنژیال (جدول ۶) در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). طبق نتایج جیره حاوی گرده پرتوفراوری شده نسبت به گرده خام قابلیت هضم بیشتری داشت ($P < 0.05$). پرتوتابی قابلیت هضم جیره حاوی گرده را ۴/۸ درصد افزایش داد.

سطح و قطر آسینی غدد هایپوفارنژیال زنبورهای عسل پرستار در تیمارهای گرده پرتوفراوری شده و میکروفید بیشترین بود ($P < 0.05$). سطح آسینی زنبورهای پرستار تغذیه شده با گرده پرتوفراوری شده ۲۰ درصد افزایش یافت.

جدول ۶- قابلیت هضم جیره و قطر و سطح آسینی غدد هایپوفارنژیال زنبور پرستار

Table 6- Pollen digestibility and acini diameter and surface of nurse bee hypopharyngeal glands

Treatment	acini surface (mm^2)	acini diameter (mm)	Digestibility (%)
Control	0.625 ^b	0.235 ^b	63.15 ^c
Raw Pollen	0.721 ^b	0.281 ^b	64.28 ^c
Irradiated Pollen	0.871 ^a	0.352 ^a	67.39 ^b
Microfeed	0.812 ^a	0.331 ^a	78.21 ^a
SEM	0.0971	0.0332	1.824

Different letters in each column indicates a significant difference ($P < 0.05$)

افزایش قابلیت هضم جیره در اثر پرتوتابی به معنی فراهمی بیشتر مواد مغذی در محل جذب است، از طرفی همبستگی مستقیمی بین فعالیت غدد هایپوفارنژیال، مقدار و کیفیت پروتئین جیره غذایی زنبور پرستار وجود دارد. تکامل غدد هایپوفارنژیال بشدت با کیفیت پروتئین در ارتباط است [1]. مطالعات نشان داده است که فعالیت غده هایپوفارنژیال در صورتیکه زنبورها دچار کمبود طولانی مدت پروتئین باشند کاهش می‌یابد [12].

بیان ژن ویتلوژنین

بیان نسبی ژن ویتلوژنین (شکل ۱) در تیمارهای مختلف نشان داد که استفاده از منابع مختلف پروتئین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد شد. بیان ژن ویتلوژنین در دو گروه دریافت کننده گرده خام و پرتوفاوری شده بیشتر از گروه شاهد و گروه دریافت کننده میکروفید بود.

ویتلوژنین یک فسفولیپو پروتئین است که در تخم و بدن زنبور عسل نقش‌های متعددی دارد. ویتلوژنین پروتئین اختصاصی تخم بوده و در ایمنی لارو زنبور عسل در برابر عوامل بیماری‌زا نقش دارد. علاوه بر این ویتلوژنین در بدن زنبورهای بالغ در صفات رفتاری، زنده‌مانی و ایمنی بدن مؤثر است [19]. بیان ژن ویتلوژنین تحت تأثیر عوامل تغذیه‌ای است [5]. در یک پژوهش اثرات جیره بدون گرده و حاوی گرده با دو کیفیت متفاوت بر بیان ژن ویتلوژنین مطالعه شد. گرده‌های مورد استفاده در آزمایش از نظر ترکیب چربی و پروتئین متفاوت بود. استفاده از گرده با کیفیت بهتر (حاوی مواد مغذی بیشتر) در جیره زنبورها نسبت به گرده با کیفیت پایین‌تر، سبب دو برابر شدن بیان ژن ویتلوژنین شد. این پژوهشگران نشان دادند که کیفیت گرده می‌تواند بیان ژن ویتلوژنین را افزایش دهد.

نتیجه‌گیری

استفاده از گرده زنبور عسل پرتوفاوری شده با افزایش قابلیت هضم و حذف آلودگی‌های انگلی می‌تواند صفات عملکردی کلنی را بهبود بخشد و سبب افزایش عملکرد کلنی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن، سلامت دستگاه گوارش، افزایش بیان ژن ویتلوژنین و افزایش وزن بدن زنبورهای پرستار شود.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان مقاله عدم وجود تعارض منافع را اعلام می‌دارند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از کارشناسان دفتر امور پژوهشی؛ معاون آموزشی، پژوهشی و فناوری پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران برای حمایت مالی از این مطالعه سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

- [1] Wang, Y., Ma, L.T., Hang, X. B., Yang, W. R. & Liu, F. (2014). Digestion of protein of two pollen types in China by the honeybee (*Apis mellifera* L). *Apidologie, Springer Verlag*, 45 (5), 590-600.
- [2] Shawrang, P., Nikkhah, A., Zare Shahneh, A., Sadeghi, A.A., Raisali, G. & Moradi Shahrababak, M. (2008). Effects of gamma irradiation on chemical composition and ruminal protein degradation of canola meal. *Radiat. Phys. Chem.*, 77, 918-922.
- [3] Amdam, G.V., Ihle K.E. & Page R.E. (2009). Regulation of honey bee life histories by vitellogenin. In: *Hormones, brain and behavior*, 2nd edn. Elsevier Academic Press, San Diego
- [4] Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. & Amdam, G.V. (2006). Reproductive protein protects sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 962-967.
- [5] Corona, M., Hughes, K.A., Weaver, D.B. & Robinson, G.E. (2005). Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of ageing and development*, 126 (11), 1230-1238.
- [6] Shawrang, P., Sadeghi, A.A. & Aminafshar, M. (2011). Analysis of biological compounds. Islamic azad university science and research branch Publication. Tehran. Iran.
- [7] Benzie, I. & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- [8] Cantwell, G.E. (1970). Standard methods for counting nosema spores. *American Bee Journal*, 110, 222-223.
- [9] Williams, G.R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T. & Doublet, V. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1), 34-41.
- [10] Amini, M.B., Sadeghi, A.A., Shawrang, P., Chamani, M. & Aminafshar, M. (2022). Effect of nano-particles of zinc oxide and selenium supplementation on antioxidant status, aminotransferase enzyme activities and genes expression of sod-1 and vg in newborn honey bee during the hot season. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 2, 100034

- [11] Amdam, G.V., Norberg, K., Fondrk, M. K. & Page, R. E. (2004). Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11350-11355.
- [12] Lan, J., Ding, G., Ma, W., Jiang, Y. & Huang, J. (2021). Pollen source affects development and behavioral preferences in honey bees. *Insects*, 2, 12 (2),130
- [13] Bryś, M.S., Skowronek, P. & Strachecka. A. (2021). Pollen diet-properties and impact on a bee colony. *Insects*. 12 (9), 798-805.
- [14] Winston, M.L. (1991). The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, USA. Pages 294.
- [15] Lipiński, Z. (2019). Honey Bee Nutrition and Feeding. Northern publication. London, UK. Pages 400.
- [16] Wright, G.A., Nicolson, S.W. & Shafir, S. (2018). Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annual review of entomology*, 63, 327-344.
- [17] Li, C., Xu, B., Wang, Y., Yang, Z. & Yang, W. (2014). Protein content in larval diet affects adult longevity and antioxidant gene expression in honey bee workers. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 151, 19–26.
- [18] Bianchi, E., Agra, M.N., García, C., Gennari, G., Maldonado, L., Rodríguez, G.A., Palacio, M.A., Scannapieco, A.C. & Lanzavecchia, S.B. (2021). Defensive behavior and morphometric variation in *Apis mellifera* colonies from two different agro-Ecological zones of north-western Argentina. *Front. Ecol. Evol.*, 9,590225.
- [19] Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A. & Omholt, S.W. (2003). Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100 (4), 1799-1802.
- [20] Barascou, L., Sene, D., Barraud, A., Michez, D., Lefebvre, V., Medrzycki, P., Di Prisco, G., Strobl, V., Yañez, O., Neumann, P., Le Conte, Y. & Alaux, C. (2021). Pollen nutrition fosters honeybee tolerance to pesticides. *Royal Society Open Science*, 8 (9), 210818.