Animal Production Research

Vol. 11, No. 4, 2022 (91-102)
doi: 10.22124/AR.2022.22023.1696
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effect of feeding different levels of the isoleucine amino acid on hemolymph protein concentration and growth of hypopharyngeal glands in worker bees (*Apis mellifera*)

H. Vaezi[1], K. Rezayazdi[2*], Gh. A. Nehzati[3], V. Ghorbani[4]

1. Ph.D. Student of Poultry Nutrition, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Professor, Department of Animal Science, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Former MSc Student, Department of Animal Science, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: 05-06-2022 – Accepted: 23-07-2022)

Introduction: Honey bees need nutrients such as protein, carbohydrates, lipids, and minerals. Among nutrients, protein is of particular importance due to its role in brood rearing, developing hypopharyngeal glands and ovaries, longevity, bee immunity, bee weight, and flight muscle development. The protein stored in the body of bees is vitally important in strengthening the immune system, producing royal jelly, and especially in wintering. The honey bee obtains its protein needs through the digestion of different pollen grains with different amounts of protein in the midgut. Among the amino acids required by honeybees, the most important are leucine, isoleucine, and valine. Pollen quality depends on the supply of amino acids required by honey bees. Most pollen grains are poor and deficient in isoleucine. This study aimed to evaluate the effect of different levels of isoleucine on hemolymph protein and the growth of hypopharyngeal glands in worker bees

Materials and methods: To investigate the effect of different levels of isoleucine on hemolymph protein and the growth of hypopharyngeal glands in worker bees, an experiment was conducted in a completely randomized design with five experimental diets and four replications (cages). 100 honey bees were kept in each cage. Diets included 1 M sucrose syrup (control), and different levels of isoleucine containing 0.5, 1, 1.5, and 2 micrograms per liter of 1 M sucrose syrup. Before starting the experiment, the egg frames in the hives were marked so that the bees were of the same age at the time of the experiment. The cages were placed in an incubator at a temperature of 34°C and a humidity of 60%. Samples were taken to measure hemolymph protein on days 1, 6, 12, and 18 of 10 bees and for growth of hypopharyngeal glands on days 3, 6, 9, 12, and 15 of three bees. The hemolymph protein amount was measured by UV spectrophotometer and Bradford method and the growth of hypopharyngeal glands by the diameter of the ascites.

Results and discussion: The results showed that the difference in hemolymph protein and the growth of hypopharyngeal glands of bees was significant in the whole experiment period and at different ages (P<0.01). A comparison of the experimental treatments revealed that the 1.5 µg isoleucine treatment had the highest amount of hemolymph protein among the diets (6.65 µl/µg), and the difference with other treatments was significant (P<0.01). The control treatment had significantly the lowest hemolymph protein among the experimental diets (3.57 µl/µg). The use of high amounts of isoleucine decreased the hemolymph protein. Therefore, the appropriate level of isoleucine in a honey bee diet is 1.5 µg. In all diets, except the control diet, the highest amount of hemolymph protein was observed on the sixth day, but in diet control, the amount of hemolymph protein decreased. Regarding the hypopharyngeal glands, the comparison of the treatments revealed that the 1.5 µg isoleucine treatment had the largest acini diameter (0.083 mm) and its difference with other treatments was

* Corresponding author: rezayazdi@ut.ac.ir

significant (P<0.05). The control treatment (0.065 mm) significantly had the lowest acini diameter among the experimental treatments. Comparing the diameter of acini at different ages showed that the largest diameter of acini was observed at three days of age and the smallest diameter was seen at 15 days of age in all treatments. Some of the increase in hemolymph protein is likely due to the consumption of isoleucine, and some of it is due to the increase in the activity of hypopharyngeal glands because the consumption of isoleucine has increased the growth of hypopharyngeal glands.

Conclusions: In this experiment, it was found that the hypopharyngeal glands grew to the maximum level, and then, the amount of protein in the hemolymph of bees reached the highest level. Based on the findings of this research, the use of isoleucine in the diet of bees can increase the production of royal jelly and brood rearing due to its influence on the growth of hypopharyngeal glands and the amount of hemolymph protein. The appropriate level of this amino acid in bee nutrition is 1.5 µg per liter of sucrose syrup because consuming more than this optimum level harms hemolymph protein and the growth of hypopharyngeal glands.

Keywords: Isoleucine, Hemolymph protein, Worker bee, Royal jelly, Hypopharyngeal glands

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of University of Tehran, Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this project.

How to cite this article:

Vaezi H., Rezayazdi K., Nehzati G. and Ghorbani V. 2022. Effect of feeding different levels of the isoleucine amino acid on hemolymph protein concentration and growth of hypopharyngeal glands in worker bees (*Apis mellifera*). Animal Production Research, 11(4): 91-102. doi: 10.22124/AR.2022.22023.1696

تحقیقات تولیدات دامی

سال یازدهم/شماره چهارم/زمستان ۱۴۰۱ (۱۰۲-۹۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

اثر تغذیه سطوح مختلف اسید آمینه ایزولوسین بر غلظت پروتئین همولنف و رشد غدد هیپوفارنژیال در زنبوران کارگر (*Apis mellifera*)

حامد واعظی[۱]، کامران رضایزدی[۲*]، غلامعلی نهضتی[۳]، وحید قربانی[۴]

۱- دانشجوی دکتری تغذیه طیور،گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۴- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱)

چکیده

جهت بررسی تاثیر سطوح مختلف ایزولوسین بر پروتئین همولنف و رشد غدد هیپوفارنژیال زنبوران کارگر، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج جیره آزمایشی و چهار تکرار (قفس) انجام شد. تعداد ۱۰۰ زنبور در هر قفس نگهداری شدند. جیره‌ها شامل شربت یک مولار ساکارز (شاهد)، و سطوح مختلف ایزولوسین حاوی ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میکروگرم در لیتر شربت یک مولار ساکارز بودند. برای اندازه‌گیری پروتئین همولنف در روزهای ۱، ۶، ۱۲ و ۱۸ از ۱۰ زنبور و برای رشد غدد هیپوفارنژیال در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ از سه زنبور نمونه‌گیری شد. پروتئین همولنف با روش بردفورد و رشد غدد هیپوفارنژیال با استفاده از قطر آسینی‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که تفاوت پروتئین همولنف و رشد غدد هیپوفارنژیال زنبورها در کل دوره آزمایش و در سنین مختلف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$). جیره حاوی ۱/۵ میکروگرم ایزولوسین و جیره شاهد به ترتیب بیشترین (۶/۶۵ µg/µL) و کمترین (۳/۵۷ µg/µL) پروتئین همولنف را داشتند. در مورد رشد غدد هیپوفارنژیال، تیمار ۱/۵ میکروگرم ایزولوسین دارای بیشترین (۰/۰۸۳ mm) و تیمار شاهد دارای کمترین (۰/۰۶۵ mm) قطر آسینی بودند. پروتئین همولنف در شربت حاوی ۰/۵ و ۲ میکروگرم ایزولوسین و رشد غدد هیپوفارنژیال در تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۲ میکروگرم ایزولوسین دارای اختلاف معنی‌دار نبودند. با توجه به اینکه بهترین عملکرد تولیدی زنبوران عسل با تغذیه شربت حاوی ۱/۵ میکروگرم ایزولوسین حاصل شد، این سطح جهت تغذیه زنبور عسل توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ایزولوسین، پروتئین همولنف، زنبور کارگر، ژله رویال، غدد هیپوفارنژیال

* نویسندهٔ مسئول: rezayazdi@ut.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2022.22023.1696

مقدمه

زنبور عسل نیز مانند سایر حیوانات به مواد مغذی مانند پروتئین، کربوهیدرات، لیپیدها و مواد معدنی نیاز دارد. در بین مواد مغذی، پروتئین به دلیل نقشی که در پرورش نوزادان، توسعه غدد هیپوفارنژیال (*Hypopharyngeal gland*) تخمدان‌ها، طول عمر، ایمنی زنبور، وزن زنبوران و رشد عضلات پروازی دارد از اهمیت خاصی برخوردار است (Manning, 2001). پروتئین ذخیره شده در بدن زنبوران اهمیت حیاتی در تقویت سیستم ایمنی، تولید ژل رویال و به ویژه در بحث زمستان‌گذرانی دارد (Lee *et al*., 2006). چرخه مصرف پروتئین در زنبوران کارگر به این صورت است که در زنبوران پرستار جوان (۱۲-۶ روزگی) از راه غدد هیپوفارنژیال موجود در سر برای تولید ژل رویال و در زنبوران در سن ۱۳ تا ۱۸ روزگی از راه هشت عدد غده موجود در شکم (غدد موم‌ساز) برای تولید موم و بعد از ۱۸ روزگی، اسیدهای آمینه آزاد صرف عضلات پروازی شده و موجب رشد آنها و شروع فعالیت چراگری می‌شوند (Amrine Jr and Noel, 2010). زنبور عسل نیاز پروتئین خود را از راه هضم دانه‌های گرده مختلف با مقادیر متفاوت پروتئین در روده میانی (*Midgut*) به‌دست می‌آورد (Manning *et al.*, 2007). کیفیت گرده هم در شرایط مزرعه‌ای و هم در آزمایش‌های قفس بر فراسنجه‌هایی مانند طول عمر، رشد غدد هیپوفارنژیال و مقاومت در برابر بیماری‌ها تاثیرگذار است (Paiva *et al.*, 2016). بنابراین یکی از مهم‌ترین کاربردهای گرده، استفاده از آن برای تولید ژل رویال است. ژل رویال غذایی است که به وسیله زنبوران کارگر در سن پرستاری تولید شده و برای تغذیه ملکه، توسعه و رشد لارو ملکه، لارو نر و لارو کارگر تا ۷۲ ساعت استفاده می‌شود. بعد از ۷۲ ساعت، لارو کارگر از گرده و شهد استفاده می‌کند، ولی تغذیه لارو ملکه با ژل رویال ادامه می‌یابد (Somerville, 2005).

تبدیل مواد مغذی موجود در گرده به ژل رویال در یک جفت غده غذایی که به عنوان غدد هیپوفارنژیال شناخته می‌شود، اتفاق می‌افتد. این غدد در سر زنبور و در ناحیه پیشانی قرار دارند (Hrassnigg and Crailsheim, 1998). این غدد شامل آسینی‌هایی هستند که ژل با پروتئین غنی تولید می‌کند، که این ژل برای لاروها و ملکه به عنوان غذا محسوب می‌شود. زنبوران پرستار، ژل رویال را در داخل کلنی از راه ارتباط تغذیه‌ای (*Trophallactic contacts*) توزیع می‌کنند. با این سیستم، مواد مغذی موجود در گرده در سراسر کلنی زنبور عسل پخش می‌شود (Hrassnigg *et al.*, 2005). میزان فعالیت غدد هیپوفانژیال و تولید ژل رویال تحت تاثیر کمیت و کیفیت گرده قرار می‌گیرد (Harris *et al.*, 2018). زنبوران پرستار نقش کلیدی در هضم گرده و توزیع پروتئین ترشح شده از غدد هیپوفارنژیال در بین اعضای کلنی بر عهده دارند. زمانی‌که کیفیت و کمیت گرده در دسترس برای زنبوران محدود شود، تغذیه تک تک زنبوران و همچنین کل کلنی می‌تواند به شدت تحت تاثیر قرار گیرد (Brodschneider and Crailsheim, 2010)، چرا که رابطه موثری بین ایمنی گروهی و فردی با وضعیت تغذیه کلنی وجود دارد و با تغذیه ضعیف زنبور، بیماری‌های عفونی زنبور افزایش و سلامتی آنها در معرض تهدید قرار می‌گیرد. بنابراین، در مبارزه با چالش‌های سلامتی زنبوران، پیشنهاد شده است ضمن بهبود مقاومت تغذیه‌ای زنبورها با گرده از راه اجرای برنامه‌های حفاظتی و اصلاحی کمیت و تنوع گیاهی در طبیعت، می‌توان از مکمل‌های غذایی برای رفع کمبودهای غذایی زنبوران بهره جست. نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد میزان پروتئین جیره‌های غذایی، سطح پروتئین همولنف زنبوران کارگری را در شرایط آزمایشگاهی (قفس) افزایش می‌دهد. بنابراین ارزش آن شبیه به تغذیه طبیعی با دانه گرده در نظر گرفته می‌شود (Crailsheim *et al.*, 1996). استفاده از پودر گوشت در مکمل پروتئینی زنبور عسل باعث بهبود تخم‌ریزی، پرورش نوزاد و تولید عسل می‌شود که مناسب‌ترین سطح استفاده از پودر گوشت، ۴/۵-۳ درصد گزارش شده است (Badalivand *et al.*, 2013). تغذیه کلنی‌ها با مکمل پروتئینی تا حدودی همانند گرده باعث تامین جریان مواد مغذی مورد نیاز کلنی شده و منجر به تحریک غدد هیپوفارنژیال در زنبوران کارگر جوان به تولید ژل رویال و افزایش میزان رشد جمعیت در کلنی می‌شود که این حالت، شبیه تغذیه با گرده برای کلنی‌ها است (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2008). در بین اسیدهای آمینه مورد نیاز زنبور عسل (جدول ۱)، بیشترین نیاز مربوط به لوسین، ایزولوسین و والین است. با توجه به اینکه کیفیت گرده به میزان تامین اسیدهای آمینه مورد نیاز زنبور عسل وابسته است، برخی از گرده‌ها فاقد کلیه اسیدهای آمینه مورد نیاز زنبورها هستند (Amrine Jr and Noel, 2010). بیشتر

دانه‌های گرده از لحاظ اسید آمینه ایزلوسین فقیر بوده و کمبود دارند (Groot, 1953). محدودیت در هر یک از این اسیدهای آمینه ضروری باعث محدود شدن توسعه و رشد کلنی زنبور عسل می‌شود (Somerville, 2005). بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر اسید آمینه ایزولوسین روی میزان پروتئین همولنف، رشد غدد هیپوفارنژیال و همچنین مشخص کردن سطح مناسب استفاده از این اسید آمینه در تغذیه زنبور عسل بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه زنبور عسل گروه علوم دامی دانشگاه تهران انجام شد. این آزمایش با استفاده از ۲۰ قفس به مدت ۱۸ روز در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج جیره و چهار تکرار برای هر جیره صورت گرفت. قبل از شروع آزمایش، قاب‌های حاوی تخم در کندوها علامت‌گذاری شدند تا در زمان شروع آزمایش، زنبوران هم‌سن باشند. قفس‌ها داخل انکوباتور در دمای ۳۴ درجه سلسیوس و میزان رطوبت ۶۰ درصد قرار داده شدند. در این آزمایش از قفس‌های چوبی با ابعاد ۱۸×۱۴×۹ سانتی‌متر که برای نگهداری حدود ۱۰۰ زنبور عسل جهت آزمایش‌ها در قفس طراحی شده است، استفاده شد.

آماده کردن جیره‌های غذایی: این آزمایش با پنج جیره انجام گرفت که تیمارها شامل: تیمار شاهد (شربت یک مولار ساکارز)، تیمار ۰/۵ میکروگرم ایزولوسین (۰/۵گرم ایزولوسین در یک لیتر شربت یک مولار ساکارز)، تیمار یک میکروگرم ایزولوسین (یک گرم ایزولوسین در یک لیتر شربت یک مولار ساکارز)، تیمار ۱/۵ میکروگرم ایزولوسین (۱/۵ گرم ایزولوسین در یک لیتر شربت یک مولار ساکارز)، و تیمار دو میکروگرم (دو گرم ایزولوسین در یک لیتر شربت یک مولار ساکارز) بودند. اسید آمینه ایزولوسین مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک تهیه شد. برای مصرف بهتر اسید آمینه، ایزولوسین در شربت یک مولار ساکاروز حل شده و در فالکون (۱۰mL) موجود داخل هر قفس ریخته شد.

اندازه‌گیری غدد هیپوفارنژیال: اندازه‌گیری قطر آسینی‌ها در غدد هیپوفارنژیال در زنبوران کارگر در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ آزمایش انجام شد. برای این کار از هر قفس، سه زنبور به‌طور تصادفی انتخاب شد، سپس سر زنبوران جدا شده و بخش پشت سر زنبور، باز شده و غدد هیپوفارنژیال با استفاده از پنس نوک تیز بیرون آورده شد. با استفاده از دوربین DinoCapture 2.0 و تنظیم واحد اندازه‌گیری روی میلی‌متر در هر هیپوفارنژیال، قطر سه آسینی به‌طور تصادفی اندازه‌گیری و میانگین آنها به عنوان قطر آسینی برای هر زنبور کارگر در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری میزان همولنف: همولنف‌گیری از زنبوران کارگر در روزهای ۱، ۶، ۱۲ و ۱۸ انجام شد. برای همولنف‌گیری از هر قفس، ۱۰ زنبور به‌صورت تصادفی انتخاب شده و بین بندهای سوم و چهارم شکمی شکاف ایجاد شد و همولنف‌گیری با سمپلر صورت گرفت. برای جلوگیری از فساد نمونه‌های همولنف تا زمان اندازه‌گیری میزان پروتئین همولنف، آنها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. مقدار پروتئین همولنف با دستگاه اسپکتوفتومتر UV و با روش بردفورد اندازه‌گیری شد (Cremonz,1998).

تجزیه و تحلیل آماری: این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار انجام شد. مدل آماری مورد استفاده به‌صورت زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + e_{ijk}$$

که در آن، Y_{ijk} متغیر وابسته، μ میانگین کل، T_i اثر i امین تیمار، P_j اثر j امین سن، TP_{ij} اثر متقابل سن و تیمار، و e_{ijk} اثر اشتباه آزمایشی بودند. داده‌های به‌دست آمده با رویه‌های MIXED و GLM نرم افزار SAS9.2 تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱- اسیدهای آمینه ضروری در تغذیه زنبور عسل

Table 1. Essential amino acids in the honey bee nutrition*

Amino acid	Thr	Val	Met	Ile	Leu	Phe	His	Lys	Arg	Trp
Ideal ratio[1]	4	3	1.5	4	4.5	1.5	1.5	3	3	1

[1] g per 16 g N

* Extracted from De Groot (1953)

Fig. 1. Removing hypopharyngeal glands from worker bees' head

شکل ۱- خارج کردن غدد هیپوفانژیال از سر زنبوران کارگر

نتایج و بحث

پروتئین هموlنف: نتایج مربوط به تاثیر سطوح مختلف اسید آمینه ایزولوسین روی میزان پروتئین هموlنف زنبوران کارگر در سنین مختلف و همچنین کل دوره آزمایشی در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که تفاوت بین سطوح مختلف ایزولوسین و همچنین سنین مختلف از لحاظ میزان پروتئین هموlنف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$). مقایسه میانگین بین جیره‌های آزمایشی مشخص کرد که تیمار ۱/۵ میکروگرم ایزولوسین با میانگین ۶/۶۵ میکروگرم در میکرولیتر دارای بیشترین میزان پروتئین هموlنف بودند و تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$). تیمار شاهد با میانگین ۳/۵۷ میکروگرم در میکرولیتر به‌طور معنی‌داری دارای کمترین میزان پروتئین هموlنف در بین جیره‌های آزمایشی بود. در کل دوره آزمایشی، بین تیمارهای ۰/۵و ۲ میکروگرم ایزولوسین از لحاظ میزان پروتئین هموlنف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (۰/۱۳۳۶ =P). نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از ایزولوسین نسبت به تیمار شاهد سبب افزایش میزان پروتئین هموlنف در زنبوران کارگر شده است که با نتایج تحقیقات دیگر مطابقت داشت (Crailsheim, 1988; Cremonz, 1998; Babendrier, 2004; Cappelari, 2009; De Jong *et al*., 2009; Rezaei *et al.,* 2012; Basualao *et al*., 2013; Morais *et al*., 2013; Renzi *et al*., 2016). نتایج یک تحقیق روی مصرف جیره‌های پروتئینی با منابع مختلف پروتئینی در زنبوران کارگر نشان داد که بیشترین میزان پروتئین هموlنف مربوط به جیره گلوتن تخمیری ۱۵/۶ میکروگرم در میکرولیتر و کمترین میزان پروتئین هموlنف مربوط به شربت ساکارز ۹/۰۵ میکروگرم در میکرولیتر بود (Rezaei *et al.,* 2012). زنبوران تغذیه شده با جانشین گرده تجاری Feed Bee، Bee pro و همچنین گرده به ترتیب ۲/۵۶، ۲/۵۱ و ۱/۷۶ برابر پروتئین هموlنف بیشتری نسبت به زنبورهای تغذیه شده با ساکاروز داشتند (Babendrier *et al*., 2004; Renzi *et al*., 2016). در مقایسه بین زنبوران آفریقایی و زنبوران اروپائی کارنیولان، بیشترین میزان پروتئین هموlنف در هر دو گروه مربوط به نان زنبور به ترتیب با ۳۷/۵ و ۲۸/۶ میکروگرم در میکرولیتر وکمترین میزان نیز مربوط به ساکارز به ترتیب با ۴/۴۹ و ۳/۰۳ میکروگرم در میکرولیتر بوده و به‌طور کلی مصرف نان زنبور باعث افزایش پروتئین هموlنف می‌شود (Cappelari *et al.,* 2009; Morais *et al.,* 2013; DeGrandi-Hoffman *et al.,* 2018). نتایج مطالعات نشان داده است که مصرف جانشین گرده Feed Bee نسبت به شربت ساکارز باعث افزایش پروتئین هموlنف می‌شود (De Jong *et al*., 2009; Dias *et al*., 2018). همچنین مشخص شده است که با افزایش میزان پروتئین خام در جیره، میزان پروتئین هموlنف نیز افزایش می‌یابد. تغذیه زنبوران با جیره غذایی دارای ۲۹ درصد پروتئین خام نسبت به جیره غذایی با ۱۰ درصد پروتئین خام و شربت ساکارز، میزان پروتئین هموlنف بیشتری داشته و تفاوت آن با گروه شاهد معنی‌دار بود (Basualao *et al*., 2013). با توجه به اینکه میزان پروتئین هموlنف در زنبوران کارگر تحت تاثیر کمیت و کیفیت پروتئین جیره غذایی و فعالیت غدد هیپوفارنزیال است،

احتمالاً بخشی از افزایش میزان پروتئین همولنف به دلیل مصرف اسید آمینه ایزولوسین بوده و بخشی نیز به دلیل افزایش فعالیت غدد هیپوفارنژیال است چون مصرف اسید آمینه ایزولوسین موجب افزایش رشد غدد هیپوفارنژیال شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در بین زنبوران تغذیه شده با سطوح مختلف اسیدآمینه ایزولوسین، سطح ۱/۵ میکروگرم بهترین عملکرد را در میزان پروتئین همولنف داشت، اما استفاده از مقادیر بالای این اسید آمینه باعث کاهش پروتئین همولنف شد. بنابراین سطح مناسب اسید آمینه ایزولوسین در جیره زنبور عسل، ۱/۵ میکروگرم است. شکل ۲ میزان پروتئین همولنف در روزهای ۱، ۶، ۱۲ و ۱۸ را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، در تمامی جیره‌ها به‌جز جیره شاهد، بیشترین میزان پروتئین همولنف در روز ششم مشاهده شد، ولی میزان پروتئین همولنف در جیره شاهد کاهش یافته است که با نتایج دیگر مطالعات مطابقت داشت (Cremonz *et al*., 1998; Mattila and Otis, 2006; Cappelari *et al*., 2009; DeGrandi-Basualao *et al*., 2013; Hoffman *et al*., 2013; Morais, 2013). در یک مطالعه، اندازه‌گیری میزان پروتئین همولنف در بین روزهای صفر تا ششم نشان داد که پروتئین همولنف در همه جیره‌ها به‌جز جیره ساکارز و عسل، افزایش یافته است و بیشترین میزان پروتئین همولنف در روز ششم مشاهده شد (Cappelari *et al*., 2009).

در یک پژوهش، اندازه‌گیری میزان پروتئین همولنف در سنین ۴، ۷ و ۱۱ روزگی در زنبوران آفریقایی و اروپائی که با نان زنبور تغذیه شده‌اند نشان داد که میزان پروتئین همولنف طی روزهای ۴ تا ۷ افزایش یافته است، ولی میزان آن از روز ۷ تا ۱۱ کاهش یافته است. در بین روزها نیز روز هفتم دارای بیشترین میزان پروتئین همولنف بود (DeGrandi-Hoffman *et al*., 2013). در پژوهش حاضر، پس از روز ششم، میزان پروتئین همولنف کاهش پیدا کرده است که احتمالاً دلیل این اتفاق مربوط به مرحله زندگی و تغییر وظیفه زنبوران است، چون با افزایش سن، زنبوران جوان که بالغ شدند (مرحله پرستاری را پشت سر گذاشته‌اند) تمامی رفتارهای رشدی خود را انجام داده و خوردن گرده در آنها بسیار کاهش می‌یابد. همچنین توانایی آنها برای هضم پروتئین جامد نیز کاهش می یابد (Chan *et al*., 2011). زنبوران بین روزهای ۴ تا ۹ از زندگی خود، وظیفه پرستاری و تولید ژله رویال (ترکیب غنی از پروتئین برای تغذیه لاروها و ملکه) را دارند و پس از ۹ روزگی، بیشتر وظیفه چراگری (جمع‌آوری شهد و گرده) را بر عهده دارند. احتمالاً این تغییر وظیفه موجب می‌شود که عمدتاً از پروتئین برای رشد عضلات پروازی استفاده شود (DeGrandi-Hoffman *et al*., 2013; Harris *et al*., 2018). پروتئین‌ها حدوداً ۶۶ تا ۷۷ درصد از ماده خشک بدن زنبوران کارگر را تشکیل می‌دهند (Hrassnigg and Crailsheim, 2005). میزان پروتئین در بدن زنبوران کارگر در روزهای اول به دلیل آنابولیسم پروتئین افزایش پیدا می‌کند، ولی این میزان در کارگران مسن، کاهش پیدا می‌کند (Crailsheim, 1996).

رشد و توسعه غدد هیپوفارنژیال: نتایج مربوط به تاثیر سطوح مختلف اسید آمینه ایزولوسین روی رشد غدد هیپوفارنژیال زنبوران کارگر در سنین مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که اثر تیمارهای آزمایشی روی قطر آسینی‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارهای آزمایشی مشخص کرد که تیمار ۱/۵ میکروگرم ایزولوسین با میانگین mm ۰/۰۸۳، بیشترین قطر آسینی را در بین تیمارها داشته و تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). تیمار شاهد با میانگین mm ۰/۰۶۵ به‌طور معنی‌داری کمترین قطر آسینی را در بین تیمارهای آزمایشی داشت. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از ایزولوسین باعث افزایش قطر آسینی‌ها در زنبوران شده است که با نتایج مطالعات دیگر مطابقت داشت (Huang, 1989; DeGrandi-Hoffman *et al*., 2010; Altaye *et al*., 2010; Harris *et al*., 2018). مقایسه قطر آسینی‌ها در سنین مختلف نشان داد که بیشترین قطر آسینی‌ها در سن سه روزگی و کمترین قطر نیز در ۱۵ روزگی در همه تیمارها اتفاق افتاده است. یافته‌های آزمایش حاضر با نتایج Hoffman- DeGrandi (2010) که بیشترین قطر آسینی‌ها را در روز چهار اندازه‌گیری کرده مطابقت داشت، ولی با نتایج Altaye (2010) و Harris (2018) که به ترتیب بیشترین قطر آسینی را در روز ۶ و ۷ تا ۱۰ مشاهده کرده بودند مغایرت داشت. البته بیشترین میزان رشد در غدد هیپوفارنژیال در بین روزهای ۳ تا ۹ اتفاق می‌افتد (Huang *et al*., 1989). غدد هیپوفارنژیال تحت تاثیر سن کارگران، مرحله نوزادی و پرورش نوزادان قرار دارد، در بین این عوامل، سن زنبوران تاثیر قابل توجهی در رشد غدد هیپوفارنژیال دارد. همچنین

وجود لارو داخل کلنی باعث تحریک بیشتر غدد هیپوفارنژیال می‌شود (Harris *et al*., 2018). استفاده از مکمل پروتئینی، اندازه قطر آسینی‌های غدد هیپوفارنژیال را در روزهای مختلف تحت تاثیر قرار می‌دهد، به‌طوری که در بین جیره‌های آزمایشی، بیشترین قطر آسینی مربوط به مکمل پروتئینی با ۹ میکرومتر و کمترین آن مربوط به جیره شربت ساکارز با ۵/۸ میکرومتر است (DeGrandi-Hoffman *et al*., 2010).

با توجه به شکل ۳، با افزایش سن، غدد هیپوفارنژیال دچار تحلیل شدند که دلیل از بین رفتن غدد هیپوفارنژیال احتمالاً مربوط به تغییر رفتار در زنبوران کارگر بود (Vannette *et al*., 2015). در واقع زمانی که زنبوران کارگر از حالت پرستاری به چراگری تغییر وظیفه می‌دهند، یکسری تغییرات فیزیولوژیکی و رفتاری در زنبوران پرستار اتفاق می‌افتد که آنها را آماده شروع فعالیت چراگری خواهد کرد (مانند کاهش در ذخیره چربی بدن، تحلیل غدد هیپوفارنژیال و کاهش قابلیت هضم پروتئین‌های گرده) (Schmickl and Crailsheim, 2004; Harris *et al.*, 2018). در این آزمایش مشخص شد که ابتدا غدد هیپوفارنژیال حداکثر رشد را نموده و پس از آن، میزان پروتئین در همولنف زنبوران به بیشترین حد می‌رسد. در واقع احتمالاً یکی از دلایل افزایش پروتئین همولنف در زنبوران، افزایش رشد غدد هیپوفارنژیال است.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس یافته‌های این پژوهش، استفاده از اسید آمینه ایزولوسین در جیره زنبوران با توجه به تاثیرگذاری روی رشد غدد هیپوفارنژیال و میزان پروتئین همولنف می‌تواند باعث افزایش تولید ژل رویال و پرورش نوزاد زنبور شود. سطح مناسب این اسید آمینه در تغذیه زنبور عسل برابر با ۱/۵ میکروگرم در لیتر شربت ساکارز است.

جدول ۲- اثر تغذیه سطوح مختلف اسید آمینه ایزولوسین بر میزان پروتئین همولنف زنبوران کارگر در سنین ۱، ۶، ۱۲ و ۱۸ روزگی

Table 2. Effect of feeding different levels of the isoleucine amino acid on hemolymph protein in worker bees at 1, 6, 12, and 18 days of age

		Hemolymph protein (µg/µL)				
		Day				
Item		1	6	12	18	Total
Treatment[1]						
	Control	5.48^{b}	4.83^{d}	2.38^{d}	1.60^{d}	3.57^{d}
	0.5 µg/L isoleucine	5.08^{c}	7.43^{c}	4.40^{bc}	2.16^{c}	4.77^{c}
	1 µg/L isoleucine	5.73^{a}	8.04^{b}	4.49^{b}	3.21^{b}	5.37^{b}
	1.5 µg/L isoleucine	5.81^{a}	10.05^{a}	6.28^{a}	4.01^{a}	6.65^{a}
	2 µg/L isoleucine	5.22^{c}	7.58^{c}	4.08^{c}	1.71^{d}	4.65^{c}
SEM		0.072	0.132	0.119	0.113	0.055
C.V		2.14	3.47	5.5	8.93	
Day		5.47^{b}	7.59^{a}	4.33^{c}	2.54^{d}	
SEM		0.069	0.069	0.069	0.069	
P-value						
	Treatment	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
	Day	0.001	0.001	0.001	0.001	
	Treatment×Day	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

[1] Treatments included: control (1 M sucrose syrup), 0.5 µg/L (0.5 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), 1 µg/L (1 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), 1.5 µg/L (1.5 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), 2 µg/L (2 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup).

[a-c] Values with different superscripts within a column are significantly different (P<0.05).

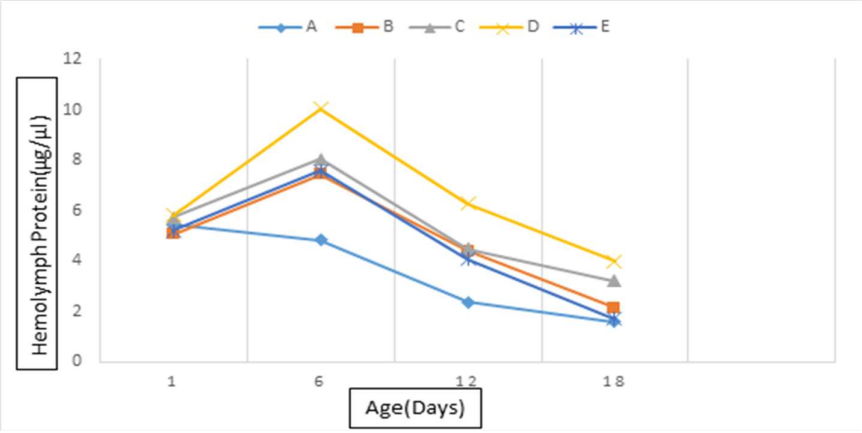

Fig. 2. Mean amount of hemolymph for different levels of the isoleucine at different ages
Treatments included: A: Control (1 M sucrose syrup), B: 0.5 µg/L (0.5 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), C: 1 µg/L (1 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), D: 1.5 µg/L (1.5 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), E: 2 µg/L (2 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup)

شکل ۲- میانگین میزان پروتئین همولنف سطوح مختلف ایزولوسین در سنین مختلف. تیمارها شامل: تیمار A (شاهد، شربت یک مولار ساکارز)، تیمار B: ۰/۵ میکروگرم ایزولوسین (۰/۵گرم ایزولوسین در یک لیتر شربت یک مولار ساکارز)، تیمار C: یک میکروگرم ایزولوسین (یک گرم ایزولوسین در یک لیتر شربت یک مولار ساکارز)، تیمار D: ۱/۵ میکروگرم ایزولوسین (۱/۵ گرم ایزولوسین در یک لیتر شربت یک مولار ساکارز)، و تیمار E: دو میکروگرم (دو گرم ایزولوسین در یک لیتر شربت یک مولار ساکارز) بودند

جدول ۳- اثر تغذیه سطوح مختلف اسید آمینه ایزولوسین بر اندازه آسینی های غدد هیپوفارنژیال (mm) زنبوران کارگر در سنین ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روزگی

Table 3. Effect of different levels of the amino acid, isoleucine on acinus of hypopharyngeal gland (*mm*) size in worker bees at 3,6,9,12,15 day of age

		Hypopharyngeal gland (mm)					
		Day					
Item		3	6	9	12	15	Total
Treatment							
	Control	0.078^{c}	0.073^{c}	0.067^{c}	0.058^{c}	0.051^{c}	0.065^{c}
	0.5µg/L isoleucine	0.099^{a}	0.084^{b}	0.076^{b}	0.067^{b}	0.055^{bc}	0.076^{b}
	1 µg/L isoleucine	0.089^{b}	0.083^{b}	0.078^{b}	0.069^{b}	0.058^{b}	0.0759^{b}
	1.5µg/L isoleucine	0.097^{a}	0.092^{a}	0.083^{a}	0.076^{a}	0.065^{a}	0.083^{a}
	2 µg/L isoleucine	0.095^{a}	0.079^{bc}	0.074^{b}	0.072^{ab}	0.057^{b}	0.0758^{b}
SEM		0.0017	0.0022	0.0013	0.0018	0.0015	0.0011
C.V		3.89	5.53	3.56	5.25	5.52	
Day		0.091^{a}	0.082^{b}	0.076^{c}	0.068^{d}	0.057^{e}	
SEM		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	
P-value							
	Treatment	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Day	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	
	Treatment×Day	0.0011	0.0011	0.0011	0.0011	0.0011	

[1] Treatments included: control (1 M sucrose syrup), 0.5 µg/L (0.5 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), 1 µg/L (1 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), 1.5 µg/L (1.5 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup), 2 µg/L (2 g isoleucine per 1 liter of 1 M sucrose syrup).
[a-d] Values with different superscripts within a column are significantly different (P<0.05).

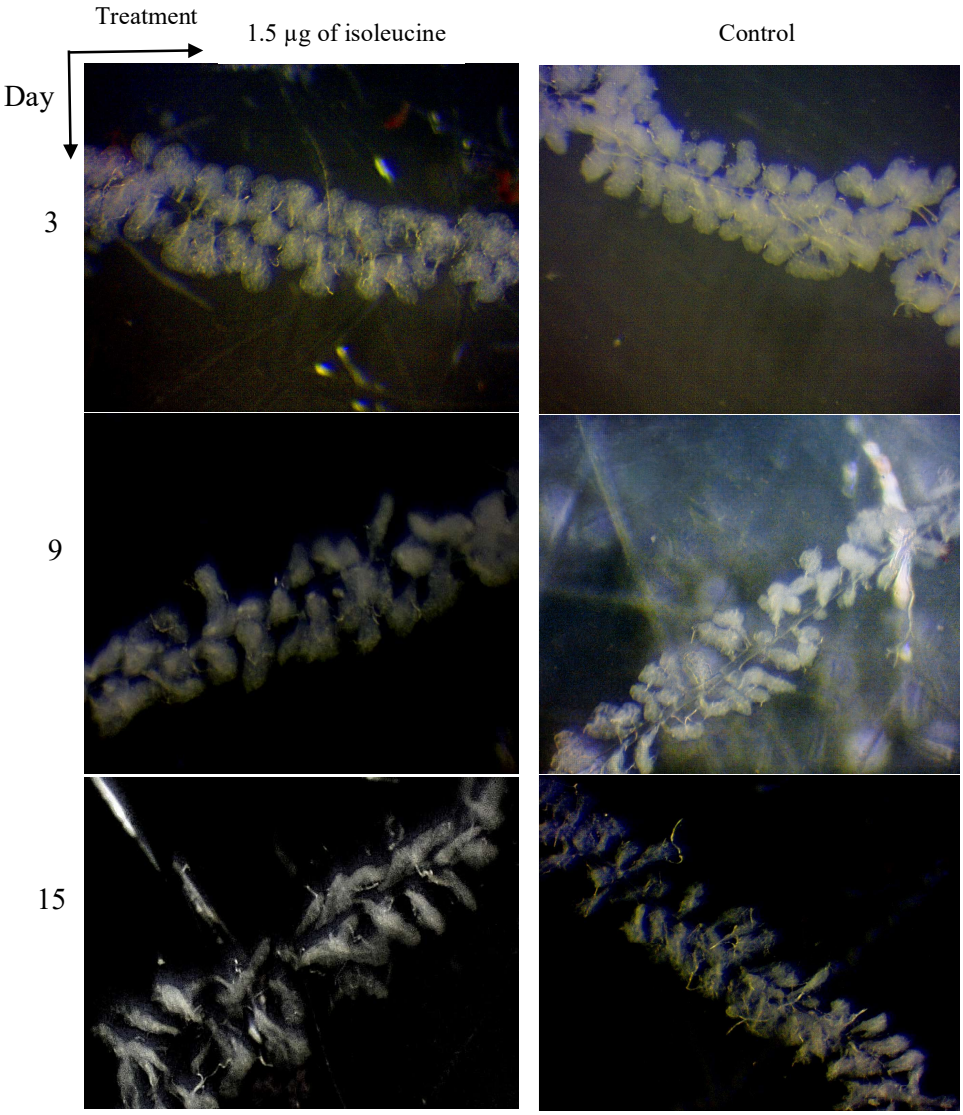

Fig. 3. Comparison of the size of hypopharyngeal glands in the control treatment (Right) and the treatment of 1.5 µg of isoleucine (Left) on days 3, 9, and and 15 of age

شکل ۳- مقایسه اندازه آسینی‌های غدد هیپوفانرژیال در تیمار شاهد (سمت راست) و تیمار ۱/۵ میکروگرم ایزولوسین (سمت چپ) در سنین ۳، ۹ و ۱۵ روزگی

فهرست منابع

Altaye S. Z., Pirk C. W., Crewe R. M. and Nicolson S. W. 2010. Convergence of carbohydrate-biased intake targets in caged worker honeybees fed different protein sources. Journal of Experimental Biology, 213: 3311-3318.

Amrine Jr. J. W. and Noel R. C. 2010. Proteins, Honey Bee Nutrition and Amino-B Booster™. Journal of American Bee, 150(4): 363-365.

Babendreier D., Kalberer N., Romeis L., Fluri P. and Bigler F. 2004. Pollen consumption in honeybee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. Journal of Apidologie, 35: 293-300.

Badalivand M., Afrouziyeh M. and Kargarirezapour A. 2014. Effect of replacing soybean meal with meat meal in protein supplements of honeybee. Animal Production Research, 2(4): 35-42. (In Persian).

Basualdo M., Barragán S., Vanagas L. and García C. 2013. Conversion of high and low pollen protein diets into protein in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology, 106: 1553-1558.

Brodschneider R. and Crailsheim K. 2010. Nutrition and health in honey bees. Journal of Apidologie, 41: 278-294.

Cappelari F., Turcatto A., Morais M. and De Jong D. 2009. Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (Apis mellifera carnica). Journal of Genetics and Molecular Research, 8(4): 1245-1249.

Chan Q. W. T., Muttl S. N., Foster L. J., Kocher S. D. and Adam G. V. 2011. The worker honeybee fat body proteome is extensively remodeled preceding a major life-history transition. PLoS One, 6(9): e24794.

Crailsheim K. 1988. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.). Journal of Insect Physiology, 34: 839-845.

Crailsheim K., Hrassnigg N. and Stabentheiner A. 1996. Diurnal behavioural differences in forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollm). Journal of Apidologie, 27: 235-244.

Cremonz T. M., De Jong D. and Bitondi M. M. 1998. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology, 91: 1284-1289.

Dias J., Morais M., Francoy T., Turcatto A. and De Joug D. 2018. Fermentation of a pollen substitute diet with beebread microorganisms increases diet consumption and hemolymph protein levels of honey bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of Sociobiology, 65(4): 760-765.

DeGrandi-Hoffman G., Corby-Harris V., Carroll M., Chambers M. and Graham H. 2018. Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Journal of Insect Physiology, 109: 114-124.

DeGrandi-Hoffman G., Chen Y., Huang E. and Huang M. H. 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Journal of Insect Physiology, 56: 1184-1191.

DeGrandi-Hoffman G., Eckholm B. J. and Huang M. H. 2013. A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. Journal of Apidologie, 44: 52-63.

DeGrandi-Hoffman G., Chen Y. and Huang M. H. 2008. Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. Journal of Apicultural Research, 47: 265-270.

Groot A. P. D. 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.). The University of Wisconsin–Madison. P. 90.

Harris V. and Snyder L. A. 2018. Measuring Hypopharyngeal Gland Acinus Size in Honey Bee (*Apis mellifera*) Workers. Journal of Visualized Experiments, 139:139-146.

Huang Z. Y., Otis G. W. and Teal P. E. A. 1989. Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera). Journal of Apidologie, 20: 455-464.

Hrassnigg N., Brodschneider R., Fleischmann P. H. and Crailsheim K. 2005. Unlike nectar foragers, honeybee drones (*Apis mellifera*) are not able to utilize starch as fuel for flight. Journal of Apidologie, 36: 547-554.

Hrassnigg N. and Crailsheim K. 1998. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Journal of Insect Physiology, 44: 929-939.

Hrassnigg N. and Crailsheim K. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). Journal of Apidologie, 36: 255-277.

Lee K., Cory J., Wilson K., Raubenheimer D. and Simpson S. 2006. Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar. Proceedings of the Royal Society of London. Journal of Biological Sciences, 273: 823-829.

Manning R.2001. Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. Journal of Bee World, 82: 60-75.

Manning R., Rutkay A., Eaton L. and Dell B. 2007. Lipid_enhanced pollen and lipid-reduced flour diets and their effect on the longevity of honey bees (*Apis mellifera* L.). Australian Journal of Entomology, 46: 251-257.

Mattila H. and Otis G. 2006. Influence of pollen diet in spring on development of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. Journal of Economic Entomology, 99: 604-613.

Morais M. M., Turcatto A. P. and Francoy T. M. 2013. Evaluation of inexpensive pollen substitute diets through quantification of haemolymph proteins. Journal of Apicultural Research, 52: 119-121.

Paiva J. P. L. M., Paiva H. M., Esposito E. and Morais M. M. 2016. On the effects of artificial feeding on bee colony dynamics: a mathematical model. PLoS One, 11: 156-163.

Renzi M. T., Medrzycki P., Martini A. and Maini S. 2016. Combined effect of pollen quality and thiamethoxam on hypopharyngeal gland development and protein content in *Apis mellifera*. Journal of Apidologie, 47: 779-788.

Rezaei A. 1391. The effect of silage protein materials on palatability, carcass composition, neonatal development and bee colony population growth, MSc Dissertation, University of Tehran, Karaj, Iran. (In Persian).

Schmickl T. and Crailsheim K. 2004. Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. Journal of Apidologie, 35: 249-263.

Somerville D. and Nicol H. 2006. Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. Animal Production Science, 46: 141-149.

Vannette R. L., Mohamed A. and Johnson B. R. 2015.Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. Scientific Reports, 5: 1622-1631.