15(4) 15-22, Winter 2024

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of heat stress and nano-zinc oxide on the queen bee egg-laying rate, and expression of genes affecting immune system and heat resistance in honey bees

Mohammad Bagher Amini Esfid Vajani [1], Ali Asghar Sadeghi [1], Parvin Shawrang [2], Mohammad Chamani [1], Mehdi Aminafshar [1]*

[1] *Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran*

Key Words

Heat stress
Nano-zinc oxide
Queen spawning
Heat resistance
Honey bee

Abstract

Introduction: In the hot seasons and tropical regions, honey bees are exposed to heat stress, to minimize the effect of heat stress, either hive should be moved to the mountains, or colonies should be heat resistant by providing antioxidant substances. The current study aimed to determine the effect of heat stress and pollen cake (without and containing zinc nano-zinc oxide) on queen spawning rate, antioxidant status and body weight of new-emerging bees and the expression of vitellogenin and heat shock protein-90 genes.

Materials & methods: Forty native honey bee colonies (*Apis mellifera*) were homogenized and assigned in a 2×2 factorial arrangement with two factors, region (plain with heat stress versus mountains with moderate temperature) and pollen cake (without or containing 10 mg of nano-zinc oxide per kg). The concentration of malondialdehyde and body's antioxidant capacity, the activity of aminotransferase enzymes, the weight and body composition of new-emerged bees (newborn bees) and the relative expression of heat shock protein-90 and vitellogenin genes were determined.

Results: The new-emerged bees in the mountain had a higher body weight than those in the plain. The queens of the colonies located in the mountain that received nano-zinc oxide had the highest spawning rate, and the colonies that received nano-zinc oxide in the cake and were kept in the plain had the lowest spawning rate. The highest concentration of malondialdehyde was found in bees kept in the plain and bees that received cake without nano-zinc oxide ($P<0.001$). The bees of the mountain and receiving the cake containing nano-zinc oxide had the highest and the bees of plain that received the cake without nano-zinc oxide had the lowest alanine aminotransferase enzyme activity ($P<0.04$). The lowest gene expression belonged to the bees of the mountain region that received cake without nano-zinc oxide. The highest expression of vitellogenin gene belonged to bees of the mountain and receiving nano- zinc oxide.

Conclusion: Heat stress had a negative effect on the queen spawning rate and the antioxidant status of bees and the expression of genes, and although the use of nano-oxide zinc can eliminate the negative effects, but it cannot cause better performance of the queen and health of the bees as much as hive transfer to the mountainous area. The effects of nano-zinc oxide in mountain were better than in the plain, and it shows that adding zinc to the cake can help the colony to have better health and performance.

* Corresponding Author's email: aasdghi@gmail.com
Received: 23 September 2022; Reviewed: 24 October 2022; Revised: 22 December 2022; Accepted: 22 January 2023
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.374207.2909

مقاله پژوهشی

اثر تنش گرمایی و نانواکسید روی بر تخم‌گذاری ملکه و بیان ژن‌های موثر بر سیستم ایمنی و مقاومت گرمایی در زنبور عسل

محمدباقر امینی‌اسفیدواجانی[۱]، علی‌اصغر صادقی[۱]، پروین شورنگ[۲]، محمد چمنی[۱]، مهدی امین‌افشار[۱]*

[۱] گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

کلمات کلیدی

تنش گرمایی
نانوکسید روی
تخم گذاری ملکه
مقاومت گرمایی
زنبورعسل

چکیده

مقدمه: در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیری زنبور عسل در معرض تنش گرمایی قرار می‌گیرد و برای به حداقل رساندن اثر تنش‌گرمایی یا باید به کوهستان کوچ داده شوند یا با تأمین مواد آنتی اکسیدانی مشکلات تنش گرمایی را باید به حداقل رساند. هدف از انجام پژوهش کنونی، تعیین اثر تنش گرمایی وکیک‌گرده بدون و حاوی نانواکسید روی بر تخم‌گذاری ملکه، وضعیت آنتی اکسیدانی و وزن بدن زنبورهای تازه متولد شده و بیان ژن‌های ویتلوژنین و پروتئین شوک گرمایی بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ٤۰ کلنی زنبورعسل نژاد بومی (*Mellifera meda*) یکسان‌سازی شده در قالب طرح کاملاً تصادفی و آرایش فاکتوریل ۲×۲ بین دو عامل منطقه (دشت با تنش گرمایی در مقابل کوهستان با دمای معتدل) و کیک‌گرده (فاقد یا حاوی ۱۰ میلی‌گرم نانواکسید روی در کیلوگرم) تقسیم‌بندی شدند. غلظت مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن، فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز، وزن و ترکیبات بدن زنبورهای تازه متولد شده و بیان ژن‌های پروتئین شوک‌گرمایی و ویتلوژنین تعیین شد.

نتایج: زنبورهای تازه متولد شده در منطقه کوهستانی وزن بدن بیش‌تری نسبت به زنبورهای تازه متولدشده دشت داشتند. ملکه‌های کلنی‌های مستقر در کوهستان که نانواکسید روی دریافت کردند بیش‌ترین تخم‌گذاری و کلنی‌هایی که در دشت کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کردند کم‌ترین تخم‌گذاری را داشتند. بیش‌ترین غلظت مالون‌دی‌آلدئید در بدن زنبورهای پرورش داده شده در دشت و بدن زنبورهایی که کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کرده بودند، وجود داشت (P>۰/۰۰۱). زنبورهایی که در کوهستان مستقر بودند و کیک حاوی نانواکسید روی دریافت کردند بیش‌ترین و زنبورهای مستقر در دشت که کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کردند کم‌ترین فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز داشتند (P>۰/۰٤). کم‌ترین بیان ژن به زنبورهای مستقر در منطقه کوهستان که کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کردند، تعلق داشت. بیش‌ترین بیان ژن ویتلوژنین به زنبورهای مستقر در منطقه کوهستان و دریافت‌کننده نانواکسید روی تعلق داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش گرمایی بر تخم‌گذاری ملکه و وضعیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورها و بیان ژن‌ها اثر منفی زیادی دارد و هر چند افزودن نانواکسید روی می‌تواند اثرات منفی را بر طرف کند، ولی نمی‌تواند به اندازه کوچ به مناطق کوهستانی سبب عملکرد بهتر ملکه و سلامتی زنبورها شود. در ضمن اثرات نانواکسید روی در کوهستان بهتر از منطقه دشت در صفات مورد مطالعه نمایان شد و نشان می‌دهد افزودن روی به کیک می‌تواند به عملکرد بهتر کلنی کمک کند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: aasdghi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱ مهر ۱٤۰۱؛ تاریخ داوری: ۲ آبان ۱٤۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۱ دی ۱٤۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۲ بهمن ۱٤۰۱
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.374207.2909

مقدمه

تولیدکنندگان عسل طبیعی پس از افزایش جمعیت زنبورها در جنوب کشور در اواخر اسفندماه و در مناطق دشت در اوایل تیرماه، کلنی‌های خود را به مناطق شمالی یا کوهستانی که دارای آب و هوای معتدل‌تری است کوچ می‌دهند. دلیل این اقدام اثرات منفی گرما بر فعالیت زنبورهای عسل و دستیابی به گل‌های دارای گرده و شهد مناسب‌است (۱). برعکس پرورش‌دهندگان ملکه و تولیدکنندگان ژله رویال‌در تابستان تمایل کم‌تری به کوچ کندوها به مناطق کوهستانی دارند و در مناطق دشت با تغذیه شربت و کیک گرده کلنی‌ها را تغذیه‌می‌کنند و به فعالیت تولیدی می‌پردازند. بسیاری از زنبورداران نیز به‌دلایل‌مختلف ازجمله هزینه‌های حمل‌و نقل و امنیت‌نمی‌توانند کندوها را به مناطق خنک‌تر منتقل کنند (۱، ۲). در این شرایط فعالیت اصلی بیش‌تر زنبورهای کارگر آب‌آوری است و گاهی گرما به قدری‌شدید است‌که آب کافی برای خنک‌کردن‌محیط پرورش نوزادان تامین نمی‌شود (۳، ۴). علاوه بر این لاروها در کلنی‌هایی که نوزادان زیادی دارند، به‌دلیل تامین‌نشدن آب و مواد مغذی مورد نیاز با تنش تغذیه‌ای نیز روبه‌رو می‌شوند (۵، ۶). در این شرایط کلنی‌زنبور عسل با تنش گرمایی رو به‌رو می‌شود (۷، ۸، ۹). در بدن زنبور عسل تحت تنش‌گرمایی، تولید رادیکال‌های آزاد افزایش‌می‌یابدو برای‌جمع‌آوری رادیکال‌های‌آزاد و به‌حداقل‌رساندن اثر تنش‌ها بر بدن‌زنبورو عملکرد کلنی تامین مواد آنتی‌اکسیدانی ضروری است (۴). زنبور عسل با گرده گل تازه که حاوی رنگدانه‌های متعدد است مواد آنتی‌اکسیدانی مورد نیاز را تامین می‌کند. در هوای گرم تابستان مقدار ورودی گرده و ذخیره گرده در قاب‌ها به حداقل می‌رسد و زنبورداران برای تأمین پروتئین و مواد آنتی‌اکسیدانی به کلنی‌های زنبور عسل کیک گرده می‌دهند. گرده تازه در صورت متنوع بودن از نظر رنگ می‌تواند تا حدودی نیازهای کلنی را با تغذیه کیک حاصل از آن برآورده کند، ولی گرده‌ای که برای تولید کیک‌گرده استفاده‌می‌شود عمدتاً از مزارع تک‌گل مانند کلزا گرفته می‌شود و از طرفی چند ماه از جمع‌آوری آن می‌گذرد و به‌طور صحیح خشک و انبارداری نمی‌شود که این موضوع سبب از بین رفتن مواد آنتی‌اکسیدانی گرده می‌شود (۱۰). بنابراین ضرورت‌دارد در این مواقع مواد آنتی‌اکسیدان‌کمکی به کیک گرده افزوده شود (۵). روی‌عنصر کمیابی است که برای حفظ ساختار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ضروری است (۶). به‌دلیل وجود مواد کیلات کننده (Chelating agents) در گرده گل مانند فیتات‌ها جذب روی موجود در گرده گل کم است و امروزه به‌دلیل زیاد بودن دسترسی حیاتی از روی آلی یا نانوروی در تغذیه دام استفاده‌می‌شود.در منابع علمی منتشر شده، اثر تنش گرمایی بر فعالیت تخم‌گذاری ملکه و سایر فراسنجه‌های عملکردی کلنی‌ها مطالعه‌شده است(۷، ۶)، ولیکن اثر تنش گرمایی و تغذیه کیک بدون و حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی به ویژه نانو اکسید روی مطالعه نشده است. در ضمن اثر تنش گرمایی و نانواکسید روی بر بیان‌ژن موثر بر مقاومت گرمایی (پروتئین شوک گرمایی) و ژن موثر بر سیستم ایمنی (ویتلوژنین) مورد مطالعه قرار نگرفته است. پروتئین‌شوک‌گرمایی ۹۰ سبب‌حفظ ساختار سه بعدی پروتئین در سیتوپلاسم سلول‌ها در شرایط تنش گرمایی می‌شود و از این طریق مانع از واسرشتی پروتئین‌ها و مقاومت بدن جانوران می‌شود (۱، ۲). پروتئین شوک‌گرمایی انواع مختلفی دارد و با توجه به اندازه مولکول به نوع ۷۰ و ۹۰ کیلودالتون نام‌گذاری شده‌اند و تفاوتی‌در عمل این‌دو پروتئین‌شوک‌گرمایی‌وجودندارد(۴). ویتلوژنین یک پروتئین حاوی روی است که سبب تقویت سیستم‌ایمنی‌بدن می‌شود. علاوه بر نقش ذخیره پروتئین در بدن زنبور، نقش آنتی‌اکسیدانی در همولنف و سلول‌های بدن زنبور عسل دارد. این پروتئین با عمل آنتی‌اکسیدانی سبب حفظ سلول‌های ایمنی از رادیکال‌های آزاد و افزایش زنده‌مانی زنبورهای‌عسل می‌شود (۳). فرضیه این‌تحقیق این است‌که کلنی‌هایی که در فصل گرما در منطقه‌دشت‌نگه‌داری می‌شوند در‌صورت‌دریافت کیک‌گرده حاوی نانواکسیدروی با کلنی‌های‌مستقر شده‌در منطقه‌کوهستانی‌از نظر وضعیت‌آنتی‌اکسیدانی‌بدن، تخم‌گذاری ملکه و بیان‌ژن‌های‌ویتلوژنین و پروتئین شوک‌گرمایی تفاوتی ندارند. هدف از انجام پژوهش‌کنونی، تعیین‌اثر‌تنش‌گرمایی وکیک‌گرده بدون و حاوی نانواکسید روی بر تخم‌گذاری ملکه، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و وزن بدن زنبورهای تازه متولد شده و بیان ژن‌های ویتلوژنین و پروتئین شوک‌گرمایی بود.

مواد و روش‌ها

تیمارهای‌وطرح‌آزمایشی: این‌تحقیق‌در‌زنبورستان خصوصی در دو مرحله مزرعه‌ای و آزمایشگاهی طی اواخر خرداد و اوایل تیر ماه ۱۴۰۱ در منطقه کیانمهر کرج (استان البرز) با عرض جغرافیایی ۳۵/۸۰۸۲۰۱ و طول جغرافیایی ۵۰/۸۲۴۰۴۷ و ارتفاع ۱۰۷۰ متر و منطقه کوهستانی سنج (ساوجبلاغ، استان البرز) با عرض جغرافیایی ۳۶/۰۲۷۶۵۴ و طول جغرافیایی ۵۰/۵۸۳۳۴۵ و ارتفاع ۲۵۰۰ متر انجام شد. برای ایجاد تنش گرمایی بنابر روش توصیه شده توسط Li و همکاران (۱۱)، آزمایش‌مزرعه‌ای‌در مکانی آفتابگیر با دمای ۲±۳۸ درجه سلسیوس به‌مدت حداقل ۴ ساعت در روز از ساعت ۱۱ تا ۳ عصر ایجاد‌شد. در‌منطقه‌کوهستانی دمای روز ۲±۲۶ درجه سلسیوس بود. تعداد ۴۰ کلنی زنبور عسل نژاد بومی (*Mellifera meda*) انتخاب

و ملکه‌ها از نظر سلامتی و تخم‌گذاری بررسی و جمعیت کلنی‌ها در شروع آزمایش یکسان‌سازی شد. ملکه‌های کلنی‌های مورد استفاده از پایه مادری یکسان بودند (ملکه اصلاح نژاد شده موسسه علوم دامی) و به‌صورت جفت‌گیری طبیعی در بهار سال ۱۴۰۰ بارور شده بودند. برای یکسان‌سازی نوزادان، با حفظ جمعیت زنبورهای موجود در هر کلنی، قاب‌های حاوی تخم روز و لارو و شفیره موجود در کندوها خارج و به‌جای آن قاب تازه بافت یا پوکه سفید قرارداده شد. در ضمن به‌طور مساوی دو قاب عسل و گرده به‌عنوان ذخیره غذایی در کندوها قرار داده شد. با توجه به طرح آزمایشی به‌طور تصادفی ۲۰ کلنی در منطقه کیانمهر باقی ماند و ۲۰ کلنی به منطقه سنج کوچ داده شد. آزمون فاکتوریل ۲×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد و محل استقرار (دشت یا کوهستان) در دو سطح و کیک گرده (فاقد یا حاوی ۱۰ میلی‌گرم نانواکسید روی در کیلوگرم) در دو سطح و در ده تکرار اجرا شد. مدت زمان لازم برای پرورش نوزادان کارگر ۲۱ روز است و هفت روز نیز برای دادن زمان بیش‌تر جهت دقت بیش‌تر آزمایش به طول مدت آزمایش اضافه شد و در مجموع به جز دوره عادت پذیری ۱۰ روزه، طول مدت آزمایش ۲۸ روز بود. در این فاصله زمانی (۲۸ روز) به کلنی‌های هر دو منطقه کیک گرده داده می‌شد. کندوهای مورد استفاده از نوع کف باز و مجهز به گرده‌گیر داخلی بود. درهردو منطقه بانصب‌صفحه گرده‌گیر از ورود گرده به‌داخل کلنی جلوگیری شد. برای اندازه‌گیری وسعت تخم‌گذاری ملکه از قاب مشبک شده دارای مربع‌های استاندارد ۵×۵ سانتی‌متر که کل قسمت‌های یک‌شان را می‌پوشاند استفاده‌شد. تعداد مربع‌های حاوی تخم شمارش‌شده و مساحت مورد نظر نیز محاسبه شد. وزن بدن ۵۰ زنبور تازه متولد شده هر کلنی پس از بی‌هوش کردن با دی اکسیدکربن با ترازوی دقیق (AND Scale GE220, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری‌شد (۱۲) و سپس از همولنف نمونه‌گیری و همولنف در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا آنالیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نگه‌داری شد (۱۳). لاشه زنبورها در ظرف دربسته در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس (۱۴) تا انجام آزمایش‌ها شامل ترکیبات شیمیایی و بیان ژن‌ها نگه‌داری شد.

ترکیبات شیمیایی و سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن: ماده خشک لاشه 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. اندازه‌گیری وزن نمونه‌ها قبل و بعد از خشک شدن با ترازوی دیجیتال (AND Scale GE220, Tokyo, Japan) با دقت ۰/۰۰۱ گرم انجام شد. درصد چربی و پروتئین بدن زنبورهای نمونه‌برداری شده به‌ترتیب با استفاده از روش سوکسله و کلدال تعیین شد (۱۵). سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورها باروش Benzie و Strain انجام شد (۱۶). برای تعیین مقدار مالون دی آلدئید از روش تیوباربیتوریک اسید استفاده شد (۱۷). فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در همولنف با کیت شرکت کورمی (لابلین، لهستان) اندازه‌گیری شد.

آنالیز بیان ژن: لاشه زنبورها پس از بیرون آوردن از فریزر، در مقدار کمی نیتروژن مایع به‌طور کامل منجمد و با استفاده از هاون چینی پودر شد (روش پودر کردن با حداقل خسارت به مواد ژنتیکی و mRNA) و سپس در بافر لیزکننده همگن شد. با استفاده از کیت تجاری (شرکت Bioneer، سئول، کره جنوبی) و RNA کل بنابر دستورالعمل سازنده استخراج شد. برای تعیین فراوانی نسبی mRNA ژن ویتلوژنین (*vg*) و ژن پروتئین شوک‌گرمایی (*hsp90*) با استفاده از real time-qPCR بنابر روش Sahebzadeh و همکاران (۱۸) اقدام شد. براساس این روش، مقدار ۱ میکروگرم از هر نمونه RNA با استفاده از کیت تجاری (شرکت Bioneer، سئول، کره جنوبی) به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل قبل از استفاده در دمای ۲۰-درجه سلسیوس نگه‌داری شد. PCR کمی با یک جفت پرایمر خاص با استفاده از کیت Quanti Fast SYBER Green PCR (شماره کاتالوگ: ۲۰۴۰۵۲، Qiagen، Hilden، آلمان) انجام شد. پرایمرهای *vg*، *hsp90* و β-اکتین (جدول ۱) با استفاده از اطلاعات NCBI و توالی‌های گزارش‌شده قبلی (۱۸، ۱۹) طراحی شدند و برای نرمال سازی، β-اکتین به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده‌شد. نسبت بیان نسبی ژن ویتلوژنین به‌عنوان ژن هدف به ژن β-اکتین براساس روش Livak و Schmittgen (۲۰) نرمال شد.

جدول ۱: پرایمرهای ژن‌های هدف و خانه‌دار

ژن‌های هدف	توالی‌های پرایمرها	اندازه (جفت باز)
Vitellogenin (*vg*)	F-GTTCCGACCGACGACGA R-TCCCTCCCACGGAGTCC	124
Heat Shock protein 90 (*hsp90*)	F-CTTGCCTTACTGAGCGACGA R-TATCCTGAACGTCAGCTCC	133
β-actin	F- TGCCAACACTGTCCTTTCTG R- AGAATTGACCCACCAATCCA	140

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS، در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۲ با دو عامل شامل منطقه (دشت یا کوهستان) و کیک گرده (فاقد یا حاوی نانواکسید روی) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج مربوط به وزن و ترکیب شیمیایی بدن زنبورهای پرستار و سطح تخم‌گذاری ملکه در جدول ۲ گزارش شده است. اثر منطقه نگه‌داری کلنی‌ها بر وزن بدن زنبورهای تازه متولد شده معنی‌دار و افزودن نانواکسید روی به کیک بر این فراسنجه تمایل به معنی‌داری داشت. اثرات متقابل منطقه نگه‌داری و افزودن نانواکسید روی به کیک بر وزن بدن زنبورها معنی‌دار نبود. زنبورهای تازه متولد شده در منطقه کوهستانی وزن بدن بیش‌تری نسبت به زنبورهای تازه متولد شده دشت داشتند. این یافته بیانگر این است که تنش گرمایی سبب کاهش معنی‌دار وزن بدن تازه متولد شده می‌شود (P<۰/۰۰۴). وزن بدن زنبورهای دریافت‌کننده کیک حاوی نانواکسید روی تمایل به افزایش نسبت به وزن بدن زنبورهای دریافت‌کننده کیک فاقد نانواکسید روی داشت (P=۰/۰۶). نگه‌داری کلنی‌ها در دشت یا کوهستان و افزودن نانواکسید روی به کیک گرده اثر معنی‌داری بر درصد چربی و پروتئین بدن زنبورهای تازه متولد شده نداشت (P>۰/۰۵). سطح تخم‌گذاری ملکه در کوهستان بیش‌تر از دشت (P<۰/۰۱) و در کلنی‌های دریافت کننده نانواکسید روی بیش‌تر (P<۰/۰۲) از کلنی‌های دریافت‌کننده کیک فاقد نانواکسید روی بود. اثر متقابل منطقه نگه‌داری و نوع کیک معنی‌دار بود (P<۰/۰۳) و ملکه‌های کلنی‌های مستقر در کوهستان که نانواکسید روی دریافت کردند بیش‌ترین تخم‌گذاری و کلنی‌هایی که در دشت کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کردند کم‌ترین تخم‌گذاری را داشتند.

جدول ۲: اثر منطقه و نانواکسید روی بر وزن و ترکیب شیمیایی بدن زنبورهای تازه متولد شده و سطح تخمگذاری ملکه

فراسنجه‌های مورد بررسی	عوامل تغییر				اشتباه معیار	سطح احتمال معنی‌داری		
	منطقه		کیک					
	دشت (گرم)	کوهستان (خنک)	بدون نانواکسیدروی	حاوی نانواکسیدروی		منطقه	کیک	اثر متقابل
وزن بدن (میلی‌گرم)	۱۱۰[b]	۱۱۷[a]	۱۱۲	۱۱۵	۱/۱۵	۰/۰۰۴	۰/۰۶	۰/۲۳
چربی بدن (درصد)	۷/۸	۷/۶	۷/۶	۷/۸	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۴	۱/۰
پروتئین بدن (درصد)	۴۸/۰	۴۹/۵	۴۹/۰	۴۹/۴	۱/۴۶	۰/۷۴	۰/۷۹	۰/۸۳
کل سطح تخم‌گذاری ملکه (سانتی‌متر مربع)	۵۴۹۹[b]	۵۸۸۱[a]	۵۵۸۰[b]	۵۷۹۹[a]	۷۶/۳	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۳

در هر ردیف برای منطقه یا کیک تفاوت میانگین‌های با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

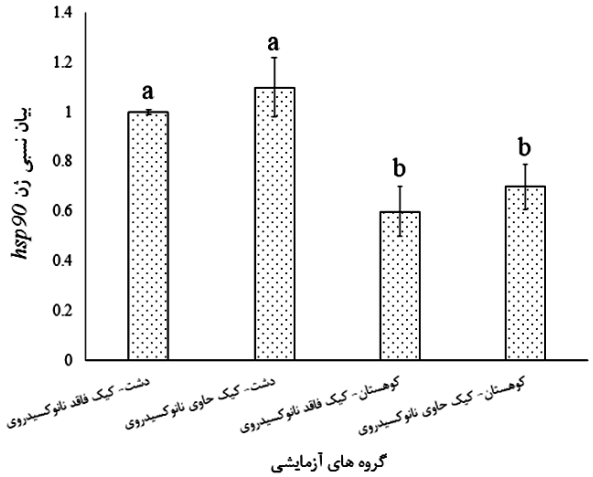
در جدول ۳ وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن و فعالیت آنزیم‌های ترانس آمیناز در همولنف زنبورهای تازه متولد شده گزارش شده است. منطقه نگه‌داری و افزودن نانواکسیدروی به کیک بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورها اثر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱) ولی اثر متقابل بین این دو عامل بر این فراسنجه معنی‌دار نبود. زنبورهای منطقه کوهستان و زنبورهایی که نانواکسید روی دریافت کردند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری از زنبورهای دشت و زنبورهای دریافت‌کننده کیک فاقد نانو اکسید روی داشتند (P<۰/۰۰۱). غلظت مالون‌دی‌آلدئید در بدن زنبورهای نگه‌داری شده در دشت و زنبورهایی که کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کردند بیش‌تر بود (P<۰/۰۰۱). اثر متقابل بین منطقه و نوع کیک برای این فراسنجه مشاهده نشد. منطقه نگه‌داری بر فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در همولنف معنی‌دار بود (P<۰/۰۱) و نوع کیک و اثر متقابل منطقه در کیک بر این فراسنجه اثر معنی‌دار نداشت. اثر منطقه، نوع کیک و اثر متقابل بین این دو عامل بر فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). زنبورهای مستقر در منطقه کوهستان نسبت به زنبورهای مستقر در دشت و زنبورهای دریافت‌کننده نانو روی در کیک نسبت به زنبورهای دریافت‌کننده کیک فاقد نانواکسید روی بیش‌ترین فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز داشتند (P<۰/۰۰۶). زنبورهایی که در کوهستان مستقر بودند و کیک حاوی نانواکسید روی دریافت کردند بیش‌ترین و زنبورهای مستقر در دشت که کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کردند کم‌ترین فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز داشتند (P<۰/۰۴).

جدول ۳: اثر منطقه و افزودن نانواکسید روی به کیک گرده بر وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و فعالیت آنزیم‌های ترانس آمیناز در همولنف زنبورهای تازه متولد شده

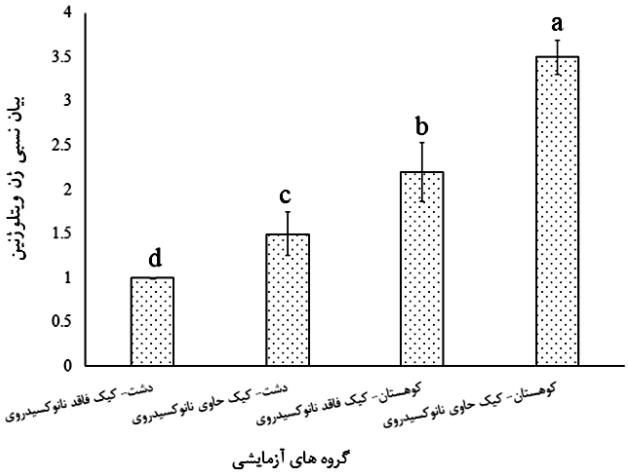
فراسنجه	عوامل تغییر				اشتباه معیار	سطح احتمال معنی‌داری		
	منطقه		کیک					
	دشت (گرم)	کوهستان (خنک)	بدون نانواکسیدروی	حاوی نانواکسیدروی		منطقه	کیک	اثر متقابل
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (میلی‌مول Trolox)[1]	۳/۲۵^{b}	۴/۱۵^{a}	۳/۴۵^{b}	۳/۹۵^{a}	۰/۱۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۱/۰
مالون دی آلدئید (نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)	۲/۵^{a}	۱/۶۵^{b}	۲/۲۵^{a}	۱/۹^{b}	۰/۰۴۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۳۰
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد در لیترهمولنف)[2]	۱۷۰/۱^{b}	۱۸۱/۵^{a}	۱۷۴/۳	۱۷۷/۵	۳/۷۲	۰/۰۱	۰/۵۹	۰/۶۲
آلانین آمینوترانسفراز (واحد در لیتر همولنف)[2]	۶۴/۵^{b}	۸۹/۸^{a}	۷۳/۶^{b}	۷۹/۵^{a}	۱/۶۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۴

در هر ردیف برای منطقه یا کیک تفاوت میانگین‌های با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵). [1] میلی‌مول غلظت ترلکس که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معال یک میلی‌مولار از نمونه مورد بررسی را دارد. [2] واحد بین‌المللی (International Unit) در لیتر همولنف محاسبه شده است و فعالیت آنزیمی است و هر واحد آن معادل یک میکرومول NADH مصرف شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد.

بیان نسبی ژن پروتئین شوک‌گرمایی در شکل ۱ و بیان نسبی ژن ویتلوژنین در شکل ۲ نشان داده شده است. زنبورهای مستقر در دشت که کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کردند به‌عنوان کنترل خارجی در نظر گرفته شدند و مقایسه بقیه تیمارها با آن انجام شد. تفاوت‌معنی‌داری بین‌بیان‌ژن‌پروتئین شوک‌گرمایی زنبورهای مستقر در دشت‌که‌کیک‌فاقد یا حاوی نانواکسیدروی دریافت‌کردند مشاهده نشد، هر چند نانواکسید روی سبب افزایش غیرمعنی‌دار (P>۰/۰۵) بیان ژن پروتئین شوک گرمایی شد. بیان نسبی ژن پروتئین شوک گرمایی زنبورهای مستقر در منطقه کوهستانی کاهش معنی داری داشت (P<۰/۰۵). کم‌ترین بیان ژن به زنبورهای مستقر در منطقه کوهستان که کیک فاقد نانواکسید روی دریافت کردند، تعلق داشت. بیان نسبی‌ژن‌ویتلوژنین برخلاف بیان ژن‌پروتئین شوک‌گرمایی روند افزایشی نسبت به کنترل داخلی نشان داد. بیان ژن ویتلوژنین در زنبورهای مستقر در کوهستان افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) نسبت به زنبورهای‌مستقر در‌دشت‌داشت. بیش‌ترین بیان نسبی ژن ویتلوژنین به زنبورهای مستقر در منطقه کوهستان و دریافت‌کننده نانواکسید روی تعلق داشت.



شکل ۱: بیان نسبی ژن پروتئین شوک گرمای در بدن زنبورهای مستقر در دشت یا کوهستان و دریافت‌کننده کیک فاقد یا حاوی نانواکسید روی



شکل ۲: بیان نسبی ژن ویتلوژنین در بدن زنبورهای مستقر در دشت یا کوهستان و دریافت‌کننده کیک فاقد یا حاوی نانواکسید روی

بحث

یکی از شاخص‌های‌مهم‌وضعیت متابولیکی و فیزیولوژیکی بدن زنبور عسل طی فرآیند رشد و نمو درون حجره؛ وزن بدن زنبور در زمان خروج از شفیره است (۲۱). وزن بدن زنبور تازه متولد شده به عوامل مختلفی بویژه نژاد و تغذیه در دوران لاروی بستگی دارد (۴). Winston گزارش کرد که وزن بدن زنبور در زمان خروج از شفیره بین ۸۱ تا ۱۵۱ میلی‌گرم متغیر است (۲۲). در مطالعه حاضر میانگین

وزن زنبورها در زمان خروج از شفیره بین ۱۰۸ تا ۱۲۳ میلی‌گرم بود که در دامنه گزارش Winston (۲۲) قرار دارد. وزن زنبورهای تازه متولدشده در کلنی‌های مستقر در کوهستان به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از وزن زنبورهای تازه متولد شده کلنی‌های مستقر در دشت بود که دلیل این تفاوت به تنش گرمایی مربوط می‌باشد. کلنی‌های مستقر در دشت با تنش گرمایی رو به رو بودند و در ساعت ۱۴ گرمای کندوها در حدی زیاد بود که بیش‌تر جمعیت زنبورها از روی قاب‌ها به کف کندو و دیواره‌ها و زیر در کندو رفته بودند. دلیل این رفتار کم کردن گرمای ساطع شده از بدن آن‌ها بر روی قاب‌های حاوی نوزادان و ایجاد عایق برای جلوگیری از ورود گرما به درون کندو می‌باشد (۴). از طرفی جمعیت زیادی از زنبورهای کارگر مشغول آوردن آب از محل آبگیر بودند. دما محیطی تا ۳۲ درجه سلسیوس مشکلی برای زنبور در پرورش نوزادان ایجاد نمی‌کند و با آوردن آب و تبخیر و حرکات بال شرایط دمایی مناسب را ایجاد می‌کند (۴، ۱۱). در شرایط تنش گرمایی که در زنبور در دمای محیطی بالاتر از ۳۴ درجه سلسیوس شروع می‌شود آب‌آوری و حرکات بال نمی‌تواند سبب خنک کردن منطقه پرورش نوزادان شود به همین دلیل زنبورها به کف کندو و دیواره‌ها می‌روند تا دمای بدن آن‌ها سبب افزایش دمای منطقه پرورش نوزادان نشود و گروه کم‌تری در ان منطقه فعالیت تغذیه لاروها و عملیات خنک‌کردن محل پرورش را انجام می‌دهند (۱، ۳). 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 قارچ ها می‌کند یا این‌که سبب تاخیر در رشد و کسب مواد مغذی لازم برای رشد بعد از پوشاندن دهانه حجره با موم می‌شود (۶). این وقایع سبب کاهش وزن زنبورهای تازه متولد شده می‌شود. با توجه به داده‌های وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورها که در جدول ۳ گزارش شده است کم‌تر بودن وزن بدن زنبورهای تازه متولد شده در دشت را می‌توان به این عامل مربوط دانست. در بدن زنبورهای تازه متولد شده دشت غلظت مالون‌دی‌آلدئید بیش‌تر از زنبورهای کوهستان بود که بیانگر اثر تنش گرمایی بر تولید رادیکال‌های آزاد است که سبب افزایش رویگرد پروتئین و چربی و افزایش انرژی نگه‌داری بدن زنبورها می‌شود. در چنین شرایطی تغذیه لاروها به خوبی انجام نمی‌شود و همان مقدار تغذیه نیز با بازدهی کم‌تری مورد استفاده قرار می‌گیرد که نتیجه آن کاهش رشد و وزن بدن زنبور تازه متولدشده می‌شود. وزن بدن زنبورهای دریافت‌کننده نانواکسید روی تمایل به افزایش داشت. نانواکسید روی با اثرات آنتی‌اکسیدانی که دارد می‌تواند تا حدودی از تنش اکسیداتیو و تولید مالون‌دی‌آلدئید ممانعت کند (۱۱). در این شرایط انرژی موجود در مواد مغذی دریافت شده توسط لارو صرف رشد و نمو می‌شود و شرایط فیزیولوژیکی و متابولیکی برای رشد لارو مهیا و در نهایت زنبور در زمان تولد وزن مناسبی پیدا کند (۴، ۵). سطح تخم‌گذاری ملکه‌ها تحت تاثیر منطقه و نوع کیک و اثر متقابل بین این دو عامل قرار گرفت. سطح تخم‌گذاری ملکه زنبور عسل تحت تاثیر تغذیه، شرایط محیطی و وسعت لاروها قرار دارد. در کلنی‌های مستقر در کوهستان به‌دلیل مناسب بودن دمای محیطی زنبورهای کارگر و پرستار لاروها و ملکه را بهتر تغذیه کردند و با این فعالیت سبب افزایش توانایی ملکه در تخم‌گذاری شده و هم‌چنین سبب افزایش فرومون لاروها در کندو شده که خود عاملی برای افزایش تخم‌گذاری ملکه است. در کلنی زنبور عسل، ملکه توسط زنبورهای ملازم با ژله رویال تغذیه می‌شود و زنبورهای ملازم با تولید ژله رویال و خوراندن آن به ملکه شرایط تخم‌گذاری بیش‌تر را فراهم می‌کنند (۱). با وارد شدن منابع آنتی‌اکسیدانی به شربت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن این زنبورها افزایش یافته و توانسته‌اند در تعداد کافی با توان بیش‌تر به تغذیه ملکه پرداخته و سطح تخم‌گذاری را افزایش دهند. از طرفی زنبورهای پرستار با تولید ژله رویال و تغذیه شهد و گرده به لاروها، شرایط تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی (فرومون لاروها) را برای فعالیت ملکه و تخم‌گذاری بیش‌تر فراهم می‌کنند (۶). وجود فرومون لاروها ملکه را به تخم‌گذاری بیش‌تر ترغیب می‌کند و هرچه لاروها بهتر تغذیه شوند فرومون بیش‌تری تولید می‌کنند و ملکه به تخم‌گذاری بیش‌تر ترغیب می‌شود. چنین شرایطی در فصل بهار که ورودی گرده و شهد به کلنی زیاد می‌شود بیش‌تر دیده می‌شود (۱، ۵). از طرفی وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن و بیان ژن ویتلوژنین که عوامل موثر بر فعالیت ملازمین ملکه، زنبورهای پرستار و ملکه زنبور عسل است، در زنبورهای کوهستان شرایط بهتری نسبت به زنبورهای دشت داشت. این عوامل در کل سبب فعالیت بهتر زنبورهای کوهستان و تغذیه مناسب‌تر لاروها و ملکه و در نهایت سبب افزایش سطح تخم‌گذاری شده است. عنصر روی برای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز به‌عنوان کوفاکتور لازم است (۲۳). با فعالیت این آنزیم‌ها قدرت آنتی‌اکسیدانی بدن افزایش و غلظت مالون‌دی‌آلدئید کاهش می‌یابد. در گرده گل مقداری روی وجود دارد ولی وجود عوامل کیلات‌کننده مانع جذب آن می‌شود از طرفی طول دستگاه گوارش زنبور کوتاه و توانایی جذب آن کم است (۲۴). در بدن زنبور نیز ذخیره روی کم می‌باشد. به همین دلیل باید روزانه مقدار کافی روی برای بدن تامین شود. با افزودن نانواکسید روی به کیک، بخش عمده روی جذب بدن می‌شود و مورد استفاده بافت‌ها قرار می‌گیرد. غدد آسینی که ژله رویال تولید می‌کنند نیاز زیادی به روی دارند و تامین روی سبب حفظ اندازه این غدد و فعالیت حداکثری آن می‌شود و از این طریق تغذیه لاروها و ملکه زنبور عسل به‌خوبی انجام می‌شود که در نهایت سبب افزایش تخم‌گذاری ملکه و بهتر تغذیه شدن لاروها سبب بهبود وزن بدن زنبور تازه متولد شده می‌شود (۴). عنصر روی برای تولید ویتلوژنین استفاده می‌شود که در زنبور عسل این پروتئین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند. علت افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورهای مستقر در کوهستان یا تغذیه شده با کیک حاوی نانواکسید روی به افزایش ساخت ویتلوژنین مربوط می‌شود. همان‌طورکه در شکل ۲ نشان داده شده

است بیان ژن ویتلوژنین در زنبورهای کوهستان و تغذیه شده با نانو اکسیدروی بیش تر از زنبورهای دشت و تغذیه شده با کیک فاقد نانواکسید روی است. ویتلوژنین یک فسفولیپو پروتئین است که در تخم و بدن زنبورعسل نقش‌های متعددی دارد. ویتلوژنین پروتئین اختصاصی زرده 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 موثر است (۲۵). مطالعات مختلفی درباره اثر عوامل تغذیه‌ای بر بیان ژن‌ها در بدن زنبور عسل انجام شده است (۲۵، ۲۶)، ولی مطالعه درباره اثر عوامل تغذیه‌ای بر بیان ژن ویتلوژنین در زنبورعسل محدود است (۲۷). فعالیت آنزیم‌های ترانسفراز در بدن زنبورهای کوهستان بیش‌تر از دشت و فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در بدن زنبورهای تغذیه شده با کیک حاوی نانواکسید روی بیش تر از زنبورهای تغذیه شده با کیک فاقد نانواکسید روی بود. در شرایط تنش، فعالیت‌های آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز بسیار مهم هستند زیرا برخلاف پستانداران فعالیت این آنزیم‌ها بر سلامتی و عمر زنبورعسل موثرند. در پستانداران، افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های مذکور نشان‌دهنده بیماری مزمن، تغییرات پاتولوژیک و مسمومیت کبدی است. برعکس، کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در زنبورهای عسل با بیماری و شرایط پاتولوژیک مرتبط است (۲۹، ۲۸) حشرات کبد ندارند و فقط یک معادل کبد دارند که نام آن بافت چربی است(۳۰). در شایط تنش و مسمومیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز از بافت چربی وارد همولنف حشرات می‌شود و در سم‌زدایی نقش دارند (۳۱). کم شدن فعالیت این آنزیم‌ها در زنبورها سبب اختلال در چرخه کربس، سنتز ATP، فسفوریلاسیون اکسیداتیو، بتااکسیداسیون و سایر چرخه های متابولیک می‌شود (۳۲). با ورود مواد آنتی‌اکسیدانی و ویتامینی به بدن زنبورها، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها- که نشانگرهای زیستی می‌باشند- در بدن زنبورها مشاهده می‌شود (۳۳). فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز از طریق انتقال بخش آمین اسیدهای آمینه گلوکوژنیک، به مسیر گلوکونئوژنز کمک می‌کند تا نیاز انرژی در لاروها و زنبورهای تازه متولد شده برآورده شود (۳۲). ویتلوژنین یک پروتئین متصل‌شونده به‌روی است و به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند و بر حفظ ساختار و فعالیت سلول‌های ایمنی و طول عمر زنبورهای کارگر تأثیر می‌گذارد (۳۴). اخیراً نشان داده شده است که ویتلوژنین حامل اصلی عنصر روی در همولنف زنبورهای عسل است و فقدان آن ساختار و فعالیت سیستم ایمنی بدن را مختل می‌کند و خطر مرگ و میر زنبورها را افزایش می‌دهد (۳۵). مطالعات نشان داد که افزایش بیان ژن ویتلوژنین می‌تواند مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و طول عمر را افزایش دهد (۳۴). در منابع علمی منتشر شده، مطالعه‌ای در مورد تأثیر روی بر بیان ژن ویتلوژنین در حشرات یافت نشد. در آبزیان، تأثیر روی بر بیان ژن ویتلوژنین مورد مطالعه قرار گرفته است. محققان گزارش دادند که دوزهای مناسب روی می‌تواند بیان ژن ویتلوژنین را در ماهی ماده افزایش دهد. بیان ژن ویتلوژنین در زنبورهای مستقر در کوهستان بیشتر از زنبورهای مستقر در دشت بود (۳۵). ویتلوژنین فسفوگلیکوپروتئین ذخیره‌ای در بافت چربی (Fat bodies) زیر کوتیکول زنبورعسل می‌باشد و دلیل افزایش وزن زنبورهای مستقر در کوهستان نسبت به دشت می‌تواند به افزایش بیان ژن ویتلوژنین و تولید آن مربوط باشد. هر چند ویتلوژنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد ولی وظیفه اصلی آن در بدن زنبورها تازه متولد شده و پرستار تامین انرژی و آمینواسیدهای مورد نیاز بدن می‌باشد (۳). زنبورهای مستقر در دشت به‌دلیل تنش گرمایی، انرژی زیادی صرف دفع گرما از بدن و از کندو کردند، به همین دلیل نسبت به زنبورهای کوهستان با کاهش وزن مواجه شدند و در بدن این زنبورها شرایط لازم برای بیان ژن ویتلوژنین مهیا نبوده است. در بدن زنبورهای مستقر در دشت به‌دلیل نیاز زیاد به انرژی برای مقابله با گرما، شرایط در جهت تجزیه ویتلوزنین فراهم بوده (۴) و سبب کاهش وزن بدن زنبورها شده است. زنبورهای کوهستان به‌دلیل بهتر بودن شرایط دمایی انرژی و آمینواسیدها را برای تولید ژله رویال و تغذیه بیش‌تر لاروها صرف کردند به همین دلیل شرایط لازم برای بیان بیش‌تر ژن ویتلوژنین که پروتئین ذخیره‌ای است در بدن زنبورها طی تکامل مهیا شده است. برای بهتر روشن شدن مکانیسم اثر دما و تنش گرمایی بر بیان ژن ویتلوژنین پژوهش‌های بیش‌تری نیاز است. در پژوهش کنونی زنبورهای تحت تنش گرمایی بیان ژن *hsp90* بیش تری نسبت به زنبورهای کوهستان داشتند. افزودن نانو اکسیدروی در زنبورهای تازه متولد شده دشت سبب افزایش غیرمعنی‌دار بیان ژن *hsp90* و در زنبورهای کوهستان نیز تغذیه کیک حاوی نانو اکسیدروی سبب افزایش غیرمعنی‌دار بیان این ژن نسبت به زنبورهای کوهستان دریافت‌کننده کیک فاقد نانواکسیدروی شد. این یافته موافق با گزارش Amini و همکاران است که گزارش کردند نانواکسید روی سبب افزایش بیان ژن *hsp70* در زنبورهای پرستار تحت استرس گرمایی می‌شود(۳۶). بیان بیش‌تر ژن *hsp90* مقاومت گرمایی زنبورهای پرستار را افزایش می‌دهد و در نتیجه بازدیدهای مکرر زنبورهای پرستار برای تغذیه لاروها را افزایش می‌دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش گرمایی بر تخم‌گذاری ملکه و وضعیت آنتی‌کسیدانی بدن زنبورها و بیان ژن‌ها اثر منفی زیادی دارد و هر چند افزودن نانواکسید روی می‌تواند اثرات منفی را بر طرف کند، ولی نمی‌تواند به اندازه کوچ به مناطق کوهستانی سبب عملکرد بهتر ملکه و سلامتی زنبورها شود. در ضمن اثرات نانواکسید روی در کوهستان بهتر از منطقه دشت در صفات مورد مطالعه نمایان شد و نشان می‌دهد افزودن روی به کیک می‌تواند به عملکرد بهتر کلنی کمک کند.

منابع

1. **Morammazi, S. and Mirhosseini, M.A., 2021.** Expression of hSP90 gene and its relationship with ambient temperature and foraging rate in *apis mellifera*

meda. Agricultural Biotechnology Journal. 12(4): 181-204. doi: 10.22103/jab.2020.15283.1199.

2. **Alqarnia, A.S., Aliab, H., Iqbala, J., Owayssa, A.A. and Smith, B.H., 2019.** Expression of heat shock proteins in adult honey bee (Apis mellifera L.) workers under hot-arid subtropical ecosystems. Saudi Journal of Biological Sciences. 26(7): 1372-1376. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.08.017.
3. **Lipiński, Z., 2019.** Honey Bee Nutrition and Feeding. Northern publication. London, UK.
4. **Zhao, H., Guilin, L., Dezheng, G., Han, L. and Qingxin L., 2021.** Response mechanisms to heat stress in bees. Apidologie. 52(2): 388-399. doi: 10.1007/s13592-020-00830-w.
5. **Kühnholz, S. and Seeley, T.D., 1997.** The control of water collection in honey bee colonies. Behavioral Ecology and Sociobiology. 41(1): 407-422. doi: 10.1007/s002650050402.
6. **Farjan, M., Dmitryjuk, M.G., Lipinski, Z., Biernat Lopienska, E. and Zóltowska, K., 2012.** Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of Apis *mellifera carnica* brood at different stages. Journal of Apicultural Research. 51(3): 263-270. doi: 10.3896/IBRA.1.51.3.07
7. **Kikusato, M. and Toyomizu, M., 2013.** Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. PloS one. 8: e64412.
8. **Haq, I.U., Imran, M., Nadeem, M., Tufail, T., Gondal, T.A. and Mubarak, M.S., 2021.** Piperine: A review of its biological effects. Phytotherapy Research. 35(2): 680-700.
9. **Bryś, M.S., Skowronek, P. and Strachecka, A., 2021.** Pollen Diet-Properties and Impact on a Bee Colony. Insects. 12(9): 798-805. doi: 10.3390/insects12090798.
10. **Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G. and Haroutounian, S.A., 2014.** Essential oils of Satureja, Origanum, and Thymus species: chemical composition and antibacterial activities against food borne pathogens. Journal of Agricultural Food Chemistry. 52(1): 8261-8267. doi: 10.1021/jf049113i.
11. **Li, X., Ma, W., Shen, J., Long, D., Feng, Y. and Su, W., 2019.** Tolerance and response of two honeybee species *Apis cerana* and *Apis mellifera* to high temperature and relative humidity. PLoS ONE. 14(6): e0217921. doi: 10.1371/journal.pone.0217921
12. **Hendriksma, H.P., Pachow, C.D. and Nieh, J.C., 2019.** Effects of essential amino acid supplementation to promote honey bee gland and muscle development in cages and colonies. Journal of insect physiology. 117: 103906.
13. **Řeřicha, M., Dobeš, P. and Knapp, M., 2021.**Changes in haemolymph parameters and insect ability to respond to immune challenge during overwintering. Ecology and Evolution. 11(9): 4267-4275.
14. **Di Fiore, C., Nuzzo, A., Torino, V., De Cristofaro, A., Notardonato, I., Passarella, S., Di Giorgi, S. and Avino, P., 2022.** Honeybees as Bioindicators of Heavy Metal Pollution in Urban and Rural Areas in the South of Italy. Atmosphere. 13(4): 624-630.
15. **AOAC. 2005.** Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. USA.
16. **Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay Analytical Biochemistry. 239(1): 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
17. **Draper, H.H. and Hadley, M., 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymology. 186(1): 421-431. doi: 10.1016/0076-6879(90)86135-I.
18. **Sahebzadeh, N. and Lau, W.H., 2017.** Expression of heat-shock protein genes in *Apis mellifera meda* (Hymenoptera: Apidae) after exposure to monoterpenoids and infestation by *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). European Journal of Entomology. 114: 195-201.
19. **Amini-Esfidvajani, M.B., Sadeghi, A.A., Shawrang, P., Chamani, M. and Aminafshar, M., 2022.** Effect of nano particles of zinc oxide and selenium on antioxidant status, aminotransferase enzymes activities and genes expression of sod-1 and vg in honey bee during the hot season, Journal of Trace Elements and Minerals. 2: 100034. doi: 10.1016/j.jtemin.2022.100034.
20. **Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods. 25(4): 402-408.
21. **McAfee, A., Metz, B.N., Milone, J.P., Foster, L.J. and Tarpy, D.R., 2022.** Drone honey bees are disproportionately sensitive to abiotic stressors despite expressing high levels of stress response proteins. Communication Biology. 5(1): 141-149. doi: 10.1038/s42003-022-03092-7.
22. **Winston, M.L., 1991.** The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, USA. 294 p.
23. **Lee, S.R., 2018.** Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. Oxid. Med. Cell Longev. 9156285. doi:10.1155/2018/9156285.
24. **Lazarte, C.E., Vargas, M. and Granfeldt, Y., 2015.** Zinc bioavailability in rats fed a plant-based diet: a study of fermentation and zinc supplementation. Food & Nutrition Research. 59(1): 27796.
25. **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(1): 1-9.
26. **Zou, Z., Lopez, D.L., Kanost, M.R., Evans, J.D. and Jiang, H., 2006.** Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. Insect molecular biology. 15(5): 603-614.
27. **Harwood, G. and Amdam, G., 2021.** Vitellogenin in the honey bee midgut. Apidologie. 52(4): 837-847.
28. **Bajda, M., Łoś, A. and Merska, M., 2021.** Effect of amphotericin B on the biochemical markers in the haemolymph of honey bees. Medycyna Weterynaryjna. 70(12): 766-769.
29. **Murawska, A., Migdał, P. and Roman, A., 2021.** Effects of plant protection products on biochemical markers in honey bees. Agriculture. 11: 648.
30. **Arrese, E.L. and Soulages, J.L., 2010.** Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. Annual Review of Entomology 55: 207-225.
31. **Wan, P.J., Fu, K.Y., Lü, F.G., Guo, W.C. and Li, G.Q., 2015.** Knockdown of a putative alanine aminotransferase gene affects amino acid content and flight capacity in the Colorado potato beetle Leptinotarsa decemlineata. Amino Acids. 47: 1445-1454. doi: 10.1007/s00726-015-1978-1.
32. **Sokół, R., 1996.** Selected hemolymphatic biochemical indices in the course of *Varroa jacobsoni* invasion in bees Aspartic and alanine transaminase activity in the hemolymph of the brood, workers and drones). Acta Technologica Agriculturae. 24: 113-125.
33. **Nation, J., 2008.** Insect Physiology and Biochemistry. CRC Press; London, UK.
34. **Amdam, G.V., Simões, Z.L., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K. and Mikkelsen, Ø., 2004.** Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. Experimental Gerontology. 39: 767-773.
35. **Gupta, G., Srivastava, P.P., Gangwar, M., Varghese, T., Chanu, T.I., Gupta, S., Ande, M.P., Krishna, G. and Jana, P., 2022.** Extra-fortification of zinc upsets vitellogenin gene expression and antioxidant status in Female of Clarias magur brooders. Biologival Trace Element Research. 200: 1861-871. doi: 10.1007/s12011-021-02793-0.
36. **Amini, M.B., Sadeghi, A.A., Shawrang, P., Chamani, M. and Aminafshar, M., 2022.** Nano-selenium and nano-zinc oxide supplementation in syrup on laying area, population size and *hsp* gene expression of honey bees in hot climate. Acta Sci. Anim. Sci. 43: e48574. doi: 10.4025/actascianimsci.v43i1. 48574