

## مقاله کوتاه علمی

## تأثیر جیره‌های مختلف غذایی روی رشد غدد شیری زنبورهای عسل پرستار

وحید قاسمی\*

بخش زنبورعسل، گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: vghasemi@ut.ac.ir

**Effect of different nutritional diets on hypopharyngeal glands growth in nurse honey bees**

Vahid Ghasemi\*

Division of Honey Bee, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

\* Corresponding author, E-mail: vghasemi@ut.ac.ir

**Abstract**

Hypopharyngeal glands (HGs) are one of the most important body organs of nurse honey bees which produce the major protein fraction of royal jelly that is fed to larvae and queen. The HGs mass and acini size can be considered as robust indicator that is used to determine the quality of the diets fed to nurse bees. In the present study, we focused on the effect of different nutritional diets on HGs growth and acini size in nurse honey bee workers. Results of ANOVA indicated that the test diets have a significant effect on HGs mass and their acini size.

**Key words:** nurse bee, nutritional diet, hypopharyngeal glands mass, acini size.

Received: 11 November 2021, Accepted: 07 December 2021

تقسیم و تنظیم وظایف در کلنی زنبورعسل عموماً بر اساس سن زنبورها و نیاز کلنی صورت می‌گیرد، به نحوی که افراد جوان، فعالیت‌های داخل کندو از قبیل نظافت حجره‌ها، مراقبت از نوزادان و تغذیه آن‌ها، تولید موم برای شان‌سازی و تغلیظ و عمل‌آوری شهد و تبدیل آن به عسل را انجام می‌دهند و زنبورهای مسن، فعالیت‌های چراگری برای یافتن و جمع‌آوری شهد، گرده، برهموم و آب را بر عهده دارند (Michener, 1974). غدد شیری اندام ترش‌چی مزدوج به شکل خوشه انگور هستند که از واحدهای لوب‌مانند شفاف بنام آسینی تشکیل شده‌اند و در قسمت جلویی فضای داخلی کپسول سر بین چشم‌های مرکب و مغز زنبورهای کارگر قرار دارند (Snodgrass, 1984). این غدد با تولید و ترشح ژل رویال نقش مهمی در تغذیه ملکه و لاروها بر عهده دارند (Michener, 1974). اندازه و میزان فعالیت این غدد با توجه به سن زنبورهای کارگر تغییر می‌کند، به طوری که در زنبورهای جوان این غده‌ها حجیم بوده و فعالیت ترش‌چی بالا دارند، اما با افزایش سن زنبورها و شروع فعالیت چراگری اندازه آن‌ها کاهش یافته و ترکیبات پروتئینی دیگری را تولید می‌کنند (Deseyn & Billen, 2005). بر اساس پژوهش‌های صورت‌گرفته، بیشترین میزان رشد و فعالیت غدد شیری در هفته دوم پس از ظهور (تقریباً سن ۷ تا ۱۴ روزگی) اتفاق می‌افتد (Rahman et al., 2014).

کمیت و کیفیت منابع پروتئینی (گرده گل و جانشین‌های گرده)، تأثیر بسزایی در رشد غدد شیری زنبورهای پرستار دارد. اندازه غدد شیری شاخص بسیار مهمی برای تعیین وضعیت تغذیه‌ای زنبورهای عسل است (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010). این غدد در زنبورهایی که جیره غذایی کامل و منابع پروتئینی کافی در اختیار دارند، از رشد مناسبی برخوردار هستند (Corby-Harris & Snyder, 2018). توسعه سیستم‌های تک‌کشتی و خشکسالی در دهه‌های اخیر منجر به کاهش تنوع گیاهی و عدم دسترسی کافی کلنی‌های زنبورعسل به منابع غذایی شده است که این امر اثرات سوئی بر سلامت زنبورعسل و بقای کلنی به همراه دارد (Decourtye *et al.*, 2015; Vaudo *et al.*, 2015). در پژوهش حاضر، ضمن بیان کامل نحوه تشریح، توزین و رنگ‌آمیزی غدد شیری و اندازه‌گیری طول و عرض آسینی‌ها، به بررسی اثر جیره‌های مختلف غذایی روی رشد این غدد پرداخته شد. برای تهیه زنبورعسل یک‌روزه (زنبورهای با عمر کمتر از ۲۴ ساعت)، چند قاب شفیرگی از کلنی‌های مختلف زنبورعسل واقع در زنبورستان آموزشی و پژوهشی بخش زنبورعسل گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انتخاب و در یک قفس چوبی با جداره توری (طول: ۵۲، عرض: ۱۸ و ارتفاع: ۲۴ سانتی‌متر) در دمای  $32 \pm 2$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $65 \pm 5$  درصد و تاریکی نگه‌داری شد. پس از ۲۴ ساعت، زنبورهای تازه متولدشده به طور تصادفی در گروه‌های ۵۰ تایی به قفس‌های چوبی (طول ۱۰، عرض ۸ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر) منتقل شدند. برای ایجاد آرامش در زنبورها، یک تکه شان قهوه‌ای در داخل هر قفس قرار داده شد. در قسمت بالایی قفس‌ها دو حفره به قطر ۲ سانتی‌متر برای قرارگیری ظرف حاوی جیره غذایی و ظرف حاوی شربت شکر در نظر گرفته شد. زنبورها روزانه با یک گرم از هر یک از جیره‌های زیر تغذیه شدند:

تیمار A (TA): ۳۰٪ گرده گل + ۲۰٪ عسل + ۵۰٪ پودر شکر؛

تیمار B (TB): ۲۰٪ گرده گل + ۲۰٪ عسل + ۶۰٪ پودر شکر؛

تیمار C (TC): ۱۰٪ گرده گل + ۲۰٪ عسل + ۷۰٪ پودر شکر؛

و تیمار شاهد (Control): ۲۰٪ عسل + ۸۰٪ پودر شکر.

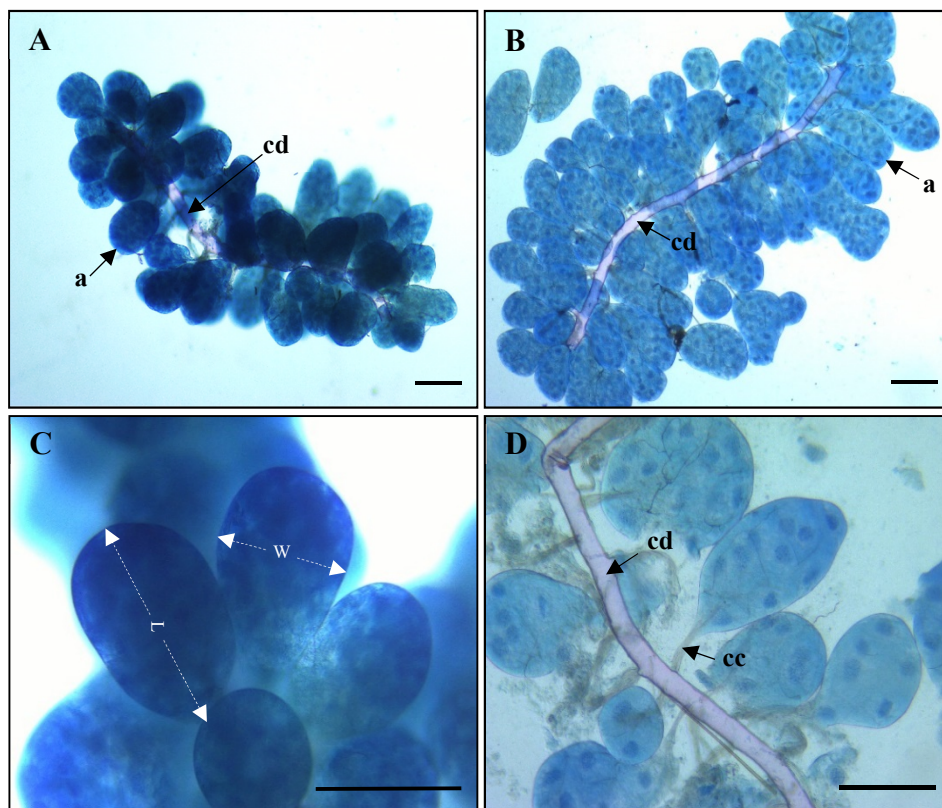
علاوه بر این، تمام زنبورها روزانه با ۵ سی‌سی شربت شکر ۱:۱ (وزنی/وزنی) تغذیه شدند. این آزمایش در ۳ تکرار به ازای هر تیمار انجام شد و به مدت ۸ روز به طول انجامید. طی این مدت، زنبورها در دمای  $32 \pm 2$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $65 \pm 5$  درصد و تاریکی نگه‌داری شدند. پس از گذشت ۸ روز از شروع آزمایش، ۵ زنبور پرستار نیز از هر یک از قفس‌های چوبی به طور تصادفی انتخاب شد و در لوله‌های فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری قرار گرفتند. زنبورها به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داشته شدند تا کاملاً بی‌حرکت شوند. به منظور ایجاد بستری برای تشریح، مقداری پارافین جامد ذوب‌شده در یک ظرف پتری شیشه‌ای بزرگ (قطر دهانه ۱۰۰ میلی‌متر و ارتفاع ۱۵ میلی‌متر) ریخته شد. ظرف پتری در محیط آزمایشگاه قرار داده شد تا پارافین کاملاً به حالت جامد درآید. برای تشریح غدد شیری از روش Suenami *et al.* (2018) با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین منظور، با کمک استریومیکروسکوپ Olympus مدل SZX9 و با استفاده از یک قیچی نوک تیز سر زنبور از بدن جدا شد و روی بستر تشریح طوری قرار گرفت، به نحوی که قسمت جلویی آن (صورت زنبور) رو به بالا قرار گیرد. با فرو بردن یک سوزن نازک به هر یک از چشم‌های مرکب و یک سوزن به داخل حفره دهانی، سر روی بستر پارافینی تثبیت شد (شکل ۱- A). شاخک‌ها با یک قیچی نوک تیز از قاعده قطع شدند و جلد سر با استفاده از یک تیغ نوک تیز و با ایجاد دو برش طولی در امتداد لبه داخلی چشم‌های مرکب، یک برش عرضی در قسمت بالای قطعات دهانی و یک برش عرضی دیگر در قسمت فرق سر شکافته شد (شکل ۱- B و C).



شکل ۱- تشریح غدد شیری زنبور عسل پرستار. تثبیت سر روی بستر پارفینی تشریح (A)، محل برش جلد کپسول سر (B)، برش کپسول سر (C)، موقعیت غدد شیری در طرفین سر (پیکان‌ها آسینی‌ها را نشان می‌دهند) (D)

**Fig. 1.** Dissecting hypopharyngeal glands of nurse honey bee. Fixation of the head on paraffin dissection plate (A), incision line of the head capsule (B), incision of the head capsule (C), location of hypopharyngeal glands on either side of the head (arrows indicate acini) (D)

سپس، ۳۰ میکرولیتر بافر فسفات (کلرید سدیم ۱۳۷ میلی‌مولار؛ کلرید پتاسیم ۲/۷ میلی‌مولار؛ دی‌سدیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار؛ مونو پتاسیم فسفات ۱/۸ میلی‌مولار) روی قسمت شکافته‌شده سر ریخته شد تا غدد شیری به صورت شناور درآیند (شکل ۱- D). این غدد با استفاده از یک پنس نوک تیز به آرامی برداشته شدند و پس از توزین، مطابق روش Corby-Harris & Snyder (2018) با اعمال تغییرات جزئی رنگ‌آمیزی شدند. بدین منظور، ابتدا محلول رنگی گیمسا (۰/۶ گرم پودر گیمسا؛ ۵۰ میلی‌لیتر متانول؛ ۵۰ میلی‌لیتر گلیسرول) تهیه شد (Yeager, 1945). این محلول با نسبت ۱۰:۱ با بافر فسفات (یک قسمت محلول رنگی گیمسا به ۹ قسمت بافر فسفات) رقیق شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگی رقیق‌شده روی یک قسمت از لام ریخته شد. غدد شیری با کمک یک پنس نوک تیز به آرامی به محلول رنگی منتقل و به مدت ۵ دقیقه نگهداری شدند. ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات را روی قسمت دیگری از لام ریخته و غدد رنگ‌آمیزی‌شده به آرامی به آن منتقل شد تا رنگ اضافی شسته شود. در صورت نیاز، غدد شیری با کمک تیغ تیز به تکه‌های کوچک‌تر تقسیم شدند. نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ نوری Olympus مدل AX70 مورد بررسی قرار گرفتند و تصاویر لازم تهیه شد (شکل ۲).



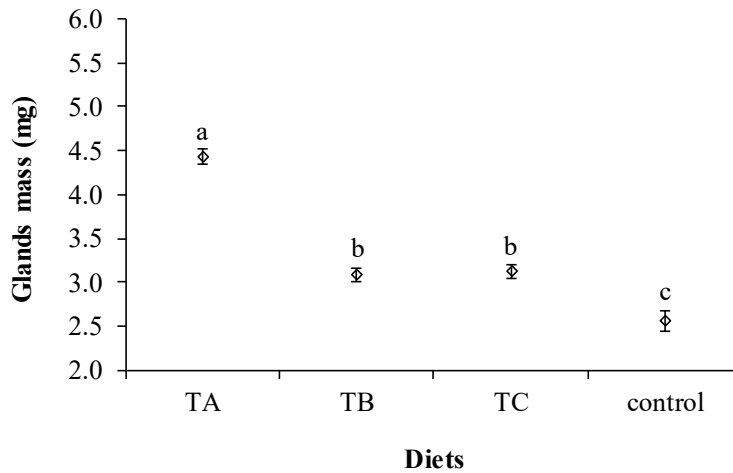
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ نوری از غدد شیری زنبور عسل پرستار پس از رنگ آمیزی با محلول گیمسا. قسمتی از غده و نحوه قرارگیری آسینی‌ها (a) حول مجرای جمع‌آوری‌کننده (cd) (A)، وضعیت آسینی‌ها زیر لامل (B)، طول (L) و عرض (W) آسینی‌ها (C)، اتصال آسینی به مجرای جمع‌آوری‌کننده توسط دسته‌ای از سلول‌های کانالی رشته‌ای شکل (cc) (D). مقیاس خطی = ۱۰۰ میکرومتر

**Fig. 2.** Light microscopy micrographs of hypopharyngeal glands of nurse honey bee after staining with Giemsa solution. Part of the gland and arrangement of acini (a) around a collecting duct (cd) (A), acini status under a cover slip (B), length (L) and width (W) of an acinus (C), connection of acinus to the collecting duct via cable-like cluster of canal cells (cc) (D). Scale bars = 100  $\mu$ m

به ازای هر زنبور، طول و عرض حداقل ۲۰ آسینی به طور تصادفی، اندازه‌گیری و میانگین اندازه آسینی‌های هر زنبور و به همین ترتیب میانگین اندازه آسینی‌های زنبورهای مربوط به هر تیمار محاسبه شد. با قرار دادن یک لامل روی نمونه رنگ‌آمیزی‌شده، آسینی‌ها کاملاً روی سطح لام قرار گرفتند که این امر در تهیه تصاویر با کیفیت‌تر و اندازه‌گیری دقیق‌تر، موثر بود. آزمایش‌ها در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24.0 تجزیه شد. اختلاف آماری میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. گراف‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2019 رسم شد.

بر اساس نتایج ارائه‌شده در شکل ۳، جیره‌های مختلف غذایی اثر معنی‌داری روی وزن غدد شیری زنبور عسل پرستار دارند ( $F=98.92$ ;  $df_{1,e}=3,16$ ;  $P<0.001$ ). وزن غدد در زنبورهایی که از تیمارهای A، B، و C تغذیه کردند به ترتیب ۴/۴۳، ۳/۰۸، و ۳/۱۲ میلی‌گرم بود که در مقایسه با زنبورهای شاهد (۲/۵۶ میلی‌گرم)، افزایش

معنی‌داری نشان داد. جدول ۱ نیز نشان می‌دهد که جیره‌های غذایی مورد آزمایش اثر معنی‌داری روی طول ( $F=$ ) و عرض ( $F=62.55$ ;  $df_{t,e}=3,16$ ;  $P<0.001$ ) و عرض ( $F=215.14$ ;  $df_{t,e}=3,16$ ;  $P<0.001$ ) آسینی‌های غدد شیری دارند.



شکل ۳- تأثیر جیره‌های مختلف غذایی روی وزن (میانگین  $\pm$  خطای معیار) غدد شیری زنبورعسل پرستار. میانگین‌های با حروف مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون توکی،  $P<0.05$ ).

**Fig. 3.** Effect of different nutritional diets on the weight (mean  $\pm$  S.E.) of nurse honey bee's hypopharyngeal glands. Means marked with the same letters are not statistically different (Tukey's test,  $P<0.05$ ).

جدول ۱- تأثیر جیره‌های مختلف غذایی روی طول و عرض (میانگین  $\pm$  خطای معیار) آسینی‌های غدد شیری زنبورعسل پرستار

**Table 1.** Effect of different nutritional diets on length and width (mean  $\pm$  S.E.) of acini of nurse honey bee's hypopharyngeal glands

Diets	Acinus size ( $\mu\text{m}$ )	
	Length	Width
TA	154.04 $\pm$ 2.11 <sup>a</sup>	94.85 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>
TB	143.61 $\pm$ 1.65 <sup>b</sup>	87.90 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>
TC	121.30 $\pm$ 2.02 <sup>c</sup>	68.03 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>
Control	90.61 $\pm$ 1.82 <sup>d</sup>	64.72 $\pm$ 2.05 <sup>b</sup>

میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر ستون از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم دارند (آزمون توکی،  $P<0.05$ ). Means followed by different letters in each column are statistically different (Tukey's test,  $P<0.05$ ).

یافته‌های (Corby-Harris & Snyder, 2018) نیز نشان داد که مقدار پروتئین و نوع گرده گل اثرات متفاوتی بر رشد غدد شیری دارد، به طوری که اندازه آسینی‌ها در زنبورهایی که گرده گل‌های درخت بادام و گیاهان صحرائی را دریافت کردند در مقایسه با زنبورهایی که با گرده گل‌های مناطق جنوب شرقی آمریکا و رژیم غذایی بدون گرده تغذیه شدند، به طور معنی‌داری بیشتر بود.

به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جیره‌های غذایی مورد آزمایش اثرات متفاوتی روی وزن غدد شیری و اندازه آسینی‌ها به همراه دارند. از آنجایی که میزان فعالیت ترشحی غدد شیری رابطه مستقیمی با اندازه آسینی‌ها دارد (Deseyn & Billen, 2005; Johnson, 2010)، بنابراین تأمین منابع غذایی به ویژه پروتئین‌ها برای کلنی‌های زنبورعسل منجر به تولید بیشتر ژل رویال می‌شود. بر همین اساس به زنبورداران توصیه می‌شود،

لاروهای پیوندشده را در کلنی‌های شروع‌کننده‌ای قرار دهند که اولاً تعداد زیادی زنبور جوان ۷ تا ۱۴ روزه در آنها حضور دارد و ثانیاً به طور مطلوبی با گرده و جایگزین‌های گرده تغذیه شده باشند.

## References

- Corby-Harris, V. & Snyder, L. A.** (2018) Measuring hypopharyngeal gland acinus size in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Journal of Visualized Experiments* 139, e58261.
- Decourtye, A., Mader, E. & Desneux, N.** (2010) Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie* 41, 264-277.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E. & 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.
- Deseyn, J. & Billen, J.** (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 36, 49-57.
- Johnson, B. R.** (2010) Division of labor in honey bees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64, 305-316.
- Michener, C. D.** (1974) *The Social Behavior of the Bees*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 418 P.
- Rahman, S., Thangkhiew, I. & Hajong, S. R.** (2014) Hypopharyngeal gland activity in task-specific workers under brood and broodless conditions in *Apis cerana indica* (Fab.). *Journal of Apicultural Science* 58, 59-70.
- Snodgrass, R. E.** (1984) *Anatomy of the honey bee*. Comstock Pub. Associates. 334 p.
- Suenami, S., Miyazaki, R. & Kubo, T.** (2018) Detection of phospholipase C activity in the brain homogenate from the honeybee. *Journal of Visualized Experiments* 139, e58173.
- Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M. & Patch, H. M.** (2015) Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science* 10, 133-141.
- Yeager, J. F.** (1945) The blood picture of the southern armyworm (*Prodenia eridania*). *Journal of Agricultural Research* 71, 1-40.