

## تولید ژله رویال، مقدار تیامین ژله رویال و توسعه غدد هیپوفارنژیال در کلنی‌های زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera Meda*) تغذیه شده با سطوح مختلف تیامین



حسین محب‌الدینی<sup>۱\*</sup>، عاطفه مقصودلو<sup>۲</sup>، بهروز دستار<sup>۳</sup> و غلامحسین طهماسبی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه علوم دامی

<sup>۲</sup> ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی

<sup>۳</sup> ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده علوم دامی

<sup>۴</sup> ایران، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم دامی، بخش زنبور عسل

تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۷

### چکیده

برای بررسی اثر تغذیه‌ای تیامین (ویتامین B<sub>1</sub>) بر توسعه غدد هیپوفارنژیال، تولید و میزان تیامین ژله رویال کلنی زنبورعسل ایرانی (*Apis mellifera M.*) آزمایشی در شرایط طبیعی در مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام شد. در این آزمایش ۲۰ کلنی زنبور عسل ایرانی در پنج گروه تغذیه‌ای با چهار تکرار مورد استفاده قرار گرفت. کلنی‌های گروه کنترل با شربت شکر ۱:۱ و کلنی‌های آزمایشی به روش مشابه ولی با این تفاوت تغذیه شدند که شربت شکر با سطوح مختلف تیامین (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون) مکمل‌سازی شده بود. عملیات صحرائی به مدت ۶۰ روز (۳۰ روز تغذیه با شربت و ۳۰ روز بعد از تغذیه) در فصل بهار انجام گرفت. برای بررسی رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال، طول و عرض ده آسینی برای هر زنبور کارگر در ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روزگی با استفاده از استریومیکروسکوپ، میکروسکوپ نوری و میکرومتر اندازه‌گیری شد. همچنین برای تعیین تیامین ژله رویال یک فرایند استخراج به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از ستون C<sub>18</sub> و پرتو UV به کار گرفته شده بود. نتایج آزمایش نشان داد که سطح آسینی غدد هیپوفارنژیال زنبورهای کارگر در کلنی‌های تغذیه شده با سطوح مختلف تیامین دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد. زنبورهای تغذیه شده با سطوح بالای تیامین سطح آسینی بیشتری داشتند (P<۰/۰۵). تجزیه محتوای تیامین نمونه‌های ژله رویال با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا نشان داد که مقدار تیامین در ژله رویال کلنی‌های تغذیه شده با ۴۰۰ قسمت در میلیون تیامین بیشتر از (۲/۷ میلی‌گرم در صد گرم) کلنی‌های دیگر بود (P<۰/۰۵). به طور کلی تغذیه سطوح مختلف تیامین نشان داد که غدد هیپوفارنژیال در ۶ و ۹ روزگی رشد بیشتری داشتند. همچنین با افزایش مصرف تیامین در کلنی، مقدار تیامین در ژله رویال نیز افزایش یافت. در این آزمایش تغذیه ۴۰۰ قسمت در میلیون تیامین باعث بهبود سطح رشد غدد هیپوفارنژیال و افزایش مقدار تیامین ژله رویال شد.

واژه‌های کلیدی: تیامین، زنبورعسل، غدد هیپوفارنژیال، ژله رویال

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۵۵۹۹۵۴، پست الکترونیکی: Mohebodini@yahoo.com

### مقدمه

پروتئینی، لیپیدی، ویتامینی و مواد معدنی زنبورعسل است، بیشتر به جای تغذیه تحریکی کلنی‌ها با جانشین‌های گرده از شربت استفاده می‌کنند. زنبور عسل شبیه هر موجود زنده

یکی از مشکلات عمده بیشتر زنبورداران عدم اطلاع کافی از تغذیه و نیازهای غذایی زنبورعسل می‌باشد. زنبورداران در زمان کمبود یا عدم وجود گرده که تأمین‌کننده نیازهای

ضروری به نظر می‌رسد. در کل کمبود ویتامین‌ها در فیزیولوژی غدد ترشحی از جمله غدد هیپوفارنژیال اثر گذاشته و ترشحات آن‌ها را از نظر کیفی و کمی تحت تأثیر قرار می‌دهد. کاهش ترشح ژله رویال باعث ضعیف شدن ملکه، کاهش میزان تخم‌گذاری ملکه و پرورش نوزاد و در نهایت به کم جمعیت شدن کلنی‌ها می‌انجامد. بدیهی است که یکی از مهم‌ترین عواملی که در ایجاد تلفات زمستانی و بهاره کلنی‌ها مؤثر است کمبود جمعیت در ایام یاد شده می‌باشد. بعضی از تولیدات زنبور عسل به‌ویژه ژله رویال غنی از ویتامین‌ها هستند. به خاطر اهمیت ویتامین‌ها در تغذیه زنبور عسل و عدم شناخت کافی در مورد محتوای ویتامینی ژله رویال ضروری است که داده‌های واقعی به-واسطه روش‌های مناسب به‌دست آورده شود (۹). این پژوهش برای بررسی اثر سطوح مختلف تیامین روی توسعه غدد هیپوفارنژیال، میزان تولید ژله رویال و مقدار تیامین موجود در ژله رویال زنبور عسل در نظر گرفته شده است.

### مواد و روشها

به منظور بررسی اثر تغذیه‌ای تیامین بر رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال، تولید ژله رویال و میزان تیامین ژله رویال در کلنی‌های زنبور عسل ایرانی، آزمایشی در مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، بخش تحقیقات زنبور عسل در کرج انجام شد. عملیات صحرائی به مدت ۶۰ روز (۳۰ روز تغذیه و ۳۰ روز بعد از مصرف) در فصل بهار (اردیبهشت و خرداد ماه) به طول انجامید. در این آزمایش ۲۰ کندو حاوی کلنی‌های زنبور عسل که از نظر جمعیت، میزان نوزاد و ذخیره غذایی در شرایط یکسانی قرار داشتند، در نقاط مختلف زنبورستان به‌صورت تصادفی پخش و تیمارهای آزمایشی نیز به‌صورت تصادفی به آن‌ها تخصیص یافت. در این آزمایش برای اجتناب از اثر تفاوت‌های ژنتیکی بین کلنی‌ها از ملکه‌های همسن خواهری استفاده شد. برای این کار کلنی‌های مزبور در اوایل بهار تهیه و

دیگر نیازمند مواد مغذی ضروری برای زنده ماندن و تولید مثل است. این حشره نیازمند پروتئین، کربوهیدرات، چربی، ویتامین، مواد معدنی و آب می‌باشد (۱۷). شاخص‌های کلیدی برای سلامت و رشد زنبور عسل وجود ویتامین‌های  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_6$  و اسید فولیک در گرده می‌باشد. در فصولی از سال امکان دسترسی به گرده و شهد وجود ندارد و به تدریج زنبورهای کارگر از منابع ذخیره شده در کندو استفاده می‌کنند. غلظت مواد مغذی گرده به ویژه ویتامین‌ها با مدت زمان ذخیره گرده رابطه معکوس دارد (۳). مشاهدات نشان داده است که افزایش زمان ذخیره گرده در مشاهدات باعث اتلاف ویتامینی در گرده می‌شود (۱۷). نیازهای ویتامینی زنبور عسل به خوبی شناخته نشده است ولی با وجود این، اثرات مثبت آن در پرورش نوزاد (Brood rearing) و رشد و توسعه غدد هیپوفارنژیال (Development of hypopharyngeal glands) به اثبات رسیده است (۶، ۷، ۹). غدد هیپوفارنژیال یک جفت می-باشد که جایگاه آن‌ها در داخل سر پشت چشم‌های مرکب زنبور عسل می‌باشد. غدد هیپوفارنژیال بزرگ‌ترین غدد در حفره سر، پشت چشم‌های مرکب زنبور عسل می‌باشند که بیشتر از ۱۰۰۰ لوبول تشکیل شده است و تقریباً فضای جلوی مغز را پر می‌کند. در زنبورهای جوان غدد هیپوفارنژیال بیشترین رشد را دارا می‌باشند و مسئول سنتز غذای غنی از پروتئین به نام "ژله رویال" می‌باشد. ژله رویال ماده غذایی ملکه و لاروهای زنبور عسل می‌باشد. فقط ملکه است که در کل دوران زندگی از ژله رویال تغذیه می‌کند. فعالیت غدد هیپوفارنژیال به‌وسیله مراحل مختلف نوزادی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. با توجه به مقدار ویتامین-های موجود در گرده‌های جمع‌آوری شده توسط زنبور عسل مشخص شده است که گرده از لحاظ یکسری ویتامین‌ها از جمله تیامین فقیر می‌باشد. فقر ویتامینی همراه با اتلاف ویتامینی صورت گرفته به وسیله ذخیره گرده در کندو منجر به کاهش شدید این گروه از ویتامین‌ها در گرده می‌شود که برای جبران این کاهش، مکمل‌سازی ویتامین‌ها

با استفاده از آزمون دانکن و در سطح معنی‌داری ۵ درصد صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS استفاده شد. تیمارهای آزمایشی در جدول ۱ آورده شده است.

ملکه‌های مذکور در آنها مستقر شدند. در این آزمایش تغذیه کلنی‌ها با تیامین هیدروکلراید (Sigma® thiamin hydrochloride T-4625, ≥99.9%) به صورت یک روز در میان انجام شد. داده‌های حاصل از آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس شد. مقایسه میانگین‌ها

جدول ۱- سطوح مختلف تیامین مورد استفاده در تغذیه کلنی‌های زنبورعسل

تیامین	سطح مصرف ویتامین B <sub>1</sub>
تیمار ۱ (شاهد)	یک لیتر شربت بدون تیامین
تیمار ۲ (۱۰۰ قسمت در میلیون تیامین)	۱۰۰ میلی‌گرم تیامین در یک لیتر شربت
تیمار ۳ (۲۰۰ قسمت در میلیون تیامین)	۲۰۰ میلی‌گرم تیامین در یک لیتر شربت
تیمار ۴ (۳۰۰ قسمت در میلیون تیامین)	۳۰۰ میلی‌گرم تیامین در یک لیتر شربت
تیمار ۵ (۴۰۰ قسمت در میلیون تیامین)	۴۰۰ میلی‌گرم تیامین در یک لیتر شربت

می‌باشد.

**برداشت ژله رویال:** نحوه جمع‌آوری ژله رویال به این صورت بود که ابتدا از هر کلنی اولیه یک جمعیت متوسطی از زنبوران پرستار برداشته شد تا یک کلنی ثانویه فاقد ملکه را ایجاد کنیم. پس از پیوند زدن، کلنی‌ها وادار به شاخون زدن شدند. شاخون‌های هر کلنی سه روز بعد از تشکیل از کندو برداشته شد و ژله‌ی آن‌ها در ظروف مخصوص جهت بررسی‌های بعدی ذخیره شدند.

**اندازه‌گیری مقدار تیامین ژله رویال:** در این آزمایش مقدار تیامین نمونه‌های ژله رویال هر کلنی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (High-performance liquid chromatography) در آزمایشگاه صنایع غذایی دانشگاه تهران اندازه‌گیری شد. در این آزمایش تیامین هیدروکلراید با خلوص ۹۹/۹ درصد به عنوان استاندارد خارجی مورد استفاده قرار گرفت. تقریباً نیم گرم ژله رویال به لوله اپندورف ریخته سپس ۶۰ سی‌سی اسید کلریدریک ۰/۱ مولار به آن اضافه و نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت می‌دهیم. بعد از نیم ساعت محلول را سرد کرده و با محلول استات سدیم ۲/۵ مولار pH آن را به ۴/۶ می‌رسانیم سپس محلول را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده، و از طریق یک غشای ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر و به

**اندازه‌گیری رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال:** برای اندازه‌گیری رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال به تعداد ۱۰۰ زنبور عسل کارگر به هنگام خروج از سلول (زنبور عسل یک روزه) با استفاده از مایژیک مخصوص، نشانه‌گذاری شدند. به تعداد ۱۰ عدد زنبور عسل کارگر نشاندار شده از هر کلنی (تکرار) در سن ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روزگی انتخاب شدند. منظور از سن ۳ روزگی عبارت از سه روز بعد از نشانه‌گذاری زنبور عسل است، سر زنبورهای عسل انتخاب شده جدا و به دقت وزن شدند. در زیر استریومیکروسکوپ غدد هیپوفارنژیال از داخل سرها خارج و آسینی غده‌های غوطه‌ور در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد (ایزوتونیک نسبت به همولنف) زیر میکروسکوپ نوری با یک میکرومتر اندازه‌گیری شد (طبق تحقیقات صورت گرفته در موسسه تحقیقاتی پرورش زنبور عسل در کشور آلمان زیر نظر پروفیسور کاسپر بنیفلد). طول و عرض ۱۰ آسینی از قسمت‌های مختلف غده اندازه‌گیری و مساحت آن‌ها که به وسیله معادله زیر به دست می‌آید به عنوان شاخصی از رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال در نظر گرفته شد (۱).

$$Actual\ surface = \frac{a \times b}{2} \times \pi$$

که  $\pi$ : ۳/۱۴ حداکثر عرض b: حداکثر طول a:

معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند. در روز آخر بررسی غدد یعنی ۱۵ روزگی، رشد غدد برای تیمار شربت +۴۰۰ قسمت در میلیون تیمار در مقایسه با سایر تیمارها در بیشترین سطح خود حفظ شده بود که این اختلاف نیز از لحاظ آماری معنی‌دار بود. اختلافات آماری بین زمان‌های مختلف برای هر کدام از تیمارها به صورت جداگانه در جدول ۳ آورده شده است. برای تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری در رشد غدد هیپوفارنژیال بین زمان‌های مختلف مشاهده نشد. برای تیمار شربت + ۱۰۰ قسمت در میلیون تیمار رشد و نمو غدد تا ۶ روزگی افزایش یافته سپس کاهش پیدا کرده است. به طوری که اختلاف بین زمان ۶ روزگی و ۱۵ روزگی معنی‌دار بود. افزایش رشد غدد برای تیمار شربت + ۲۰۰ قسمت در میلیون تیمار تا ۹ روزگی ادامه داشته و سپس تا ۱۵ روزگی کاهش یافته بود. اختلافات بین زمان‌های ۹ و ۱۵ روزگی معنی‌دار بوده و بین سایر زمان‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. کلنی‌های تغذیه شده با شربت + ۳۰۰ قسمت در میلیون تیمار در زمان‌های ۶، ۹ و ۱۲ روزگی بیشترین سطح رشد غدد را داشتند. کمترین سطح رشد غدد مربوط به زمان ۱۵ روزگی بود که با زمان‌های ۶، ۹ و ۱۲ روزگی اختلاف معنی‌داری داشت. برای تیمار شربت + ۴۰۰ قسمت در میلیون تیمار رشد غدد در زمان ۹ روزگی بیشترین مقدار خود را داشت که با زمان‌های ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روزگی اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین مقدار رشد غدد برای این تیمار در زمان ۳ و ۶ روزگی بود. بعد از ۹ روزگی سطح رشد غدد سیر نزولی داشته است.

دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد. تیمار بوسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از ستون C<sub>18</sub> فاز معکوس (۴/۶ میلی‌متر × ۲۵۰ میلی‌متر) و اشعه UV طول موج ۲۵۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای فاز متحرک مخلوطی از دی هگزان‌سولفونیک‌اسید، آمونیوم-هیدروکساید، استونیتریل و آب به ترتیب با نسبت‌های (۹۰/۸۴ : ۹/۰۲ : ۰/۰۵ : ۰/۰۹) استفاده شد. همه حلال‌های مورد استفاده در فاز متحرک از Merck® HPLC بودند.

### نتایج

**رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال:** مقایسه میانگین داده‌های مربوط به رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال زنبورهای عسل در فصل بهار در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است. در این فصل رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال در تمام سنین اختلافات معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی داشت. به طوری که در سن ۳ روزگی زنبورهای عسل رشد غدد در بین تیمارهای شربت + ۳۰۰ قسمت در میلیون تیمار و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بین سایر تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. در ۶ روزگی از سن زنبورهای عسل تیمار شاهد کمترین رشد و نمو غدد را در مقایسه با سایر تیمارها داشت. در ۹ روزگی کلنی‌های تغذیه شده با سطح ۴۰۰ قسمت در میلیون تیمار (۰/۱۴۷۸ میلی‌متر مربع) سطح رشد غدد بالایی در مقایسه با سایر کلنی‌ها داشتند که اختلافات بین این تیمارها نیز از لحاظ آماری معنی‌دار بود. در ۱۲ روزگی تیمارهای با سطح تغذیه ۳۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون تیمار اختلاف آماری

جدول ۲- سطح آسینی غدد هیپوفارنژیال (mm<sup>2</sup>) در زنبورهای کارگر (مقایسات میانگین در بین تیمارها برای هر زمان)<sup>۱</sup>

تیمارهای آزمایشی	۳ روزگی	۶ روزگی	۹ روزگی	۱۲ روزگی	۱۵ روزگی
شربت شکر (۱:۱)	۰/۰۷۴۵ <sup>b</sup>	۰/۰۷۳۲ <sup>b</sup>	۰/۰۸۳۳ <sup>b</sup>	۰/۰۷۲۶ <sup>b</sup>	۰/۰۶۹۹ <sup>bc</sup>
شربت+تیمار ۱۰۰ قسمت در میلیون	۰/۰۹۳۲ <sup>ab</sup>	۰/۰۳۳ <sup>a</sup>	۰/۱۰۰۲ <sup>b</sup>	۰/۰۸۸۰ <sup>b</sup>	۰/۰۸۲۷ <sup>bc</sup>
شربت+تیمار ۲۰۰ قسمت در میلیون	۰/۰۸۰۷ <sup>ab</sup>	۰/۰۹۲۵ <sup>a</sup>	۰/۱۱۰۲ <sup>b</sup>	۰/۰۸۵۰ <sup>b</sup>	۰/۰۶۶۹ <sup>c</sup>
شربت+تیمار ۳۰۰ قسمت در میلیون	۰/۰۹۸۷ <sup>a</sup>	۰/۱۰۷۹ <sup>a</sup>	۰/۱۰۹۹ <sup>b</sup>	۰/۱۰۸۲ <sup>a</sup>	۰/۰۸۶۳ <sup>b</sup>
شربت+تیمار ۴۰۰ قسمت در میلیون	۰/۰۸۸۳ <sup>ab</sup>	۰/۰۹۰۶ <sup>ab</sup>	۰/۱۴۷۸ <sup>a</sup>	۰/۱۱۹۷ <sup>a</sup>	۰/۱۰۵۶ <sup>a</sup>
خطای استاندارد کل <sup>۲</sup>	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۵۹	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۴۵	۰/۰۰۳۸

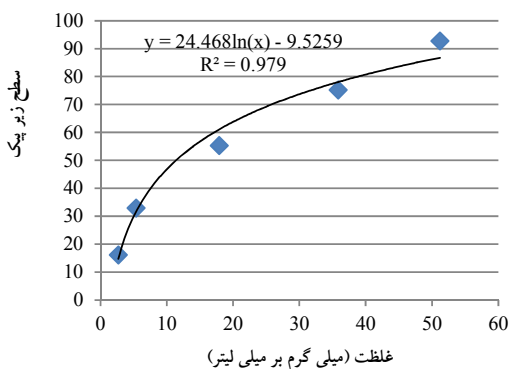
SEM - ۲

a - 1, b, c میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

جدول ۳- سطح آسینی غدد هیپوفارنژیال (mm<sup>3</sup>) در زنبورهای کارگر (مقایسات میانگین در طول زمان برای هر تیمار)<sup>۱</sup>

تیمارهای آزمایشی	۳ روزگی	۶ روزگی	۹ روزگی	۱۲ روزگی	۱۵ روزگی
شربت شکر (۱:۱)	۰/۰۷۴۵	۰/۰۷۳۲	۰/۰۸۳۴	۰/۰۷۲۶	۰/۰۶۹۹
شربت+تیامین ۱۰۰ قسمت در میلیون	۰/۰۹۳۲ <sup>ab</sup>	۰/۱۰۳۳ <sup>a</sup>	۰/۱۰۰۲ <sup>ab</sup>	۰/۰۸۸۰ <sup>ab</sup>	۰/۰۸۲۷ <sup>b</sup>
شربت+تیامین ۲۰۰ قسمت در میلیون	۰/۰۸۰۷ <sup>ab</sup>	۰/۰۹۲۵ <sup>ab</sup>	۰/۱۱۰۲ <sup>a</sup>	۰/۰۸۵۰ <sup>ab</sup>	۰/۰۶۶۹ <sup>b</sup>
شربت+تیامین ۳۰۰ قسمت در میلیون	۰/۰۹۸۷ <sup>ab</sup>	۰/۱۰۷۹ <sup>a</sup>	۰/۱۰۹۹ <sup>a</sup>	۰/۱۰۸۲ <sup>a</sup>	۰/۰۸۶۳ <sup>b</sup>
شربت+تیامین ۴۰۰ قسمت در میلیون	۰/۰۸۸۳ <sup>c</sup>	۰/۰۹۰۶ <sup>c</sup>	۰/۱۴۷۸ <sup>a</sup>	۰/۱۱۹۷ <sup>b</sup>	۰/۱۰۵۶ <sup>bc</sup>
خطای استاندارد کل <sup>۲</sup>	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۵۹	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۴۵	۰/۰۰۳۸

۱- a, b, c میانگین‌های هر ردیف با حروف متفاوت در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند. ۲- SEM



**تولید ژله رویال: مقایسات میانگین داده‌های مربوط به**  
میزان تولید ژله رویال نیز در کلنی‌های تغذیه شده با سطوح مختلف تیمامین در جدول (۴) آورده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود کلنی‌های تغذیه شده با سطح تیمامین ۱۰۰ قسمت در میلیون بیشترین مقدار تولید ژله رویال را داشته است و با تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون تیمامین اختلاف معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴- اثر تغذیه تیمامین بر میزان تولید ژله رویال در کلنی‌های آزمایشی<sup>۱</sup>

تیمارهای آزمایشی	تولید ژله رویال (گرم)
شربت شکر (۱:۱)	۲/۰۵ <sup>a</sup>
شربت+تیامین ۱۰۰ قسمت در میلیون	۲/۴۶ <sup>a</sup>
شربت+تیامین ۲۰۰ قسمت در میلیون	۱/۰۲ <sup>b</sup>
شربت+تیامین ۳۰۰ قسمت در میلیون	۲/۳۳ <sup>a</sup>
شربت+تیامین ۴۰۰ قسمت در میلیون	۱/۰۰ <sup>b</sup>
خطای استاندارد کل <sup>۲</sup>	۰/۲۲

۱- میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند. ۲- SEM

**میزان تیمامین ژله رویال:** در این آزمایش براساس نمونه استاندارد، در پنج سطح غلظت تیمامین (X) پنج پاسخ (Y) توسط دستگاه HPLC به دست آوردیم و با رسم نمودار مربوط به این نقاط معادله لگاریتمی آن به دست آمد (نمودار ۱). با توجه به معادله به دست آمده مقدار عددی تیمامین موجود در نمونه‌های ژله رویال (X) با توجه به پاسخی که از هر نمونه ژله رویال توسط دستگاه HPLC به دست آمده بود، محاسبه و ثبت شد.

نمودار ۱- منحنی استاندارد مربوط به تغییرات سطح زیر پیک با غلظت تیمامین

مقایسات میانگین داده‌های مربوط به مقدار تیمامین موجود در ژله رویال در جدول (۵) آورده شده است. نتایج نشان داد که محتوای تیمامین در نمونه‌های ژله رویال جمع‌آوری شده از کلنی‌های تغذیه شده با سطوح مختلف تیمامین، متفاوت می‌باشد. به طوری که مقدار تیمامین موجود در ژله رویال کلنی‌های تغذیه شده با ۴۰۰ قسمت در میلیون تیمامین بیشترین مقدار (۱/۵ میلی‌گرم در صد گرم) را به خود اختصاص داده بود. مقدار تیمامین ژله رویال در کلنی‌های تغذیه شده با سطح ۴۰۰ قسمت در میلیون تیمامین به-طور معنی‌داری بیشتر از کلنی‌های تغذیه شده با سطوح تیمامین ۱۰۰، ۲۰۰ قسمت در میلیون و کلنی‌های شاهد بود. اختلاف آماری معنی‌داری در مقدار تیمامین ژله رویال در بین کلنی‌های تغذیه شده با سطوح ۳۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون تیمامین مشاهده نشد. کمترین مقدار تیمامین در ژله رویال مربوط به گروه شاهد با ۰/۶۷ میلی‌گرم در صد گرم

نمو غدد هیپوفارنژیال را در طی ۱۲ روز اول پس از تولد تحت تأثیر قرار دهد (۲). محققان گزارش کردند که حضور نوزاد لاروی، فعالیت غذایی به نوزادان (۱۰) و حضور زنبورهای بالغ (۱۸) در کندو همراه با مصرف پروتئین باعث تحریک رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال زنبورهای کارگر می‌شود. اندازه غدد هیپوفارنژیال که ارگان‌های اصلی برای ترشح ژله رویال هستند تحت تأثیر سن (۴، ۱۰) و پروتئین خوراک (۸، ۱۵) می‌باشد و با مقدار ترشح ژله رویال (۸) و وزن سر (۴) همبستگی مثبت دارد. وقتی زنبورهای کارگر پرستار تبدیل به زنبورهای کارگر صحرا (زنبورهای مزرعه) می‌شوند حجم غدد هیپوفارنژیال به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته و شروع به ترشح آنزیم‌هایی مانند اینورتاز می‌کند (۱۱) این کاهش معمولاً در سن ۹ و ۱۲ روزگی اتفاق می‌افتد. اوج رشد آسینی در سن ۶ روزگی زنبورها در طی فصل تابستان اتفاق می‌افتد زمانی که زنبورهای کارگر مشغول تغذیه لاروها با ژله رویال هستند که در این آزمایش نیز مشاهده شد اما بعد از ۱۵ روزگی رشد آسینی شروع به کاهش می‌کند اما بعد از ۱۵ روزگی رشد آسینی شروع به کاهش می‌کند. وقتی که حجم آسینی و تعداد وزیکول‌های ترشحي کاهش یافت، هیچ وزیکولی بعد از ۳ هفته‌گی دیده نمی‌شود (۸).

نتایج آزمایش نشان داد که مقدار تیامین موجود در نمونه‌های ژله رویال جمع‌آوری شده از کلنی‌های آزمایشی متفاوت است که شاید به دلیل افزودن سطوح مختلف تیامین در شربت شکر است. محتوای تیامین در نمونه‌های ژله رویال گروه شاهد کم بود. وقتی نتایج و گزارشات محققان دیگر (۱۶، ۱۳) را در ارتباط با اندازه‌گیری مقدار تیامین ژله رویال با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مورد بررسی قرار می‌دهیم، مشاهده می‌کنیم که مقدار تیامین موجود در نمونه‌های مختلف ژله رویال در دامنه بین ۰/۶۷-۰/۱۴ میلی‌گرم در صد گرم متغیر می‌باشد. نتایج بدست آمده در این آزمایش برای گروه شاهد با نتایج (۱۶)

می‌باشد که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با کلنی‌های تغذیه شده با سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ قسمت در میلیون تیامین ندارد.

جدول ۵- تیامین موجود در ژله رویال جمع‌آوری شده از کلنی‌های تغذیه شده با سطوح مختلف تیامین<sup>۱</sup>

تیماهای آزمایشی	مقدار تیامین در ژله رویال (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم)
شربت شکر (۱:۱)	۰/۶۷۵ <sup>b</sup>
شربت+تیامین ۱۰۰ قسمت در میلیون	۰/۸۶۶ <sup>b</sup>
شربت+تیامین ۲۰۰ قسمت در میلیون	۰/۸۰۰ <sup>b</sup>
شربت+تیامین ۳۰۰ قسمت در میلیون	۱/۰۰۰ <sup>ab</sup>
شربت+تیامین ۴۰۰ قسمت در میلیون	۱/۵۰۰ <sup>a</sup>
خطای استاندارد کل <sup>۲</sup>	۰/۰۹۷

۱ - میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند. ۲ - SEM

## بحث

در این تحقیق اوج رشد آسینی در سن ۶ و ۹ روزگی اتفاق افتاد که با نتایج (۱۱، ۸، ۵، ۴) مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که رشد سطح آسینی زنبورهای کارگر تا سن ۶ و ۹ روزگی افزایش یافته و سپس رو به کاهش می‌گذارد. این محققان گزارش کردند که سطح آسینی در ۶ روزگی دو برابر سطح آسینی زنبورهای تازه متولد شده است. با این وجود نتایج آزمایش در ارتباط با رشد و نمو غدد با نتایج (۱) مغایرت دارد. آن‌ها گزارش کردند که سطح آسینی با افزایش سن افزایش یافته و در سن ۱۲ و ۱۵ روزگی به اوج رشد خود می‌رسد. در این آزمایش کمترین رشد سطح آسینی مربوط به کلنی‌های شاهد یعنی تغذیه شده با شربت شکر بود که با نتایج (۱) مطابقت دارد. اندازه غدد هیپوفارنژیال می‌تواند برای تخمین آسان فعالیت غدد و وضعیت فیزیولوژیکی زنبور عسل استفاده شود. رشد و نمو و فعالیت غدد هیپوفارنژیال می‌تواند بوسیله شرایط کلنی و همچنین تغییرات فصلی تحت تأثیر قرار بگیرد (۱۲). نتایج تحقیقات نشان داده است که سن زنبورها می‌تواند رشد و

نیاز کلنی به تیمامین باشد. در این حالت اگر نیاز کلنی به تیمامین بیشتر باشد زنبورهای کارگر با تغذیه تیمامین بیشتر آن را از طریق ژله رویال مورد تغذیه لاروها، ملکه و نرها قرار می‌دهند. دلیل دیگری که می‌تواند باعث اختلافات موجود در مقادیر تیمامین ژله رویال شود ذخیره یا دفع تیمامین اضافی از طریق ژله رویال باشد، یعنی با افزایش سطح تیمامین جیره غذایی، زنبور عسل تیمامین بیشتری را دریافت کرده و مقدار مازاد بر نیاز خود را به‌وسیله افزودن آن به ژله رویال از بدن خود خارج می‌کند. البته آنالیزهای بیشتری برای تعیین اختلاف محتوای ویتامینی در ژله رویال جمع‌آوری شده از زنبورها و مناطق مختلف مورد نیاز است (۱۳). با گذشت زمان محتوای ویتامینی در محصول ژله رویال می‌تواند دست‌خوش تغییر قرار بگیرد. یعنی نمونه‌های ژله رویال تازه محتوای ویتامینی بیشتری در مقایسه با نمونه‌های نگهداری شده به مدت طولانی خواهند داشت.

و (۱۳) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کردند که مقدار تیمامین موجود در نمونه‌های ژله رویال جمع‌آوری شده از نقاط مختلف در دامنه ۰/۱۴ و ۰/۶۷ می‌باشد که در این آزمایش مقدار تیمامین ژله رویال در گروه شاهد ۰/۶۷۵ میلی‌گرم در صد گرم بود. ولی نکته جالب توجه در این آزمایش این بود که مقادیر تیمامین موجود در نمونه‌های ژله رویال جمع‌آوری شده از کلنی‌های تغذیه شده با سطوح مختلف تیمامین بیشتر از داده‌های گزارش شده می‌باشد. در واقع این اختلافات در ارتباط با تغذیه سطوح مختلف تیمامین در کلنی‌های آزمایشی است. نتایج تحقیقات ما نشان داد که با افزایش سطح تیمامین در جیره غذایی کلنی‌های آزمایشی مقدار آن در ژله رویال نیز افزایش می‌یابد. پس می‌توان نتیجه گرفت که با افزودن تیمامین در جیره غذایی زنبورهای عسل ایرانی می‌توان مقدار آن را در ژله رویال نیز افزایش داد. این اختلافات در مقدار تیمامین ژله رویال ممکن است چند دلیل داشته باشد که یکی از آن‌ها می‌تواند مربوط به

### منابع

- 1- Al-Ghamdi, A. A., Al-Khaibari, A. M. and Omar, M. O. 2011. Consumption rate of some proteinic diets affecting hypopharyngeal glands development in honey bee workers. Saudi Journal of Biological Sciences. 18:73-77.
- 2- Alqarni, A. S. 2006. Influence of some protein diets on the longevity and some physiological conditions of honeybee *Apis mellifera* L. workers. Journal of Biological Sciences. 6:734-737.
- 3- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C. and Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardization of analytical methods. Journal of Apicultural Research and Bee World. 47:156-163.
- 4- Deseyn, J. and Billen, J. 2005. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). Apidologie. 36:49-57.
- 5- Feng, M., Fang, Y. and Li, J. 2009. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. BioMed Central Genomics. 10:645.
- 6- Haydak, M.H. and Dietz, A. 1965. Influence of the diet on the development and brood rearing of honeybees. Proc International Beekeeping Congress, Bucharest. 20:158-162.
- 7- Herbert, E. W. J. 1992. Honey bee nutrition. In Graham, J E (ed.). The hive and the honey bee. Dadant and Sons Inc.; Hamilton, IL, USA: 197-233.
- 8- Hrasnig, N. and Crailsheim, K. 1998. Adaptation of hypopharyngeal gland development of the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. Journal of Insect Physiology. 44:929-939.
- 9- Huang, Z. (2010). Honey Bee Nutrition. American Bee Journal. 1-8.
- 10- Huang, Z. Y. and Otis, G. W. 1989. Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Insectes Sociaux. 36:264-276.
- 11- Knecht, D. and Kaatz, H. H. 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. Apidologie. 21: 457-468.

- 12- Maurizio, A. 1954. Pollen nutrition and life process of honey bee. *Landwirtsch Jahrb Schweiz*. 68:115-186.
- 13- Moreschi, E. C. P. and Almeida-Muradian, L. B. d. 2009. Vitamins B1, B2, B6 and PP contents in royal jelly. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*. 68:187-191.
- 14- Neupane, K. R. and Thapa, R. B. 2005. Pollen collection and brood production by honeybees (*Apis mellifera* L.) under Chitwan condition of Nepal. *Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science*. 26:143-148.
- 15- Pernal S. F. and Currie, R. W. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*. 31: 387-409.
- 16- Presoto, A. E. F., Rios, M. D. G. and de Almeida-Muradian L. B. 2004. Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Vitamins B1, B2 and B6 in Royal Jelly. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 15:136-139.
- 17- Somerville, D. 2000. Honey bee nutrition and supplementary feeding. *Agnote, New Agriculture*. 178:1-8.
- 18- Suzuki, K. 1988. The development of hypopharyngeal glands in honey bee workers, *Bulletin of the Faculty of Education, Chiba University*. 36: 93-101.



## Royal jelly production, amount of royal jelly thiamine and hypopharyngeal glands development in Iranian honey bee (*Apis mellifera* Meda) colonies fed with different levels of thiamine

Mohebodini H.<sup>1</sup>, Maqsoudlou A.<sup>2</sup>, Dastar B.<sup>3</sup> and Tahmasebi Gh.H.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran.

<sup>3</sup> Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran.

<sup>4</sup> Dept. of Honey bee, Animal Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, I.R. of Iran.

### Abstract

The experiment was carried out under natural condition to assess potential impacts of thiamine nutrition on development of hypopharyngeal glands (HPGs), amount of royal jelly thiamine and jelly production in honey bee colonies (*Apis mellifera* M.). This trial was carried out at Honey Bee Department of Animal Science Research Institute of Iran. Twenty honey bee colonies, divided into 5 experimental groups, were used in the study. Control groups were fed sugar syrup (1:1). The experimental colonies were fed in the same manner but with syrup supplemented with different levels of thiamine (100, 200, 300 and 400 ppm). The experiment was conducted for 60 days in spring season. To investigate the development of HPGs, length and width of ten acini for each worker bee at 3, 6, 9, 12 and 15 days were measured using a stereomicroscope, optical microscope and micrometer. A single extraction process was employed and thiamine was determined by HPLC using C18 column and detected by UV. The results showed that the acinal surface of HPGs was significantly different under feeding with different diets. Colonies fed with high level of thiamine had a larger acini surface ( $P < 0.05$ ). Thiamin content of royal jelly samples analyzed by HPLC showed that the amount of royal Jelly thiamine in colonies fed 400 ppm B<sub>1</sub> (2.7 mg/100 g) was higher than any other colony ( $P < 0.05$ ). Thiamine content of royal jelly in the control group (0.67 mg/100 g) had the lowest amount ( $P < 0.05$ ). In general, the nutrition of different levels of thiamine in spring season showed that the HPGs had more growth at 6 and 9 days of age. Also with increasing thiamine consumption in the colony, the thiamine content in royal jelly was also increased. In this experiment, feeding 400 ppm of thiamine improved the surface of HPGs growth and increased the amount of royal jelly thiamine.

**Key words:** Thiamine, honey bee, hypopharyngeal glands, royal Jelly.