Iranian Journal of Biological Sciences.2023; 18(3):69-80

Orginal Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

The Effect of Organic Selenium Supplementation on Larvae Acceptance Rate, Royal Jelly Production, Body Antioxidant Status and the Relative Expression of *hsp90* Gene in Honey Bee Under Heat Stress

Khalil Rasoli-Nadergoli[1], Ali Asghar Sadeghi[2*], Parvin Shawrang[3], Mohammad Chamani[4]

1. PhD student, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associate professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, Karaj, Iran
4. Full professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran

.Place of Research: Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Article History:

Recived 09.29.2023
Revised 12.16.2023
Accepted 03.02.2024
Online 07.06.2024

KeyWords:

Royal jelly,
antioxidant capacity,
gene expression,
heat shock protein,
nurse bee

***Corresponding author:**
E-mail address

xalilrasoly@yahoo.com
aasdghi@gmail.com
pshawrang@nrcam.org
m.charnani@gmail.com

Abstract

Introduction: In the hot seasons and in tropical regions, it is necessary to feed supplements that increase honey bees tolerance to heat stress. Due to its active role in the structure and activity of enzymes, selenium has positive effects on heat tolerance. There are different types of selenium supplements, the bioavailability of organic form is higher than other forms.

Aim: This study was done to evaluate the effects of organic selenium supplementation on larval acceptance rate, amount of royal jelly produced, antioxidant status of body and the relative expression of *hsp90* gene in honey bees under heat stress.

Materials and Methods: 20 colonies were kept in the plain region (Kianmehr, Karaj) and 20 colonies were moved to the mountainous region of Senj (Saujbolag, Alborz Province). A 2x2 factorial trial was conducted based on completely randomized design, and the location (plain or mountain) and syrup (without or containing 50 µg of organic selenium per liter) considered as factor levels. By collecting samples from nurse bees on royal jelly plastic bars, nurse bees› body weight, body fat and protein percentage, total antioxidant capacity, concentration of malondialdehyde, alanine transferase and aspartate transferase enzymes, and heat shock protein gene expression were measured. The acceptance rate of larvae and the amount of royal jelly produced were determined three days after grafting the larvae in plastic cups. The relative gene expression of *hsp90* was determined using RT-PCR technique.

Results: Colonies located in the mountains and colonies receiving organic selenium had a higher percentage of larva acceptance ($P<0.05$). The amount of royal jelly produced was not affected by the location and the organic selenium supplementation. The nurse bees in the mountainous region who received syrup containing organic selenium supplement had the highest antioxidant capacity, the lowest concentration of malondialdehyde and transferase enzymes, and the nurse bees in the plain region who received syrup without organic selenium supplement had the lowest antioxidant capacity and the highest concentration of malondialdehyde and transferase enzymes ($P<0.04$). The expression of *hsp90* gene in the body of bees located in the plain region was higher (2.5 times) than in the mountain region, and the organic selenium supplemented in the mountain region had no effect on the gene expression, but in the plain region, it had a down-regulating effect (%30 in comparison to bees not received supplement in plain).

Conclusion: The results of this study showed that heat stress has adverse effects on the antioxidant capacity of nurse bees and has the most detrimental effect on the acceptance rate of grafted larvae. The selenium supplementation at dose 50 µg/L syrup increases the acceptance rate of larvae, which can affect the amount of royal jelly production.

Cite this article: Rasoli-Nadergoli K., Sadeghi A.A.*, Shawrang P., Chamani M.The effect of organic selenium supplementation on larvae acceptance rate, royal jelly production, body antioxidant status and the relative expression of *hsp90* gene in honey bee under heat stress. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):69-80

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

اثر مکمل سلنیوم آلی بر میزان پذیرش لارو، مقدار ژله رویال تولیدی، وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و بیان نسبی ژن *hsp90* در زنبور عسل تحت تنش گرمایی

خلیل رسولی نادرگلی[۱]، علی اصغر صادقی[۲*]، پروین شورنگ[۳]، محمد چمنی[٤]

۱ .دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

۲ .دانشیار، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

۳ .دانشیار، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج ، ایران

٤ .استاد، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱٤۰۲/۰۷/۱۷
بازنگری ۱٤۰۲/۰۹/۲۵
پذیرش ۱٤۰۳/۱۲/۱۲
نمایه ۱٤۰۳/۰٤/۱٦

کلمات کلیدی
ژله رویال
ظرفیت آنتی اکسیدانی
بیان ژن
پروتئین شوک گرمایی
زنبور پرستار

* **نویسنده مسؤل**

xalilrasoly@yahoo.com
aasdghi@gmail.com
pshawrang@nrcam.org
m.charnani@gmail.com

چکیده

مقدمه: در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیری لازم است به زنبور عسل مکمل هایی داده شود که مقاومت بدن آنها را به تنش گرمایی افزایش دهد. سلنیوم به دلیل داشتن نقش فعال در ساختمان و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی می تواند در این زمینه موثر عمل کند. انواع مکمل سلنیوم وجود دارد که فرم آلی آن زیست فراهمی بهتری دارد.

هدف: پژوهش کنونی با هدف مطالعه اثرات مکمل سلنیوم آلی بر میزان پذیرش لارو، مقدار ژله رویال تولیدی، وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و بیان نسبی ژن *hsp90* در زنبور عسل تحت تنش گرمایی انجام شد.

مواد و روش ها: تعداد 20 کلنی در منطقه دشت (کیانمهر کرج) و 20 کلنی به منطقه کوهستانی سنج (ساوجبلاغ) کوچ داده شد. آزمون فاکتوریل 2×2 در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد و محل استقرار (دشت یا کوهستان) در دو سطح و شربت (فاقد یا حاوی 50 میکروگرم سلنیوم آلی در لیتر) در دو سطح و در ده تکرار اجرا شد. با نمونه برداری از زنبورهای پرستار بر روی تیرک های ژله گیری، وزن بدن زنبورهای پرستار و درصد چربی وپروتئین بدن، کل ظرفیت آنتی اکسیدانی، غلظت مالون دی آلدئید و آنزیم های آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز و بیان ژن پروتئین شوک گرمایی اندازه گیری شد. میزان پذیرش لارو و مقدار ژله رویال تولیدی سه روز پس از پیوند زدن لارو در چاهک های پلاستیکی مخصوص تولید ژله رویال تعیین شد. بیان ژن *hsp90* با تکنیک RT-PCR تعیین شد.

نتایج: کلنی های مستقر در کوهستان و کلنی های دریافت کننده سلنیوم آلی درصد بالاتری پذیرش لارو داشتند ($P<0.05$). مقدار ژله رویال تولیدی تحت تاثیر منطقه نگهداری کلنی ها و افزودن مکمل سلنیوم آلی قرار نگرفت. زنبورهای پرستار در منطقه کوهستانی که شربت حاوی مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی، کمترین غلظت مالون-دی آلدئید و آنزیم های ترانسفرازی داشتند و زنبورهای پرستار در منطقه دشت که شربت فاقد مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی، بیشترین غلظت مالون دی آلدئید و آنزیم های ترانسفرازی را داشتند. ($P<0.04$). بیان ژن *hsp90* در بدن زنبورهای مستقر در منطقه دشت 5/2 برابر بیشتر از منطقه کوهستانی بود و افزودن سلنیوم آلی در منطقه کوهستان بر بیان ژن بی تاثیر و در منطقه دشت اثر کاهندگی (30 درصد کاهش نسبت به زنبورهای دشت بدون مکمل) داشت.

نتیجه گیری: تنش گرمایی دارای اثرات نامطلوب بر ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورهای پرستار است و بیشترین اثر منفی را بر میزان پذیرش لارو پیوند شده بر جای می گذارد. افزودن سلنیوم آلی با دوز 50 میکروگرم در لیتر شربت سبب افزایش میزان پذیرش لارو می-شود که می تواند بر مقدار تولید ژله رویال موثر واقع شود.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : رسولی نادرگلی خ.، علی اصغر صادقی الف.الف.*، شورنگ پ.، چمنی م. اثر مکمل سلنیوم آلی بر میزان پذیرش لارو، مقدار ژله رویال تولیدی، وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و بیان نسبی ژن *hsp90* در زنبور عسل تحت تنش گرمایی. مجله دانش زیستی ایران. ۱٤۰۲؛ ۱۸ (۳):۶۹-۸۰

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا **شاپا چاپی:** ۱۷۳۵-٤۲۲٦ **شاپا الکترونیکی:** ۲۷۱۷-٤۵۹X **نویسندگان:** © حق مؤلف

مقدمه:

پرورش دهندگان زنبور عسل که در زمینه تولید عسل طبیعی فعالیت می کنند پس از افزایش جمعیت زنبورها طی اوایل بهار، کلنی های خود را به مناطق کوهستانی و دارای آب و هوای معتدل کوچ می دهند. دلیل کوچ دادن کندوها افزایش دمای محیط در اواخر بهار و تابستان و اثرات منفی گرما بر فعالیت زنبورهای عسل است (۱). تولیدکنندگان ژله رویال در تابستان کندوها را به مناطق کوهستانی کوچ نمی دهند و در مناطق دشت با تغذیه شربت و کیک گرده به فعالیت تولیدی می پردازند. به دلیل افزایش دمای هوا طی ساعات میانی روز فعالیت اصلی بیشتر زنبورهای کارگر آب آوری است و در بیشتر مناطق دمای هوا به قدری بالا است که آب کافی برای خنک کردن محیط پرورش نوزادان تامین نمی شود (۲، ۳). در این شرایط کلنی زنبور عسل با تنش گرمایی رو به رو می شود (٤). لاروها در کلنی هایی که در معرض تنش گرمایی قرار دارند، به دلیل تامین نشدن آب و مواد مغذی مورد نیاز با تنش تغذیه ای نیز رو به رو می شوند و لارو کافی برای پیوند زدن در قاب ها یافت نمی شود و فعالیت تولید ژله رویال با مشکل رو به رو می شود (۵). در بدن زنبور عسل تحت تنش گرمایی، تولید رادیکال های آزاد افزایش می یابد و برای خنثی کردن رادیکال های آزاد و به حداقل رساندن اثر تنش ها بر بدن زنبور و عملکرد کلنی تامین مواد آنتی اکسیدانی یا کمک به عوامل افزایش دهنده ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن ضروری است (۳). گرده گل تازه حاوی رنگدانه های متعدد می تواند نیاز زنبورها به مواد آنتی اکسیدانی را برطرف کند، ولیکن در هوای گرم فعالیت زنبورهای کارگر به حداقل می رسد و از طرفی تراکم گیاهان گل دار کم می شود. تولیدکنندگان ژله رویال برای تأمین مواد آنتی اکسیدانی به کلنی های زنبور عسل کیک گرده می دهند. گرده مورد استفاده در این مراکز تولید ژله رویال عمدتا چند ماه از جمع آوری آن گذشته و به طور صحیح خشک و انبارداری نمی شود که این موضوع سبب از بین رفتن مواد آنتی اکسیدانی گرده می شود (۲). بنابراین ضرورت دارد در این مواقع مواد آنتی اکسیدان کمکی به کیک گرده یا شربت افزوده شود (٦).

سلنیوم از جمله مواد معدنی ضروری برای رشد و سلامت زنبورهای عسل است و در ساختار آنزیم های آنتی اکسیدانی نقش دارد . سلنیوم جزء مهمی از ساختار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است و در فعالیت آنزیم های گلوتاتیون پراکسیداز و تیوردوکسین ردوکتاز نقش کاتالیزوری دارد و در خنثی کردن اثرات منفی پراکسیدازهای حاصل از اکسیداسیون لیپید در سلول ها بسیار موثر است. منبع معمول سلنیوم مورد استفاده در خوراک حیوانات سلنیت سدیم است. این منبع غیرآلی سلنیوم به طور نسبی قابلیت ابقاء کمی دارد (۷). اخیرا از شکل های آلی سلنیوم مانند: سلنوسیستئین، سلنومتیونین، یا مخمر غنی از سلنیوم، به عنوان مکمل سلنیوم استفاده می شود. سلنیوم آلی منبع خوبی از سلنیوم است، زیرا در مقایسه با سلنیت سدیم که به صورت انتشار غیر فعال جذب می شود سلنیوم آلی به شکل فعال از روده جذب می شود (۸).

در منابع علمی منتشر شده، اثرات تنش گرمایی بر فراسنجه های عملکردی کلنی ها مطالعه شده است (۹، ۱۰)، ولیکن تاکنون اثر تنش گرمایی و تغذیه شربت بدون و حاوی مواد آنتی اکسیدانی بویژه سلنیوم آلی در زنبور عسل مطالعه نشده است. اثر نانوسلنیوم و سلنیوم آلی بر بیان ژن hsp۷۰ در زنبورهای کارگر مطالعه شده است (٤)، و اثر تنش گرمایی و سلنیوم آلی بر بیان ژن موثر بر مقاومت گرمایی (*hsp90*) در زنبور عسل تولیدکننده ژله رویال مورد مطالعه قرار نگرفته است. پروتئین شوک گرمایی ۹۰ سبب حفظ ساختار سه بعدی پروتئین در سیتوپلاسم سلول ها در شرایط تنش گرمایی می شود و از این طریق مانع از واسرشتی پروتئین ها و مقاومت بدن جانوران می شود (۱۱، ۱۲). پروتئین شوک گرمایی انواع مختلفی دارد و با توجه به اندازه مولکول به نوع ۷۰ و ۹۰ کیلودالتون نامگذاری شده اند و تفاوتی در عمل این دو پروتئین شوک گرمایی وجود ندارد (۳، ۱۱).

فرضیه این تحقیق این است که کلنی هایی که در فصل گرما در منطقه دشت نگهداری می شوند در صورت دریافت شربت حاوی سلنیوم آلی با کلنی های مستقر شده در منطقه کوهستانی از نظر وضعیت آنتی اکسیدانی بدن، تولید ژله رویال و بیان ژن پروتئین شوک گرمایی تفاوتی ندارند. هدف از انجام پژوهش کنونی، تعیین اثر تنش گرمایی و شربت بدون و حاوی سلنیوم آلی بر پذیرش لارو پیوند شده، مقدار تولید ژله رویال، وضعیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن پروتئین شوک گرمایی بود.

مواد و روش ها

تیمارهای و طرح آزمایشی

این پژوهش در زنبورستان تحقیقاتی در دو مرحله مزرعه ای و آزمایشگاهی طی اواخر خرداد و اوایل تیرماه ۱۴۰۲ 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 لی و همکاران (۱۳)، آزمایش مزرعه ای در مکانی آفتابگیر با دمای ۳±۳۹ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۸ درصد به مدت حداقل ٤ ساعت در روز از ساعت ۱۱ تا ۳ عصر ایجاد شد. در منطقه کوهستانی دمای روز ۲±۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت ٦۲ درصد بود. تعداد ٤۰ کلنی زنبور عسل نژاد بومی (Apis mellifera meda) انتخاب و ملکه ها از نظر سلامتی و تخمگذاری بررسی و جمعیت کلنی ها در شروع آزمایش یکسان سازی و سپس برای تولید ژل رویال ساماندهی شدند. ملکه های کلنی های مورد استفاده از پایه مادری یکسان بودند (ملکه اصلاح نژاد شده موسسه علوم دامی) و به صورت جفتگیری طبیعی در اوایل بهار سال ۱۴۰۲ بارور شده بودند. برای یکسان سازی نوزادان، با حفظ جمعیت زنبورهای موجود در هر کلنی، قاب های حاوی تخم روز و لارو و شفیره موجود در کندوها خارج و به جای آن پوکه تازه قرار داده شد. در ضمن به طور مساوی دو قاب عسل و گرده به عنوان ذخیره غذایی در کندوها قرار داده شد. با توجه به طرح آزمایشی به طور تصادفی ۲۰ کلنی در منطقه کیانمهر باقی ماند و ۲۰ کلنی به منطقه سنج کوچ داده شد. آزمون فاکتوریل ۲ × ۲ در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد و محل استقرار (دشت یا کوهستان) در دو سطح و شربت (فاقد یا حاوی ۵۰ میکروگرم در لیتر سلنیوم) از منبع سلنیوم آلی با نام تجاری Selplex(۲۵ میلی گرم در لیتر؛ هر گرم حاوی ۲۰۰۰ میکروگرم سلنیوم) در دو سطح و در ده تکرار اجرا شد. به هر کلنی در روز یک لیتر شربت فاقد یا حاوی سلنیوم آلی داده می شد. به کلنی های هر دو منطقه کیک گرده با ترکیب یکسان داده می شد. کندوهای مورد استفاده از نوع کف باز و مجهز به گرده گیر داخلی بود. در هر دو منطقه با نصب صفحه گرده گیر از ورود گرده به داخل کلنی جلوگیری شد. برای اندازه گیری وسعت تخمگذاری ملکه در روز ۲۰ آزمایش، از قاب مشبک شده دارای مربع های استاندارد ۵×۵ سانتی متر که کل قسمت های یک شان را می پوشاند استفاده شد. تعداد مربع های حاوی تخم شمارش شده و مساحت مورد نظر نیز محاسبه شد. با روش پیوند زدن، طی سه مرحله ژله رویال تولید شد و در مرحله سوم رکوربرداری میزان پذیرش لارو و مقدار تولید ژله رویال در هر سلول پلاستیکی انجام شد. زنبورهای روی تیرک های مرحله سوم در سطل تکانده شد و یک فنجان زنبور برداشته و وزن بدن زنبورهای پرستار هر کلنی (۱۰۰ زنبور) پس از بیهوش کردن با دی اکسید کربن با ترازوی دقیق (Tokyo, Japan ,AND Scale GE۲۲۰) اندازه گیری و میانگین آن محاسبه شد (۱٤) و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا آنالیز ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و بیان ژن نگهداری شد (۱۵، ۱٦).

ترکیبات شیمیایی و سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن

ماده خشک لاشه زنبورها با استفاده از آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس تعیین شد. نمونه ها پس از خشک شدن در آون به دسیکاتور منتقل شده و پس از سرد شدن توزین شد. اندازه گیری وزن نمونه ها قبل و بعد از خشک شدن با ترازوی دیجیتال (Tokyo, Japan ,AND Scale GE۲۲۰) با دقت ۰/۰۰۱ گرم انجام شد. درصد چربی و پروتئین بدن زنبورهای نمونه برداری شده به ترتیب با استفاده از روش سوکسله و کلدال تعیین شد (۱۷). سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورها با روش Benzie and Strain (۱۸) انجام شد. برای تعیین مقدار مالون دی آلدئید از روش تیوباربیتوریک اسید استفاده شد (۱۹). فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز با کیت شرکت کورمی (لابلین، لهستان) اندازه گیری شد.

آنالیز بیان ژن

لاشه زنبورها پس از بیرون آوردن از فریزر، در مقدار کمی نیتروژن مایع به طور کامل منجمد و با استفاده از هاون چینی پودر شد و سپس در بافر لیزکننده همگن شد. با استفاده از کیت تجاری (شرکت Bioneer، سئول،

کره جنوبی) RNA کل بنابر دستورالعمل سازنده استخراج شد. برای تعیین فراوانی نسبی mRNA ژن پروتئین شوک گرمایی (*hsp90*) با استفاده از real time-qPCR بنابر روش صاحب‌زاده و همکاران (۲۰) 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 (Qiagen، Hilden، آلمان) انجام شد. پرایمرهای *hsp90* و بتا اکتین (جدول ۱) با استفاده از اطلاعات NCBI و توالی های گزارش شده قبلی (۲۱) طراحی شدند و برای نرمال سازی، بتا اکتین به عنوان ژن خانه دار استفاده شد. نسبت بیان نسبی ژن *hsp90* به عنوان ژن هدف به ژن بتا اکتین بر اساس روش Livak and Schmittgen (۲۲) نرمال شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۲ با دو عامل شامل منطقه (دشت یا کوهستان) و شربت (فاقد یا حاوی سلنیوم آلی) انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده ها قبل از آنالیز واریانس از آزمون Shaapiro-Wilk استفاده شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. (۲۳).

جدول ۱: پرایمرهای ژن های هدف و خانه دار

ژن‌های هدف	توالی‌های پرایمرها	اندازه (جفت باز)
Heat Shock protein 90 (*hsp90*)	F-5'-CTTGCCTTACTGAGCGACGA-3' R-5'-TATCCTGAACGTCAGCTCC-3'	۱۳۳
β-actin	F-5'- TGCCAACACTGTCCTTTCTG-3' R-5'- AGAATTGACCCACCAATCCA-3'	۱۴۰

نتایج

اثرات اصلی و متقابل منطقه و افزودن مکمل سلنیوم آلی بر وزن و ترکیب شیمیایی بدن زنبورهای پرستار، سطح تخمگذاری ملکه، درصد پذیرش لارو و مقدار ژله رویال تولیدی در جدول ۲ گزارش شده است. اثر منطقه نگهداری کلنی ها بر وزن بدن زنبور پرستار معنی دار بود و اثر اصلی مکمل سلنیوم آلی بر وزن بدن زنبورهای پرستار معنی دار نبود. اثر متقابل منطقه و مکمل سلنیوم آلی بر وزن بدن زنبورهای پرستار معنی دار نبود. اثرات اصلی و متقابل منطقه و مکمل سلنیوم آلی بر چربی بدن معنی دار نبود. پروتئین بدن زنبورهای پرستار تحت تاثیر منطقه قرار نگرفت ولی مکمل سلنیوم آلی سبب افزایش معنی دار درصد پروتئین بدن زنبورهای پرستار شد. اثرات متقابل منطقه و مکمل سلنیوم آلی بر درصد پروتئین بدن معنی دار نبود. سطح تخمگذاری ملکه در کوهستان بیشتر از دشت ($P<0.02$) و در کلنی های دریافت کننده مکمل سلنیوم آلی بیشتر ($P<0.01$) از کلنی های دریافت کننده شربت فاقد سلنیوم آلی بود. اثر متقابل منطقه نگهداری و نوع شربت بر تخمگذاری ملکه معنی دار نبود ($P<0.05$). اثرات اصلی و متقابل منطقه و مکمل سلنیوم آلی بر میزان پذیرش لارو معنی دار بود. کلنی های مستقر در کوهستان درصد بالاتری پذیرش لارو نسبت به کلنی های مستقر در دشت داشتند. تغذیه مکمل سلنیوم آلی سبب افزایش میزان پذیرش لارو شد. با توجه به اثرات متقابل، کلنی های مستقر در کوهستان که شربت دارای مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند بیشترین درصد پذیرش لارو داشتند و کلنی های مستقر در دشت که شربت فاقد

مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند کمترین درصد پذیرش لارو را داشتند. مقدار ژله تولیدی در هر سلول تحت تاثیر منطقه نگهداری کلنی ها و افزودن مکمل سلنیوم آلی قرار نگرفت.

جدول ۲: اثر منطقه و سلنیوم آلی بر وزن و ترکیب شیمیایی بدن زنبورهای پرستار، پذیرش لارو و مقدار ژله رویال تولیدی

فراسنجه‌های مورد بررسی	عوامل تغییر				اشتباه معیار	سطح احتمال معنی‌داری		
	منطقه		شربت					
	دشت (گرم)	کوهستان (خنک)	بدون سلنیوم آلی	حاوی سلنیوم آلی		منطقه	شربت	اثر متقابل
وزن بدن (میلی گرم)	۱۲۱^{a}	۱۱۹^{b}	۱۲۰	۱۱۹	۰/۶۲	۰/۰۲	۰/۲۸	۰/۹۹
چربی بدن (درصد)	۷/۵۸	۷/۶۰	۷/۵۳	۷/۶۵	۰/۰۷	۰/۸۰	۰/۱۰	۰/۴۶
پروتئین بدن (درصد)	۴۶/۵۳	۴۵/۶۷	۴۶/۹۱	۴۵/۳۸	۱/۲۱	۰/۴۴	۰/۱۹	۰/۷۸
کل سطح تخمگذاری ملکه (سانتیمتر مربع)	۵۹۰۴^{b}	۶۰۵۹^{a}	۵۸۱۵^{b}	۶۱۴۸^{a}	۵۸/۷	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۳۴
میزان پذیرش لارو (درصد)	۷۴/۵۰^{b}	۸۲/۱۶^{a}	۷۲/۵۰^{b}	۸۴/۱۴^{a}	۱/۲۳	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
مقدار ژله تولیدی در هر سلول	۸۳/۶۲	۸۴/۸۳	۸۳/۰۹	۸۵/۳۱	۱/۱۵	۰/۲۵	۰/۰۶	۰/۵۵

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

جدول ۳: اثر منطقه و افزودن سلنیوم آلی به شربت بر وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و فعالیت آنزیم های آمینوترانسفراز

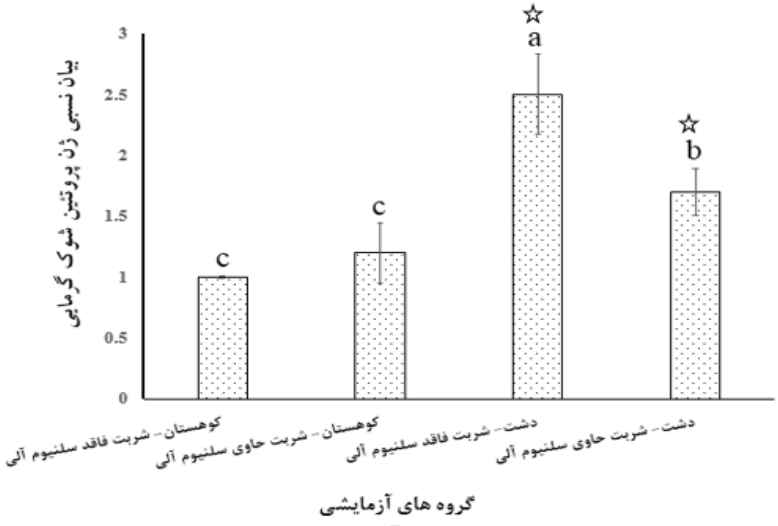
فراسنجه	عوامل تغییر				اشتباه معیار	سطح احتمال معنی‌داری		
	منطقه		شربت					
	دشت (گرم)	کوهستان (خنک)	بدون سلنیوم آلی	حاوی سلنیوم آلی		منطقه	شربت	اثر متقابل
ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (میلی مول Trolox)[1]	۴/۷۱^{b}	۵/۱۵^{a}	۴/۳۹^{b}	۵/۴۲^{a}	۰/۱۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۶
مالون دی آلدئید (نانومول بر میلی گرم پروتئین)	۲/۸۴^{a}	۱/۶۷^{b}	۲/۹۴^{a}	۱/۵۶^{b}	۰/۰۷۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد در گرم وزن بدن)[2]	۱۷۷/۲^{b}	۲۰۲/۳^{a}	۱۸۳/۰^{b}	۱۹۶/۲^{a}	۵/۱۲	۰/۰۰۱	۰/۰۲	۰/۱۹
آلانین آمینوترانسفراز (واحد در هر گرم وزن بدن)[2]	۷۵/۳^{b}	۸۶/۱^{a}	۷۷/۴^{b}	۸۵/۳^{a}	۲/۰۸	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲

در هر ردیف برای منطقه یا شربت تفاوت میانگین های با حروف غیر مشابه معنی دار است (P<۰/۰۵)

[1] میلی مول غلظت ترلکس که ظرفیت آنتی اکسیدانی معال یک میلی مولار از نمونه مورد بررسی را دارد.

[2] واحد بین المللی(International Unit) در هر گرم وزن محاسبه شده است و فعالیت آنزیمی است و هر واحد آن معادل یک میکرومول NADH مصرف شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس می باشد

در جدول ۳ وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و فعالیت آنزیم های ترانس آمیناز در بدن زنبورهای پرستار گزارش شده است. اثرات اصلی منطقه نگهداری و افزودن مکمل سلنیوم آلی به شربت بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بدن زنبورها معنی داری بود(P<0.004) و اثر متقابل تمایل به معنی داری داشت(P<0.06).



شکل ۱: بیان نسبی ژن پروتئین شوک گرمایی در بدن زنبورهای مستقر در دشت یا کوهستان و دریافت کننده شربت فاقد یا حاوی سلنیوم آلی(P<0.05). ستون های ستاره دار تفاوت معناداری نسبت به یکدیگر دارند.

بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن در زنبورهای منطقه کوهستان و زنبورهایی که سلنیوم آلی دریافت کردند مشاهده شد و زنبورهای دشت و زنبورهای دریافت کننده شربت فاقد سلنیوم آلی ظرفیت آنتی کسیدانی کمتری داشتند (P<0.001). با توجه به معنی دار شدن اثرات متقابل، زنبورهای پرستار در منطقه کوهستانی که شربت حاوی مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند بیشترین و زنبورهای پرستار در منطقه دشت که شربت فاقد مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را داشتند. اثرات اصلی و متقابل منطقه نگهداری و مکمل سلنیوم آلی بر غلظت مالون دی آلدئید معنی دار بود. زنبورهای مستقر در دشت و زنبورهایی که شربت فاقد سلنیوم آلی دریافت کردند غلظت مالون دی آلدئید بیشتری داشتند (P<0.001). اثر متقابل بین منطقه و نوع شربت برای غلظت مالون دی آلدئید مشاهده شد و بیشترین و کمترین غلظت به ترتیب در کلنی های مستقر در دشت بدون دریافت مکمل و منطقه کوهستانی با دریافت مکمل مشاهده شد. اثرات منطقه نگهداری و مکمل سلنیوم آلی بر فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز معنی-دار بود (P<0.001). زنبورهای مستقر در منطقه کوهستان نسبت به زنبورهای مستقر در دشت و زنبورهای دریافت کننده مکمل سلنیوم آلی نسبت به زنبورهای دریافت کننده شربت فاقد مکمل سلنیوم آلی بیشترین فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز داشتند(P<0.01). اثرات متقابل منطقه و شربت برای آسپارتات آمینوترانسفراز معنی دار نبود ولی برای آنزیم الانین آمینوترانسفراز معنی دار بود. زنبورهایی که در کوهستان مستقر بودند و شربت حاوی مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند بیشترین و زنبورهای مستقر در دشت

کـه شربت فاقد مکمل سـلنیوم آلـی دریافت کردنـد کمترین فعالیـت آنزیم آلانین آمینوترانسـفراز داشـتند (P<0.01). بیان نسـبی ژن پروتئین شـوک گرمایی ۹۰ در شـکل ۱ نشـان داده شده اسـت. زنبورهای مسـتقر در کوهسـتان که شربت فاقـد سـلنیوم آلـی دریافت کردند بـه عنوان کنـترل خارجی در نظـر گرفته شـدند و مقایسـه بقیـه تیمارها بـا آن انجام شـد. تفاوت معنـی داری بین بیان نسـبی ژن پروتئین شـوک گرمایـی زنبورهای مسـتقر در کوهسـتان که شربـت فاقد یا حاوی سـلنیوم آلی دریافت کردند مشـاهده نشـد. زنبورهای مسـتقر در منطقه دشـت که شربـت فاقد یا حاوی سـلنیوم آلـی دریافت کردند بیـان نسـبی ژن پروتئین شـوک گرمایی بیشـتری (۲/۵ برابر) نسبت به زنبورهای مسـتقر در کوهستان داشـتند(P<0.05). بـا افزودن مکمل سـلنیوم آلـی به شربت کلنی های مسـتقر در دشـت بیان نسـبی ژن پروتئین شـوک گرمایـی کاهـش معنـی داری(P<0.05) (۳۰ درصد نسـبت به زنبورهای دشـت بـدون دریافت مکمـل) یافت.

بحث

وزن بدن زنبورهای پرسـتار یکی از شـاخص های مهم وضعیت متابولیکی و فیزیولوژیکی اسـت و نشـاندهنده وضعیت ذخیره انـرژی و پروتئین بدن اسـت (۲٤). وزن بدن زنبور پرسـتار به عوامـل مختلفی بویژه نـژاد، وضعیت تغذیـه و میزان فعالیت بسـتگی دارد (۳). در کلنی هایی که پـرورش لارو زیادی وجود دارد و فعالیـت تولیـد ژله رویـال انجام می شـود وزن بدن زنبورهای پرسـتار بـه دلیل اسـتفاده از ذخایـر بدنی کاهش مـی یابد و هـر چه فعالیـت کمتر باشـد وزن بـدن زنبورها افزایـش مـی یابـد (۲). Winston (۲٤) گزارش کـرد که وزن بدن زنبور پرسـتار بیـن ۱۰۰ تا ۱٦۰ میلی گرم متغیر اسـت. در مطالعه حـاضر میانگین وزن زنبورهای پرسـتار بین ۱۱۸ تا ۱۲۲ میلی گرم بود کـه در دامنه گـزارش Winston (۲٤) قرار دارد. وزن زنبورهای پرسـتار در کلنی های مسـتقر در کوهسـتان به طـور معنـی داری کمـتر از وزن زنبورهای پرسـتار کلنی های مسـتقر در دشـت بود که دلیل ایـن تفاوت به تنـش گرمایی مربوط می باشـد. زنبورهای پرسـتار در کلنی های مسـتقر در کوهسـتان فعالیت بیشـتری داشـتند که این موضوع در درصد پذیرش لارو پیوند شـده نمایان شـد.

با افزایـش فعالیت زنبورهای پرسـتار ذخایر بـدن صرف تولید ژله رویـال می شـود و تولید ایـن محصول به قـدری انرژی و پروتئیـن زیـاد نیاز دارد کـه از طریق تغذیـه زنبورها جبران نمی شـود و بدن زنبـور پرسـتار در تعـادل منفـی انرژی و پروتئیـن قرار می گیـرد (۲). در ایـن شرایط ذخایـر انرژی و پروتئیـن بدن کـه در زیر کوتیکـول به صـورت بافت چربی اسـت و حـاوی لیپوپروتئیـن به نـام ویتلوژنین اسـت مورد اسـتفاده قرار می گیرد. کلنی های مسـتقر در دشـت با تنش گرمایی رو به رو بودند و در سـاعات میانـه روز گرمای کندوها در حـدی زیاد بود که بیشـتر جمعیت زنبورهـا از روی قاب ها بـه زیـر در کنـدو و دیواره ها رفتـه بودند. دلیل ایـن رفتار کـم کردن گرمای سـاطع شـده از بدن آنها بـر روی قاب های حاوی نـوزادان و ایجاد عایـق برای جلوگیـری از ورود گرما به درون کندو می باشـد (۲۵).

در شرایـط تنش گرمایی کـه در زنبور در دمـای محیطی بالاتر از ۳٤ درجه سلسـیوس شروع می شـود آب آوری و حرکات بال نمی تواند سـبب خنک کـردن منطقه پرورش نوزادان شـود به همیـن دلیـل زنبورها به کف کنـدو و دیواره هـا می روند تا دمـای بدن انها سـبب افزایش دمـای منطقه پـرورش نوزادان نشـود و گروه کمـتری در آن منطقه فعالیت تغذیـه لاروها و عملیـات خنک کردن محل پـرورش را انجـام می دهند (۲، ۵). کاهـش فعالیت زنبورها کـه در کاهش پذیـرش لاروهای پیوند شـده نیـز نمایان شـد و کمی تحرک سـبب اسـتفاده کمتر از ذخایـر بدن بـرای تولید ژله رویـال و تغذیـه لاروهای درون کلنـی شـد و این موضوع سـبب حفـظ وزن بـدن زنبورهای پرستار شـده است.

شـایان ذکر اسـت. مکمل سـلنیوم آلی بر وزن بـدن و درصد چربی و پروتئین بدن زنبورهای پرسـتار اثر معنی داری نداشت، هـر چند از نظر عـددی وزن بـدن زنبورهـای دریافت کننده سـلنیوم کمتر از گروهی بود که سـلنیوم دریافـت نکردند. به

نظر می رسد سلنیوم با افزایش ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل و کاهش سطح مالون دی آلدئید شرایط بدن زنبورهای پرستار و اشتهای آنها را برای تغذیه بیشتر از کیک مهیا کرده و تعادل منفی انرژی و پروتئین کمتری ایجاد شده است. مکمل سلنیوم آلی سبب افزایش درصد پذیرش لارو و فعالیت بیشتر در تغذیه لاروهای درون کلنی شد با توجه به غعالیت بیشتر ملکه برای تخمگذاری، با این حال سبب کاهش معنی دار وزن زنبورهای پرستار نشد. این موضوع نشان می دهد زنبورهای دریافت کننده سلنیوم تغذیه بهتری داشته اند و از ذخایر بدن کمتر استفاده کرده-اند.

سطح تخمگذاری ملکه ها تحت تاثیر منطقه و نوع شربت قرار گرفت و اثر متقابل بین این دو عامل معنی دار نبود. سطح تخمگذاری ملکه زنبور عسل تحت تاثیر تغذیه، شرایط محیطی و وسعت لاروها قرار دارد. در کلنی های مستقر در کوهستان به دلیل 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 می شود و زنبورهای ملازم با تولید ژله رویال و خوراندن آن به ملکه شرایط تخمگذاری بیشتر را فراهم می کنند (۲). با وارد شدن سلنیوم آلی در شربت و تغذیه از آن، ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن این زنبورها افزایش یافته و توانسته اند 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 تغذیه ای و فیزیولوژیکی (فرومون لاروها) را برای فعالیت ملکه و تخمگذاری بیشتر فراهم می کنند (۲۱). وجود فرومون لاروها ملکه را به تخمگذاری بیشتر ترغیب می کند و هر چه لاروها بهتر تغذیه شوند فرومون بیشتری تولید می کنند و ملکه به تخمگذاری بیشتر ترغیب می شود (۲، ٦).

عنصر سلنیوم برای فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان کوفاکتور لازم است (۲٦). با فعالیت این آنزیم قدرت آنتی اکسیدانی بدن افزایش و غلظت مالون دی آلدئید کاهش می یابد.

در گرده گل مقداری سلنیوم وجود دارد ولی وجود عوامل کیلات کننده مانع جذب آن می شود از طرفی طول دستگاه گوارش زنبور کوتاه و توانایی جذب آن کم است (۲۷). در بدن زنبور نیز ذخیره سلنیوم کم می باشد. به همین دلیل باید روزانه مقدار کافی سلنیوم برای بدن تامین شود. با افزودن سلنیوم آلی به شربت، بخش عمده سلنیوم جذب بدن می شود و مورد استفاده بافت ها قرار می گیرد. غدد آسینی که ژله رویال تولید می کنند نیاز زیادی به سلنیوم دارند و تامین سلنیوم سبب حفظ اندازه این غدد و فعالیت حداکثری آن می شود و از این طریق تغذیه لاروها و ملکه زنبور عسل به خوبی انجام می شود که در نهایت سبب افزایش تخمگذاری ملکه می شود (۲).

بنابر تحقیقاتی که اخیرا انجام شده است عنصر سلنیوم برای تولید ویتلوژنین مورد نیاز است (۲۸). در بدن زنبور عسل این پروتئین یک آنتی اکسیدان قوی است. افزایش یافتن کل ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورهای مستقر در منطقه کوهستانی یا تغذیه شده با شربت حاوی سلنیوم آلی به افزایش ساخت ویتلوژنین مربوط می شود. ویتلوژنین یک فسفولیپو پروتئین است که در تخم و بدن زنبورعسل نقش های 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، زنده مانی و ایمنی بدن موثر است (۲۹).

فعالیت آنزیم های ترانسفراز در بدن زنبورهای کوهستان بیشتر از دشت و فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در بدن زنبورهای تغذیه شده با شربت حاوی سلنیوم آلی بیشتر از زنبورهای تغذیه شده با شربت فاقد سلنیوم بود. در شرایط تنش، فعالیت‌های آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز بسیار مهم هستند زیرا برخلاف پستانداران فعالیت این آنزیم ها بر سلامتی و عمر زنبور عسل موثرند. در پستانداران، افزایش فعالیت های آنزیم های مذکور نشان دهنده بیماری مزمن، تغییرات پاتولوژیک و مسمومیت کبدی است. برعکس، کاهش فعالیت این آنزیم ها در زنبورهای عسل با بیماری و شرایط پاتولوژیک مرتبط است (۳۰، ۲۹) حشرات کبد ندارند و فقط یک معادل کبد دارند که نام آن بافت چربی است (۳۱). در

شرایط تنش و مسمومیت آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز از بافت چربی وارد همولنف حشرات می شود و در سم زدایی نقش دارند (۳۲). کم شدن فعالیت این آنزیم ها در زنبورها سبب اختلال در چرخه کربس، سنتز ATP، فسفوریلاسیون اکسیداتیو، بتااکسیداسیون و سایر چرخه های متابولیک می شود (۳۳). با ورود مواد آنتی اکسیدانی و ویتامینی به بدن زنبورها، افزایش فعالیت این آنزیم ها -که نشانگرهای زیستی می باشند- در بدن زنبورها مشاهده می شود (۳٤). فعالیت آنزیم های آمینوترانسفراز از طریق انتقال بخش آمین اسیدهای آمینه گلوکوژنیک، به مسیر گلوکونئوژنز کمک می کند تا نیاز انرژی در لاروها و زنبورهای برآورده شود (۳۳).

در پژوهش کنونی زنبورهای تحت تنش گرمایی بیان ژن *hsp90* بیشتری نسبت به زنبورهای کوهستان داشتند. افزودن سلنیوم آلی در تغذیه زنبورهای پرستار در منطقه دشت سبب افزایش معنی دار بیان ژن *hsp90* شد در حالیکه مقایسه بیان این ژن بین زنبورهای کوهستان تغذیه شده با شربت حاوی سلنیوم و تغذیه شده بدون سلنیوم نشان داد که تحت تاثیر سلنیوم قرار نگرفته است. این یافته موافق با گزارش امینی و همکاران (۳۵) است که گزارش کردند نانوسلنیوم سبب افزایش بیان ژن hsp70 در زنبورهای پرستار تحت استرس گرمایی می شود. بیان بیشتر ژن *hsp90* مقاومت گرمایی زنبورهای پرستار را افزایش می‌دهد و در نتیجه بازدیدهای مکرر زنبورهای پرستار برای تغذیه لاروها را افزایش می دهد.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد، تنش گرمایی دارای اثرات نامطلوب بر ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورهای پرستار است و بیشترین اثر منفی را بر میزان پذیرش لارو پیوند شده بر جای می گذارد. افزودن سلنیوم آلی در دوز ۵۰ میکروگرم در لیتر به شربت هر چند بر مقدار ژله رویال تولیدی در هر سلول موثر نبود، ولی سبب افزایش میزان پذیرش لارو شد که می تواند بر مقدار تولید ژله رویال موثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری واحد علوم و تحقیقات به جهت تصویب پروپوزال و مکاتبات اداری و از پژوهشکده تحقیقات کشاورزی کرج برای در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاه تغذیه برای انجام این تحقیق تشکر می شود. از خانم دکتر شهبازی و مهندس عصاره به جهت راهنمایی های ارزنده و کمک در آنالیز بیان ژن تشکر می شود. این مقاله مستخرج از رساله دانشجوی دوره دکتری تخصصی واحد علوم و تحقیقات (خلیل رسولی نادرگلی) می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافعی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

References

1. Vaziritabar S, Esmaeilzade SM. Profitability and socio-economic analysis of beekeeping and honey production in Karaj state, Iran. Journal of Entomology and Zoology Studies. 2016;4(4):1341-50.

2. Lipiński, Z. Honey Bee Nutrition and Feeding. Northern publication. London, UK. 2019.

3. Zhao H, Guilin L, Dezheng G, Han L, Qingxin L. Response mechanisms to heat stress in bees. Apidologie. 2021; 52 (2): 388-399.

DOI: 10.1007/s13592-020-00830-w.

4. Severson DW, Erickson EH, Williamson JL, Aiken JM. Heat stress induced enhancement of heat shock protein gene activity in the honey bee (Apis mellifera). Experientia. 1990; 46:737-9.

5. Kühnholz S, and Seeley TD. The control of water collection in honey bee colonies. Behavioral Ecology and Sociobiology. 1997; 41 (1): 407–422.

doi: 10.1007/s002650050402.

6. Becerril-Sánchez AL, Quintero-Salazar B, Dublán-García O, Escalona-Buendía HB. Phenolic compounds in honey and their relationship with antioxidant activity, botanical origin, and color. Antioxidants. 2021; 10(11):1700-5.

7. Shini S, Sultan A, Bryden WL. Selenium biochemistry and bioavailability: implications for animal agriculture. Agriculture. 2015; 5(4):1277-88.

8. Wen HY, Davis RL, Shi B, Chen JJ, Chen L, Boylan M, Spallholz JE. Bioavailability of selenium from veal, chicken, beef, pork, lamb, flounder, tuna, selenomethionine, and sodium selenite assessed in selenium-deficient rats. Biological Trace Element Research. 1997; 58:43-53.

9. Farjan M, Dmitryjuk MG, Lipinski Z, Biernat-Lopienska E, Zóltowska K. 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. 2012; 51 (3): 263-70.

doi: 10.3896/IBRA.1.51.3.07.

10. Kikusato M, Toyomizu M. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. PloS one. 2013; 8: e64412.

11. Morammazi S, Mirhosseini MA. Expression of *hsp90* gene and its relationship with ambient temperature and foraging rate in apis mellifera meda. Agricultural Biotechnology Journal. 2021; 12(4): 181-204.

doi: 10.22103/jab.2020.15283.1199.

12. Alqarnia AS, Aliab H, Iqbala J, Owayssa AA, Smith BH. Expression of heat shock proteins in adult honey bee (Apis mellifera L.) workers under hot-arid subtropical ecosystems. Saudi Journal of Biological Sciences. 2019; 26(7): 1372-76.

doi: 10.1016/j.sjbs.2019.08.017.

13. Li X, Ma W, Shen J, Long D, Feng Y, Su W. Tolerance and response of two honeybee species Apis cerana and Apis mellifera to high temperature and relative humidity. PLoS ONE. 2019; 14(6): e0217921. **doi: 10.1371/journal.pone.0217921**

14. Hendriksma HP, Pachow CD, Nieh JC. Effects of essential amino acid supplementation to promote honey bee gland and muscle development in cages and colonies. Journal of insect physiology. 2019; 117:103906.

15. Řeřicha M, Dobeš P, Knapp M. Changes in haemolymph parameters and insect ability to respond to immune challenge during overwintering. Ecology and Evolution. 2021; 11(9):4267-75.

16. Di Fiore C, Nuzzo A, Torino V, De Cristofaro A, Notardonato I, Passarella S, Di Giorgi S, Avino P. Honeybees as Bioindicators of Heavy Metal Pollution in Urban and Rural Areas in the South of Italy. Atmosphere. 2022; 13(4):624-30.

17. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. USA. 2005.

18. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay Analytical Biochemistry. 1996; 239 (1): 70-76.

doi: 10.1006/abio.1996.0292.

19. Draper H.H. and Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymology. 1990; 186 (1): 421-31.

doi: 10.1016/0076-6879(90)86135-I.

20. Sahebzadeh N, Lau WH. 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. 2017; 114, 195-201.

21. Amini-Esfidvajani MB, Sadeghi AA, Shawrang P, Chamani M, Aminafshar M. 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. 2022; 2: 100034,

doi:10.1016/j.jtemin.2022.100034.

22. Livak, KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods. 2001; 25(4): 402-8.

23. Steel RG, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York, NY, USA: McGraw-Hill; 1986.

24. Winston ML. The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, USA. 1991.

25. Siegel AJ, Hui J, Johnson RN, Starks PT. Honey bee workers as mobile insulating units. Insectes sociaux. 2005; 52:242-6.

26. Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis GP. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. Antioxidants. 2018; 7(5):66-9.

27. Algethami JS, El-Wahed AA, Elashal MH, Ahmed HR, Elshafiey EH, Omar EM, Naggar YA, Algethami AF, Shou Q, Alsharif SM, Xu B. Bee pollen: Clinical trials and patent applications. Nutrients. 2022; 14(14):2858-62.

28. de Bruyn AMH, Lo BP, Van Geest J, Semeniuk D, Elphick JR, Ings J, Good C, Arnold MC, Brix KV. Maternal Transfer and Effects of Selenium on Early Life Stage Development of Redside Shiner (Richardsonius balteatus). Environ Toxicol Chem. 2023.

doi: 10.1002/etc.5712.

29. Vannette RL, Mohamed A, Johnson BR. Forager bees (Apis mellifera) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. Scientific reports, 2015: 5(1): 1-9.

30. Farhadi Z, Sadeghi A.A, Motamedi Sedeh F, Chamani M. The effects of piperine supplementation on colony population, body weight after emerging, viability and vitellogenin gene expression in honey bees under heat stress. Iranian Journal of Biological Sciences, 2022; 17(2):15-27.

31. Jamei M., Sadeghi A.A., Chamani M. The effect of zinc-methionine supplementation on antioxidant status and expression of interleukin-4 and interleukin-6 genes in female rats under heat stress. Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(3):29-39

32. Wan PJ, Fu KY, Lü FG, Guo WC, Li GQ. Knockdown of a putative alanine aminotransferase gene affects amino acid content and flight capacity in the Colorado potato beetle Leptinotarsa decemlineata. Amino Acids. 2015; 47: 1445-454.

doi: 10.1007/s00726-015-1978-1.

33. Nation, J. Insect Physiology and Biochemistry. CRC Press; London, UK. 2008.

34. Amdam GV, Simões ZL, Hagen A, Norberg K, Schrøder, K, Mikkelsen Ø. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. Experimental Gerontology. 2004; 39: 767-73.

35. Amini MB, Sadeghi AA, Shawrang P, Chamani M, Aminafshar M. 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. 2022; 43 (2021), e48574, **doi: 10.4025/actascianimsci.v43i1. 48574**