Iranian Journal of Biological Sciences.2022; 17(2):15-27

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

The effects of piperine supplementation on colony population, body weight after emerging, viability and vitellogenin gene expression in honey bees under heat stress

Farhadi Z[1], Sadeghi A.A[2], Motamedi Sedeh F[3], Chamani M[4]*

1Ph.D 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, Karaj, Iran
4 Full Professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Dr. Shurang›s private beekeeping farm located in Karaj and Razi Laboratory of Science and Research Unit

Article Info

Article History:
received 9.22.2022
revised 12.29.2022
accepted 1.17.2023
online 1.26.2023

KeyWords:
honey bee
piperine
gene expression
antioxidant capacity
vitellogenin

***Corresponding author:**
E-mail address
zfarhadi2205@gmail.com
aasdghi@gmail.com &
a.sadeghi@srbiau.ac.ir
farah.motamedi@gmail.com
m.chamani@srbiau.ac.ir

Abstract

Aim: This study was done to evaluate the effects of piperine (phytogenic material in pepper) supplementation on antioxidant capacity, vitellogenin gene expression, the viability and body weight of emerged honey bees.
Materials and methods: 32 bee hives were divided to 4 treatment groups and 8 replications in a completely random design. The environment temperature of the region was 38 degrees Celsius for at least 4 hours per day. The control group received syrup without piperine, and the treatment groups received syrup containing 2000, 4000 and 6000 μg of piperine per liter, respectively. The level of malondialdehyde and antioxidant capacity of the body, weight and body composition of bees after emerging, colony population and relative expression of vitellogenin gene were determined.
Results: Supplementation of 2000 and 4000 μg piperine per liter of syrup caused an increase in the body weight, a decrease in the level of malondialdehyde and increase in antioxidant capacity ($P<0.05$). The addition of piperine in different doses caused a significant increase ($P<0.05$) in vitellogenin gene expression compared to the control group. The spawning level and colony population that received 6000 μg/liter piperine was lower than the group that received 2000 and 4000 μg/liter $P<0.05$).
Conclusion: Based on the results, supplementation of 2000 to 4000 μg/liter of piperine has a positive effect on increasing the antioxidant capacity, vitellogenin gene expression, body weight of new-emerged bees and colony population, and a higher dose causes a decrease in spawning rate and reduction of honey bee population.

Cite this article: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.2022; 17(2): 15-27

10.30495/ZISTI.2023.1968199.1138 DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.2.2.4
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

اثرات افزودن پیپرین به شربت بر جمعیت کلنی، وزن بدن نوبالغین، زنده مانی و بیان ژن ویتلوژنین در زنبور عسل تحت تنش گرمایی

زهرا فرهادی۱، علی اصغر صادقی۲*، فرحناز معتمدی سده۳، محمد چمنی٤

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 : مزرعه زنبورداری خصوصی دکتر شورنگ واقع در کرج و آزمایشگاه رازی واحد علوم و تحقیقات

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱٤۰۱/٦/۳۱
بازنگری ۱٤۰۱/۹/۸
پذیرش ۱٤۰۱/۱۰/۲۷
نمایه ۱٤۰۱/۱۱/٦

کلمات کلیدی
زنبور عسل
پیپرین
بیان ژن
ظرفیت آنتی اکسیدانی
ویتلوژنین

* نویسنده مسؤل
zfarhadi2205@gmail.com
aasdghi@gmail.com و
a.sadeghi@srbiau.ac.ir
farah.motamedi@gmail.com
m.chamani@srbiau.ac.ir

چکیده

هدف: ایـــن تحقیق به منظـــور مطالعه اثرات افـــزودن مقادیر مختلف مـــاده موثره فلفل به نام پیپرین بـــه شربت بر ظرفیت آنتی-اکســـیدانی بدن، بیـــان ژن ویتلوژنین، زنده مانی و وزن بـــدن نوزنبورهای بالغ بود.

مـــواد و روش هـــا: از تعـــداد ۳۲ کندوی زنبور عســـل یکسان‌ســـازی شـــده در قالب طرح کاملا تصادفی با ٤ گروه آزمایشـــی و ۸ تکرار اســـتفاده شـــد. دمای هـــوا در مکان قراگیری کندوهـــا حداقل به مدت ٤ ســـاعت در روز ۳۸ درجه سلســـیوس بود. گروه شـــاهد شربت بـــدون افزودنـــی دریافت کرد و گروه های آزمایشـــی به ترتیب شربت حـــاوی ۲۰۰۰، ٤۰۰۰ و ٦۰۰۰ میکروگـــرم پیپریـــن در لیـــتر دریافت کردند. ســـطح مالون دی آلدئیـــد و ظرفیت آنتی‌اکســـیدانی بـــدن، وزن و ترکیبات بـــدن نوزنبورهـــا، جمعیت کلنی و بیان نســـبی ژن ویتلوژنین تعیین شـــد.

نتایـــج: افـــزودن ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میکروگـــرم پیپرین بـــه یک لیتر شربت ســـبب افزایش وزن بدن، کاهش ســـطح مالـــون دی آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکســـیدانی شـــد (P <۰/۰۵). افزودن پیپرین در دوزهای مختلف ســـبب افزایش معنی دار (P <۰/۰۵) بیان ژن ویتلوژنین نســـبت به گروه شـــاهد شـــد. ســـطح تخمریزی و جمعیت کلنی‌هایی کـــه ٦۰۰۰ میکروگرم پیپرین دریافـــت کردند کمتر از گروهی بود کـــه ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میکروگرم دریافـــت کردند (P <۰/۰۵).

نتیجه گیـــری: نتایج پژوهـــش حاضر نشـــان داد که اســـتفاده از دوزهـــای ۲۰۰۰ تا ٤۰۰۰ میکروگـــرم پیپرین در یـــک لیتر شربت بـــرای افزایش ظرفیت آنتی‌اکســـیدانی بـــدن، بیان ژن ویتلوژنیـــن، وزن بـــدن نوزنبورها و جمعیت کلنی اثر مثبت داشـــت و دوز بالاتر ســـبب کاهـــش تخمریزی و کاهـــش جمعیت زنبور عســـل گردید.

شـــیوه آدرس‌دهی این مقالـــه : فرهادی ز، صادقـــی ع.الف*، معتمدی ســـده ف، چمنی م. اثرات افـــزودن پیپرین به شربت بـــر جمعیت کلنی، وزن بـــدن نوبالغین، زنده مانـــی و بیان ژن ویتلوژنین در زنبور عســـل تحت تنش گرمایی. مجله دانش زیســـتی ایـــران. ۱٤۰۱ ؛ ۱۷(۲):۱۵-۲۷

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.2.2.4
doi 10.30495/ZISTI.2023.1968199.1138

ناشر: دانشـــگاه آزاد اســـلامی واحد ورامین - پیشـــوا شـــاپا چاپی: ۱۷۳۵-٤۲۲٦ شـــاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-٤۵۹X نویســـندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

تولیدکنندگان عسل، پرورش دهندگان ملکه و تولیدکنندگان ژل رویال در تابستان کندوها را به مناطق کوهستانی منتقل نمی کنند و در مناطق دشت با تغذیه شربت و کیک گرده کلنی ها را تغذیه می کنند و به فعالیت تولیدی می پردازند. بسیاری از زنبورداران نیز به دلایل مختلف از جمله هزینه های حمل و نقل و امنیت نمی توانند کندوها را به مناطق خنک تر منتقل کنند (۱). در این شرایط فعالیت اصلی بیشتر زنبورهای کارگر آب‌آوری است و گاهی گرما به قدری شدید است که آب کافی برای خنک‌کردن محیط پرورش نوزادان تامین نمی‌شود (۲). علاوه بر این لاروها در کلنی هایی که نوزادان زیادی دارند، به دلیل تامین‌نشدن آب و مواد مغذی مورد نیاز با تنش تغذیه‌ای نیز رو به رو می‌شوند (۳). در این شرایط کلنی زنبور عسل با تنش گرمایی رو به رو می شود (٤).

در بدن زنبور عسل در معرض تنش گرمایی، تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و برای جمع-آوری رادیکال‌های آزاد و به حداقل رساندن اثر تنش‌ها بر بدن زنبور و عملکرد کلنی تامین مواد آنتی‌اکسیدانی ضروری است (٥). گرده گل حاوی رنگدانه‌های متعدد با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است ولیکن در هوای گرم تابستان مقدار ورودی گرده و ذخیره گرده در قاب‌ها به حداقل می‌رسد. بنابراین زنبور به مواد جایگزین گرده نیاز دارد تا این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را تامین کند (٦). از طرفی گرده در صورت متنوع بودن از نظر رنگ می‌تواند نیازهای کامل کلنی را برآورده کند و کندوهایی که در مناطق دشت و در مزارع تک‌گل مانند کلزا و آفتابگردان مستقر می‌شوند با گرده تک‌گل مواجه شده و نیازهای کامل انها به مواد آنتی‌اکسیدانی برآورده نمی‌شود (۱، ۷). بنابراین ضرورت دارد در این مواقع مواد آنتی‌اکسیدان کمکی جای گرده یا شربت به زنبور داده شود (٥).

مواد فایتوژنیک گیاهی دارای فعالیت شدید آنتی‌اکسیدانی هستند و در صورت افزودن به شربت می‌توانند کمبود مواد آنتی-اکسیدانی را برطرف کنند. علاوه بر این مواد فایتوژنیک دارای خواص ضد میکروبی هستند و می‌توانند میکروب‌های مضر را از بین ببرند (۸).

پیپرین یا ماده مؤثره فلفل با فرمول شیمیایی $C_{17}H_{19}NO_3$ یک ماده فایتوژنیک گیاهی می‌باشد (۹). پیپرین نوعی آلکالوئید آمیدی است که خواص چندگانه مانند آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد فشار خون، محافظت کننده کبد و بافت عصبی و افزایش دهنده زیست فراهمی مواد مغذی و مواد معدنی را نشان می دهد (۱۰-۱۳). پیپرین به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی با مهار اکسیژن و نیتروژن فعال از طریق افزایش سطوح گلوتاتیون، سد آنتی‌اکسیدانی بدن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن را بهبود می بخشد (١٤). این ماده با القای مسیر اصلی فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، نقش محوری در پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از تنش گرمایی و تنش اکسیداتیو دارد (١٥، ١٦). Schulz و همکاران (۱۷) برای نخستین بار مطالعه ای در زمینه اثر پیپرین با یک دوز (۳۰۰۰ میکروگرم در لیتر شربت) در زنبور عسل انجام دادند. این محققان گزارش کردند پیپرین با اثرات آنتی اکسیدانی سبب افزایش طول عمر زنبورهای کارگر و همچنین سبب افزایش عملکرد آنزیم های آنتی اکسیدانی می شود. در مطالعه این محققان به اثرات پیپرین بر وزن بدن زنبور در زمان خروج از شفیره پرداخته نشد.

وزن بدن نوزنبور فراسنجه بسیار مهمی است و بیانگر وضعیت تغذیه در زمان لاروی ووضعیت متابولیکی در زمان شفیرگی است (۱۸). از طرفی فراسنجه مذکور با مقدار پروتئین دریافتی در زمان تغذیه لاروی مرتبط است و تاثیر مستقیمی در فعالیت های پرستاری و همچنین مدت زمان پرستاری و توان چراگری و طول عمر زنبور دارد (۱۹). در ضمن اثر دوزهای مختلف پیپرین و غلظت مالون دی آلدئید که فراسنجه مهم دیگری است در مطالعه Schulz و همکاران (۱۷) مطالعه نشده است.

غلظت مالون دی آلدئید در بافت های بدن زنبور بیانگر سطح رادیکال های آزاد و آسیب بافتی است که بر اثر فعالیت شدید متابولیکی در بدن زنبور ایجاد می شود (۲۰). با افزایش سطح مالون دی آلدئید عمر زنبور عسل به دلیل تخریب غشاهای سلولی و بافت ها کمتر می شود (۱۳). علاوه بر این در زمینه اثر پیپرین بر بیان ژن ها بویژه ویتلوژنین در منابع علمی دردسترس مطالعه ای یافت نشد. در تحقیقی گزارش کردند که پیپرین بر بیان ژن ها اثر مستقیم دارد (۲۱). با توجه به اثراتی که ویتلوژنین بر زنده مانی

زنبورها و فعالیت ملکه و زنبورهای پرستار و کارگر دارد، بررسی بیان ژن مربوطه در زنبور عسل اهمیت زیادی دارد. ویتلوژنین فسفولیپوپروتئینی است که در بخش های مختلف بدن زنبور بویژه در بافت چربی و در روده میانی وجود دارد و علاوه بر نقش تغذیه ای دارای فعالیت ایمونولوژیکی است (۲۲، ۲۳). فرضیه این تحقیق این بود که پیپرین از طریق کاهش سطح مالون دی آلدئید، افزایش سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن و افزایش بیان ژن ویتلوژنین می تواند سبب افزایش وزن زنبور در زمان خروج از شفیره، زنده مانی و جمعیت سازی زنبور عسل شود. در ضمن با افزایش دوز پیپرین اثرات آنتی اکسیدانی افزایش می یابد و اثرات مثبت بر فراسنجه های مذکور انتظار می رود. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات افزودن دوزهای مختلف پیپرین به شربت بر جمعیت کلنی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن، زنده مانی، وزن بدن در زمان خروج از شفیره و بیان ژن ویتلوژنین بود.

مواد و روش‌ها:

محل اجرا، طرح آزمایشی و گروه های آزمایشی

این تحقیق در زنبورستان خصوصی در دو مرحله صحرایی و آزمایشگاهی طی اواخر خرداد و اوایل تیرماه ۱۴۰۰ در منطقه کیاهمهر کرج (استان البرز) با عرض جغرافیایی ۳۲/۸۰۸۲۰۱ و طول جغرافیایی ۵۰/۸۲۴۰۴۷ و ارتفاع ۱۰۷۰ متر انجام شد. این مطالعه در دو بخش شامل استفاده از انکوباتور برای تعیین اثرات پیپرین بر زنده مانی زنبورها و در مزرعه با استفاده از کندوهای زنبور عسل برای تعیین فراسنجه های آنتی اکسیدانی و بیان ژن و جمعیت کلنی انجام شد. برای ایجاد تنش گرمایی بنابر روش توصیه شده توسط لی و همکاران (۲۴)، آزمایش مزرعه ای در مکانی با دمای ۳۸ درجه سلسیوس به مدت حداقل ٤ ساعت در روز از ساعت ۱۱ تا ۱۵ انجام گرفت و در آزمون قفس در انکوباتور همین شرایط برقرار گردید.

در مرحله صحرایی در زنبورداری تحقیقاتی سایر فراسنجه‌ها با اعمال تیمارهای آزمایشی نمونه‌برداری و ارزیابی انجام شد. آزمایش صحرایی در قالب طرح کاملا تصادفی با ٤ گروه آزمایشی و ۸ تکرار انجام شد. گروه های آزمایشی شامل تغذیه روزانه یک لیتر شربت یک به یک بدون و حاوی پیپرین بود. گروه شاهد شربت بدون افزودنی دریافت کرد. گروه آزمایشی اول تا سوم به ترتیب شربت حاوی پیپرین به مقدار ۲۰۰۰، ٤۰۰۰ و ٦۰۰۰ میکروگرم در لیتر دریافت کرد. پیپرین مورد استفاده از نوع محلول در آب بود و از شرکت اکسیر نانو سینا (تهران، ایران) تهیه شد .

آزمون زنده مانی زنبورها در قفس

برای بررسی اثر پیپرین بر زنده مانی زنبورها، با استفاده از انکوباتور دمای ۳۸ درجه سلسیوس به مدت ٤ ساعت از ساعت ۱۱ صبح تا ۳ بعد از ظهر ایجاد شد. با قفس مخصوص، طول عمر زنبورهای تازه متولد شده و تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی و کیک گرده مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور یک قاب شفیره نزدیک تولد از کندو برداشته و تا خروج نوزنبورها در انکوباتور قرار داده شد. با استفاده از انکوباتور و قفس های پلاستیکی، تعداد ۵۰ زنبور سه روز سن به صورت تصادفی برداشته و در هر قفس به روش استاندارد ویلیام و همکاران (۱۸) نگهداری شد. در این آزمایش از طرح کاملا تصادفی با ٤ گروه آزمایشی و ۸ تکرار و ۳۲ قفس استفاده شد. گروه های آزمایشی مشابه با ازمایش صحرایی بود ولی مقدار دادن شربت در حد یک میلی لیتر در روز برای هر قفس بود که بر روی یک پد تزریق میشد و زنبورها از روی پد شربت را مصرف می کردند. از تعداد ۵۰ زنبور مورد آزمایش در هر تکرار تعداد زنبورهای زنده طی ۲۱ روز به عنوان زنده مانی زنبور گزارش شد.

تعیین سطح تخمریزی ملکه وجمعیت زنبورها

ابتدای شروع آزمایش جمعیت زنبورهای کارگر با شمارش تعداد قاب پوشیده از زنبور تعیین شد و یکسان‌سازی جمعیت بین کندوها با جابجایی قاب انجام شد. قاب‌های

حاوی تخم روز، لارو و شفیره از کندوها حذف و به جای آن قاب مومبافی شده قرار داده شد. طی دوره یکسان سازی ملکه به همراه تعدادی پرستار در قفس فشاری (شرکت هفت گوهر، تهران) قرار داده شد. در ضمن به طور مساوی دو قاب عسل و گرده به عنوان ذخیره غذایی در کندوها قرار داده شد. تعداد ۳۲ کندوی زنبور عسل با جمعیت ۵ قاب و ذخیره غذایی یکسان سازی شده به مدت ۲۸ روز در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری سطح تخم‌ریزی ملکه از قاب مشبک شده دارای مربع‌های استاندارد ۵×۵ اینچ که کل قسمت‌های یک شان را می‌پوشاند استفاده شد. تعداد مربع‌های حاوی تخم شمارش شده و سطح مورد نظر نیز محاسبه شد. جمعیت زنبور کارگر با شمارش تعداد قاب جمعیت در هر کندو تعیین شد. ۲۲ روز بعد از شروع آزمایش وزن بدن ۲۰ نوزنبور هر کلنی با ترازوی دقیق (AND Scale GE۲۲۰, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد و سپس با دی اکسید کربن بیهوش و در ظرف دربسته در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس تا انجام آزمایش های بعدی نگهداری شد.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی بدن زنبورها

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. اندازه گیری وزن نمونه‌ها قبل و بعد از خشک شدن با ترازوی دیجیتال (AND Scale GE۲۲۰, Tokyo, Japan) با دقت ۰/۰۰۱ انجام شد. درصد چربی و پروتئین بدن زنبورهای نمونه برداری شده به ترتیب با استفاده از روش سوکسله و کلدال تعیین شد (۲۵). سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورها با روش Benzie and Strain (۲۶) انجام شد. برای تعیین مقدار مالون دی آلدئید از روش تیوباربیتوریک اسید استفاده شد (۲۰).

آنالیز بیان ژن

لاشه زنبورها در نیتروژن مایع 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) و RNA کل بنابر دستورالعمل سازنده استخراج شد. برای تعیین فراوانی نسبی mRNA ژن vg با استفاده از real time-qPCR بنابر روش صاحب‌زاده و همکاران (۲۷) اقدام شد.. بنابر روش این محققان مقدار ۱ میکروگرم از هر نمونه RNA با استفاده از کیت تجاری (شرکت Bioneer، سئول، کره جنوبی) به cDNA رونویسی معکوس 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 و β-اکتین (جدول ۱) با استفاده از اطلاعات NCBI و توالی های گزارش شده قبلی (۲۸) طراحی شدند و برای نرمال سازی، β-اکتین به عنوان ژن خانه دار استفاده شد. نسبت بیان نسبی ژن ویتلوژنین به عنوان ژن هدف به ژن β-اکتین بر اساس روش Livak and Schmittgen (۲۹) نرمال شد.

جدول ۱ - پرایمرهای ژن هدف و خانه دار

Target gene	Primers sequences	Amplicon size (bp)
Vitellogenin	F-GTTCCGACCGACGACGA	۱۲٤
	R-TCCCTCCCACGGAGTCC	
β-actin	F- TGCCAACACTGTCCTTTCTG	۱٤۰
	R- AGAATTGACCCACCAATCCA	

F=Forward, R=Reverse

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS، در قالب طرح کاملا تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده ازآزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج:

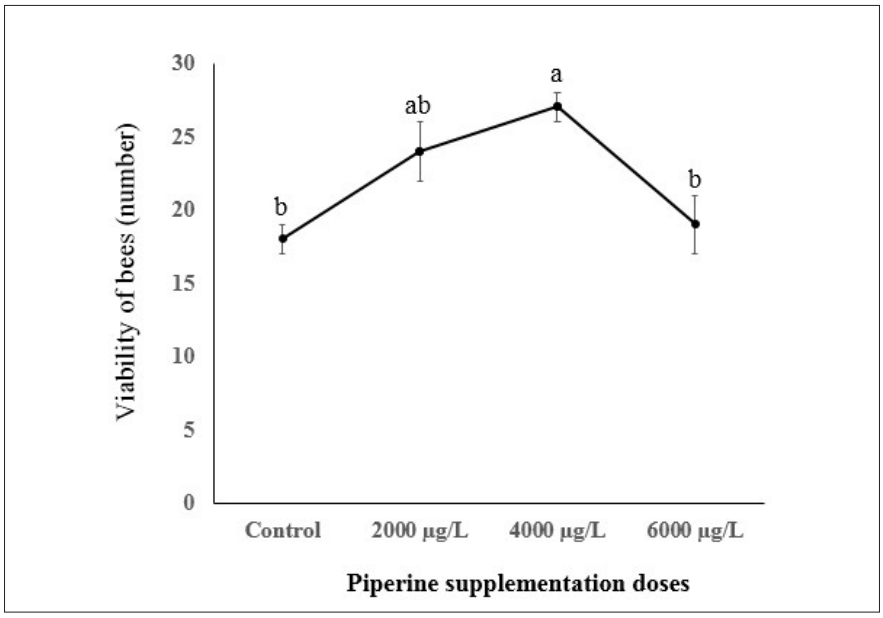
نتایج مربوط به وزن و ترکیب شیمیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورهای در زمان خروج از شفیره در جدول ۲ گزارش شده است. نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم پیپرین به یک لیتر شربت بر وزن بدن زنبورها اثر معنی-داری داشت (P <۰/۰۵) و دوز ۶۰۰۰ میکروگرم تاثیری بر این فراسنجه نداشت و تفاوت غیرمعنی دار با گروه شاهد نشان داد (P <۰/۰۵). افزودن دزهای مختلف پیپرین سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورها نسبت به گروه شاهد شد (P <۰/۰۵). افزودن ۶۰۰۰ میلی گرم پیپرین به یک لیتر شربت هر چند سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن زنبورها در زمان خروج از شفیره شد ولی اثر آن از دو دوز دیگر کمتر بود.

جدول ۲ - اثر تغذیه شربت حاوی پیپرین در دوزهای مختلف بر وزن بدن و ترکیب شیمیایی بدن نوزنبورها

Treatments	Body weight (mg)	Fat (%)	Protein (%)	Total antioxidant capacity (mM Trolox)
Control	۱۰۹b	٦/۹	٥۲/۰	۳/٦c
Piperine 2000 µg/L	۱۱٥a	۷/۲	٥۰/٤	٤/٦a
Piperine 4000 µg/L	۱۱۷a	۷/۰	٥۱/۲	٤/٥a
Piperine 2000 µg/L	۱۱۲b	۷/۱	٤۹/۸	٤/۰b
SEM	۱/۲۸	۰/۲٥	۰/٤۹	۰/۱۹
P value	۰/۰۳٥	۰/۱۳٥	۰/۲۱٤	۰/۰۳٤

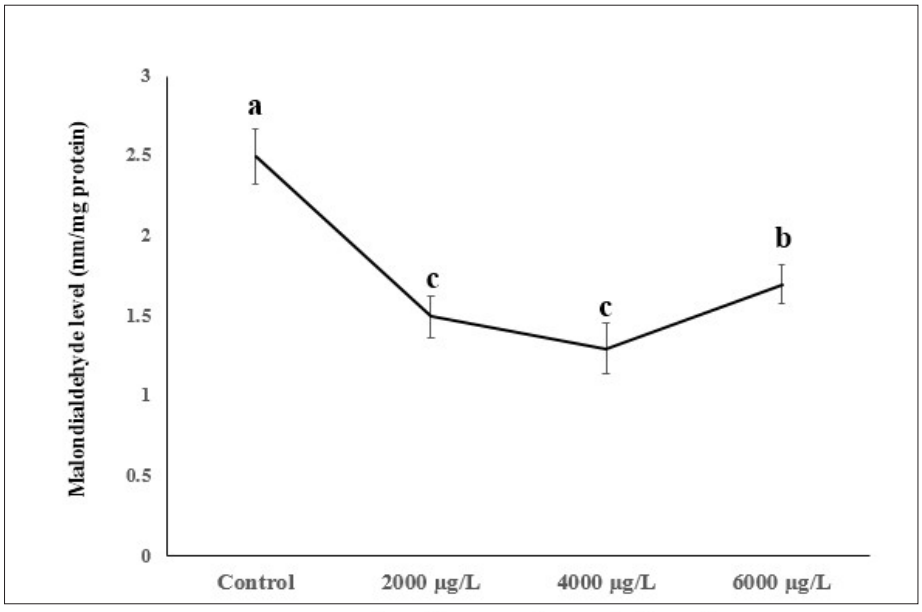
در هر ستون تفاوت میانگین‌های با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P<0.05).

نتایج مربوط به زنده‌مانی زنبورها در قفس طی ۲۱ روز در شکل ۱ نشان داده شده است. افزودن ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم پیپرین سبب افزایش معنی دار (P >۰/۰۵) تعداد زنده مانی زنبورها نسبت به گروه شاهد شد. با افزایش مقدار پیپرین به ۶۰۰۰ میکروگرم کاهش معنی‌داری (P >۰/۰۵) در تعداد زنده‌مانی زنبورها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. از تعداد ۵۰ زنبور مورد آزمایش در هر تکرار، به طور میانگین ۱۸ زنبور در تیمار شاهد طی ۲۱ روز زنده ماند. تعداد زنبورهای زنده در تیمار ۲ میکروگرم پیپرین ۲۴ زنبور و در تیمار ٤ میکروگرم پیپرین ۲۷ زنبور بود. افزایش مقدار پیپرین به ٦ میکروگرم در لیتر سبب کاهش تعداد زنبورها در روز ۲۱ آزمایش به ۱۹ زنبور شد.



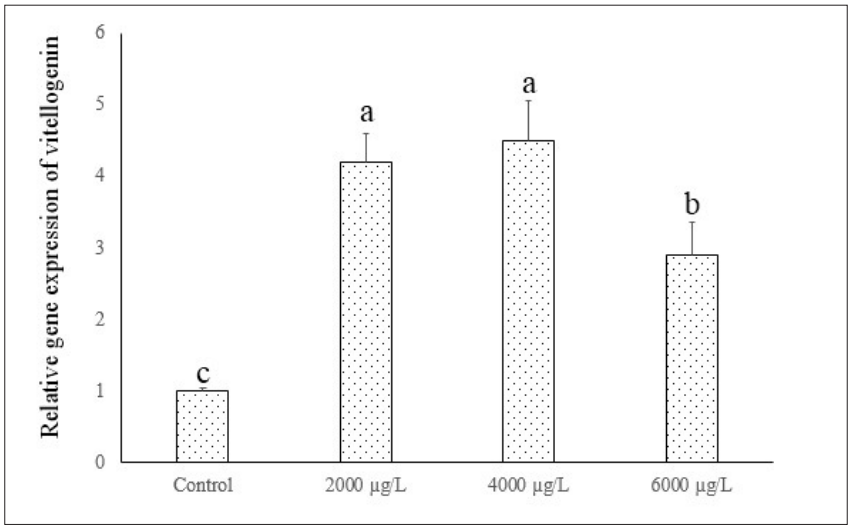
شکل ۱ - زنده‌مانی زنبورها طی ۲۱ روز در قفس تحت تاثیر پیپرین در دوزهای مختلف

نتایج مربوط به سطح مالون‌دی‌آلدئید بدن در نمودار ۲ نشان داده شده است. افزودن دزهای مختلف پیپرین به شربت سبب کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید در بدن زنبورها نسبت به گروه شاهد شد (P< ۰/۵۰). همچنین سطح مالون‌دی‌آلدئید بدن زنبورها بین دوزهای مختلف پیپرین تفاوت معنی‌داری داشت (P <۰/۵۰). در دوز ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در لیتر، افزودن پیپرین سبب کاهش معنی دار سطح مالون دی آلدئید بدن زنبورها نسبت به افزودن ۶۰۰۰ میکروگرم در لیتر شد. با افزایش دوز پیپرین به ۶۰۰۰ میکروگرم افزایش در سطح مالون دی آلدئید مشاهده شد.



شکل ۲ - مقدار مالون¬دی¬آلدئید (نانومول به ازای هر میلی گرم پروتئین) بدن نوزنبورها تحت تاثیر دوزهای مختلف پیپرین

بیان نسبی ژن ویتلوژنین در شکل ۳ نشان داده شده است. افزودن پیپرین به شربت در دوزهای مختلف سبب افزایش معنی دار (P<۰,۰۵) بیان ژن ویتلوژنین نسبت به گروه شاهد شد. بیان ژن ویتلوژنین در گروه دریافت کننده ۶۰۰۰ میکروگرم در لیتر کمتر از دو گروه دریافت کننده ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم پیپرین در لیتر بود.



شکل ۳ -بیان نسبی ژن های ویتلوژنین در بدن زنبورهای تغذیه شده با شربت حاوی دوزهای مختلف پیپرین

سطح تخمریزی ملکه و تعداد قاب طی مدت آزمایش در جدول ۲ گزارش شده است. افزودن دزهای مختلف پیپرین به شربت سبب افزایش معنی¬دار (P <۰/۰۵) سطح تخمریزی ملکه شد. بیشترین سطح تخمریزی به کلنی های دریافت کننده ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلیگرم پیپرین در لیتر تعلق داشت. افزودن پیپرین در دوزهای ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در لیتر سبب افزایش تعداد قاب و جمعیت زنبور در شرایط فارم شد و افزودن ۶۰۰۰ میکروگرم در لیتر سبب کاهش (P <۰/۰۵) جمعیت نسبت به ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم شد ولی تفاوت معنی¬داری با گروه شاهد نداشت.

جدول۳: اثر دوزهای مختلف پیپرین بر سطح تخم ریزی ملکه (سانتی متر مربع) و تعداد قاب جمعیت داخل کندو

	Spawning area (cm^2)	Frame number
Control	۵۳۲۵c	۶/۱b
Piperine 2000 µg/L	۵۹۷۸a	۷/۶a
Piperine 4000 µg/L	۵۸۹۴a	۷/۵a
Piperine 2000 µg/L	۵۴۲۵b	۶/۵b
SEM	۵۰/۶۳	۰/۲۲
P value	۰/۰۱۹	۰/۰۲۱

در هر ستون تفاوت میانگین‌های با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P<0.05).

بحث:

یکی از شاخص های مهم وضعیت متابولیکی و فیزیولوژیکی بدن زنبور عسل طی فرآیند رشد و نمو درون حجره؛ وزن بدن زنبور در زمان خروج از شفیره است (۳۰).

وزن بدن زنبور در زمان خروج از شفیره به عوامل مختلفی بویژه نژاد و تغذیه در دوران لاروی بستگی دارد (۱).

Winston (۳۱) گزارش کرد که وزن بدن زنبور در زمان خروج از شفیره بین ۸۱ تا ۱۵۱ میلی گرم متغیر است. در مطالعه حاضر میانگین وزن زنبورها در زمان خروج از شفیره بین ۱۰۹ تا ۱۱۷ میلی گرم بود که در دامنه گزارش Winston (۳۱) قرار دارد.

در این مطالعه افزودن پیپرین به شربت در دوز ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میکروگرم سبب افزایش وزن بدن زنبور در زمان خروج از شفیره شد. با توجه به داده های ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبور که در جدول ۱ گزارش شده است و نمودار ۳ مربوط به بیان نسبی ژن ویتلوژنین؛ افزایش وزن بدن در زمان خروج از شفیره به این عوامل ارتباط دارد زیرا افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن سبب بهبود وضعیت تغذیه ای و کاهش هدررفت انرژی برای نگهداری و جهت دهی آن برای تولید پروتئین و چربی می شود که در نهایت ذخایر ویتلوژنی بدن زنبور را در بافت چربی افزایش می دهد (۱).

با توجه به اینکه آزمایش حاضر در شرایط تنش گرمایی انجام شد افزودن پیپرین توانست وزن بدن زنبورها بعد از خروج از شفیره را نسبت به گروه شاهد افزایش دهد. گرما یکی از عوامل محیطی است که اثر زیادی بر تغذیه لاروها و وزن بدن در زمان خروج از شفیره دارد (۲، ۳، ۵).

دمای محیطی تا ۳٤ درجه سلسیوس مشکلی برای زنبور در پرورش نوزادان ایجاد نمی کند و با آوردن آب و تبخیر و حرکات بال شرایط دمایی مناسب را ایجاد می کند (۲، ٤).

در شرایط تنش گرمایی که در زنبور در دمای محیطی بالاتر از ۳٤ درجه سلسیوس شروع می شود آب آوری و حرکات بال نمی تواند سبب خنک کردن منطقه پرورش نوزادان شود به همین دلیل زنبورها به کف کندو و دیواره ها می روند تا دمای بدن انها سبب افزایش دمای منطقه نشود و گروه کمتری در ان منطقه فعالیت تغذیه لاروها و عملیات خنک کردن محل پرورش را انجام می دهند (۳۲).

کاهش تغذیه لاروها و افزایش دمای منطقه پرورش لارو سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در لاروها می شود و انها را حساس به عفونت های باکتریایی مانند لوک اروپایی و قارچ ها می کند یا اینکه سبب تاخیر در رشد و کسب مواد مغذی لازم برای رشد بعد از پوشاندن دهانه حجره با موم می شود (۳۳).

این وقایع با کاهش تغذیه و صرف انرژی برای نگهداری، سبب کاهش مصرف انرژی برای رشد و در نهایت سبب کاهش وزن زنبور در زمان خروج از شفیره می شود. پیپرین با اثرات آنتی اکسیدانی که دارد می تواند تا حدودی از تنش اکسیداتیو و تولید مالون دی آلدئید ممانعت کند (۳٤، ۳۵).

در این شرایط انرژی موجود در مواد مغذی دریافت شده توسط لارو صرف رشد و نمو می شود و شرایط فیزیولوژیکی و متابولیکی برای رشد لارو مهیا و در نهایت زنبور در زمان خروج از شفیره وزن مناسبی پیدا کند. از طرفی زنبورهای پرستار که وظیفه تغذیه لاروها و نگهداری شفیره ها را بر عهده دارند با دریافت پیپرین از شربت توانایی بهتری داشته و توانسته اند تغذیه بهتری در شرایط تنش گرمایی انجام دهند. مجموع این عوامل سبب شده در دوز ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میکروگرم زنبورهای در زمان خروج از شفیره افزایش وزن بهتری داشته باشند. در دوز ٦۰۰۰ میکروگرم ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورها کمتر از دو دوز دیگر بود و ممکن است این مقدار پیپرین با اثر منفی و ایجاد اختلال در عملکرد سیستم های سم زدایی مانند سیتوکروم P٤۵۰ (۹) سبب کاهش قدرت آنتی اکسیدانی بدن و افزایش سطح مالون دی آلدئید می شود. در منابع علمی دردسترس درباره اثر دزهای زیاد پیپرین ومکانیسم اثر آن بر غلظت مالون دی آلدئید و قدرت آنتی اکسیدانی بدن حیوانات و حشرات مطالعه ای یافت نشد.

با توجه به اینکه بررسی تعداد زنده مانی زنبور در شرایط محیط زنبوردری مشکل است و زنبورها بر اثر عوامل مختلف ممکن است از بین بروند آزمون تعداد زنده مانی در این آزمایش در شرایط قفس انجام شد. نتایج نشان داد دوز ۶۰۰۰ میکروگرم پیپرین تفاوت معنی¬داری با گروه شاهد نداشت ولی دوز ۴۰۰۰ میکروگرم سبب افزایش تعداد زنده مانی زنبورها شد. یافته مطالعه حاضر با یافته Schulz وهمکاران (۱۷) موافقت دارد. این محققان گزارش کردند دوز ۳۰۰۰ میکروگرم پیپرین در یک لیتر شربت سبب افزایش طول عمر زنبور از طریق تاثر بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی می شود. با توجه به سطح مالون¬دی¬آلدئید و ظرفیت آنتی¬اکسیدانی بدن زنبورها که در شرایط صحرایی به دست آمد می¬توان دلیل یافتن این نتایج در شرایط قفس را تفسیر کرد. به نظر می¬رسد دوز ۴۰۰۰ میکروگرم در حدی است که می¬تواند جذب بدن زنبور شود و از طرفی در بدن زنبور دارای اثرات مفید باشد. هر چند پیپرین دارای اثرات مفید انتی¬اکسیدانی است ولی در دوزهای بالا می¬تواند اثرات منفی وکشنده داشته باشد (۳۶، ۳۷).

در مطالعه حاضر با افزودن پیپرین به شربت مقدار مالون¬دی¬آلدئید در بدن زنبورها کاهش یافت. در شرایط تنش گرمایی غلظت مالون دی آلدیید در بدن زنبور افزایش می¬یابد و دلیل آن تولید شدن رادیکال¬های آزاد و پراکسید شدن چربی¬های موجود در غشاهای سلولی و در بدن زنبور است (۲۰). افزایش مالون دی آلدئید در بدن سبب آسیب به غشاهای سلول ها، افزایش هزینه نگهداری، تخریب سلول ها، کاهش رشد و کاهش زنده مانی زنبور می¬شود. بین دوزهای مختلف پیپرین از نظر مقدار مالون دی آلدئید بدن زنبورها تفاوت معنی داری مشاهده شد. دوز ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم کمترین مقدار مالون دی آلدئید را سبب شد. دوز ۶۰۰۰ میکروگرم پیپرین سبب کاهش معنی¬دار سطح مالون دی آلدئید بدن زنبورها نسبت به گروه شاهد شد و علت این موضوع به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل مربوط می شود. با توجه به اثرات منفی که پیپرین بر سیستم های سم زدایی در بدن لاروها و زنبورها دارد و اثرات کشندگی پیپرین بر روی لاروها گزارش شده است، با توجه به یافته های این تحقیق به نظر می رسد دوز بیش از ۴۰۰۰ میکروگرم در لیتر برای تغذیه زنبور مناسب نباشد.

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 (۲۳).

مطالعات مختلفی درباره اثر عوامل تغذیه ای بر بیان ژن ها در بدن زنبور عسل انجام شده است (۷، ۱۹، ۳۸)، ولی مطالعه درباره اثر عوامل تغذیه ای بر بیان ژن ویتلوژنین در زنبور عسل محدود است (۱۷).

مطالعات متعددی درباره اثر پیپرین بر فراسنجه های مختلف فیزیولوژیکی در بدن حیوانات وجود دارد (۹، ۳۵). Tripathi و همکاران (۱۳) گزارش کرد که مصرف پیپرین در انسان بر بیان ژن های متعددی اثر کاهشی یا افزایشی دارد. Schulz و همکاران (۱۷) گزارش کرد که پیپرین مانند کورکومین سبب تاثیر بر بیان ژن های آنزیم های آنتی اکسیدانی در بدن زنبور عسل می شود. به نظر می رسد پیپرین با افزایش بیان ژن ویتلوژنین سبب افزایش زنده مانی زنبورهای دریافت کننده ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در لیتر شده است. مطالعات نشان داد که مصرف مقادیر زیاد پیپرین می تواند اثرات منفی بویژه حشره کشی داشته باشد (۳۶، ۳۷). هر چند بیان ژن ویتلوژنین در دوز ۶۰۰۰ میکروگرم در لیتر بیشتر از گروه شاهد بود، به نظر می رسد اثرات منفی پیپرین بر سایر فراسنجه هایی که بر سلامتی زنبور موثرند مانند بیان ژن ویتلوژنین و غلظت مالون دی آلدئید، سبب کاهش زنده مانی زنبورهای در قفس شده است.

در مطالعه حاضر سطح تخمیری ملکه و جمعیت کلنی در کندوهای دریافت کننده پیپرین در دوز ۲۰۰۰ میکروگرم افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد نشان داد. از نظر عددی زنبورهای دریافت کننده دوز ۲۰۰۰ میکروگرم سطح تخمیری و تعداد قاب بیشتری نسبت به کندوهای دریافت کننده دوز ۴۰۰۰ میکروگرم بودند ولی تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در کلنی زنبور عسل، ملکه توسط زنبورهای ملازم با ژل رویال تغذیه میشود و زنبورهای ملازم با تولید ژل رویال و خوراندن آن به ملکه شرایط تخمیری بیشتر را فراهم می کنند (۱). با وارد شدن منابع آنتی اکسیدانی به شربت ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن این زنبورها افزایش یافته و توانسته اند در تعداد کافی با توان بیشتر به تغذیه ملکه پرداخته و سطح تخمیری را افزایش دهند. از طرفی زنبورهای پرستار با تولید ژل رویال و تغذیه شهد و گرده به لاروها، شرایط تغذیهای و فیزیولوژیکی (فرومون لاروها) را برای فعالیت ملکه و تخمیری بیشتر فراهم می کنند (۳). وجود فرومون لاروها ملکه را به تخمیری بیشتر ترغیب می کند و هر چه لاروها بهت تغذیه شوند فرومون بیشتری تولید می کنند و ملکه به تخمیری بیشتر ترغیب می شود. چنین شرایطی در فصل بهار که ورودی گرده و شهد به کلنی زیاد می شود بیشتر دیده می شود (۱، ۳). با توجه به زنده مانی و طول عمر بیشتر و همچنین کمتر بودن سطح مالون دی آلدئید بدن زنبورهای پرستار به نظر می رسد این عوامل سبب بهتر شدن شرایط کلنی ها از نظر جمعیتی بویژه جمعیت پرستار و شرایط بدن زنبورهای پرستار برای فعالیت بیشتر شده و در نهایت بر تخمیری ملکه و سطح لارو و شفیره و جمعیت کلنی اثر گذشته است.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از پیپرین برای افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن، افزایش بیان ژن ویتلوژنین، افزایش زنده مانی و افزایش وزن بدن زنبور در زمان خروج از شفیره اثر مثبت دارد. دوز ۲۰۰۰ تا ۴۰۰۰ میکروگرم پیپرین در لیتر شربت نتایج بهتری نسبت به دوز ۶۰۰۰ میکروگرم نشان داد. در تحقیق حاضر دوز بالاتر از ۴۰۰۰ میکروگرم در لیتر سبب تلفات، کاهش تخمیری و کاهش جمعیت زنبور عسل شد. پیشنهاد می شود در تحقیقات اینده اثر دوزها با دامنه کمتر در محدوده ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ میکروگرم پیپرین در لیتر مورد بررسی قرار گیرد و بیان ژن های آنتی اکسیدانی و آنزیم های آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری واحد علوم و تحقیقات به جهت تصویب و در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاه رازی برای انجام این تحقیق تشکر می شود. از خانم دکتر شورنگ به جهت راهنمایی های ارزنده و در اختیار قراردادن امکانات فارم زنبورداری و کندوهای زنبور عسل تشکر می شود. این مقاله مستخرج از رساله دانشجوی دوره دکتری تخصصی واحد علوم و تحقیقات (خانم زهرا فرهادی) می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله عنوان می کنند که هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Lipinski Z. Honey Bee Nutrition and Feeding. Northern publication. London, UK. 2019.

2. Stabentheiner A, Kovac H, Mandl M, Käfer H. Coping with the cold and fighting the heat: thermal homeostasis of a superorganism, the honeybee colony. Journal of Comparative Physiology A. 2021 ;207(3) :337-51. **DOI: 10.1007/s8-01464-021-00359.**

3. Zhao H, Li G, Guo D, Li H, Liu Q, Xu B, Guo X. Response mechanisms to heat stress in bees. Apidologie. 2021;52(2) :388-99. **DOI: 10.1007/s-00830-020-13592w.**

4. Kühnholz S, Seeley TD. The control of water collection in honey bee colonies. Behavioral ecology and sociobiology. 1997 ;41(6) :407-22. **DOI: 10.1007/s002650050402.**

5. Farjan M, Dmitryjuk M, Lipinski Z, Biernat-Łopienska E, Zółtowska 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**.

6. Brys MS, Skowronek P, Strachecka A. Pollen Diet-Properties and Impact on a Bee Colony. Insects. -82 2021; 12(9) :798. **DOI: 10.3390/insects12090798.**

7. 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. **DOI: 10.1038/srep16224.**

8. Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitaku S, Nychas GJ, Haroutounian SA. Essential oils of Satureja, Origanum, and Thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004 ;52(26) :8261-7. **DOI: 10.1021/jf049113i.**

9. Haq IU, Imran M, Nadeem M, Tufail T, Gondal TA, Mubarak MS. Piperine: A review of its biological effects. Phytotherapy Research. 2021;35(2) :680-700. **DOI: 10.1002/ptr.6855.**

10. Chopra B, Dhingra AK, Kapoor RP, Prasad DN. Piperine and its various physicochemical and biological aspects: A review. Open Chemistry Journal. 2016;(1)1:3-8.

11. Vasavirama K, Upender M. Piperine: a valuable alkaloid from piper species. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014 ;6(4) :34-8.

12. Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, Yang HI, Yoo MC, Hahm DH, Kim KS. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1β-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. Arthritis research & therapy. 2009;(2)1:11-9. **DOI: 10.1186/ar2662.**

13. Tripathi AK, Ray AK, Mishra SK. Molecular and pharmacological aspects of piperine as a potential molecule for disease prevention and management: evidence from clinical trials. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2022 ;11(1) :1-24. **DOI: 10.1186/s1-00196-022-43088.**

14. Umar S, Sarwar AH, Umar K, Ahmad N, Sajad M, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Piperine ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in collagen induced arthritis. Cellular Immunology. 2013;284(2-1):51-9. **DOI: 10.1016/j.cellimm.2013.07.004.**

15. Kapoor IP, Singh B, Singh G, De Heluani CS, De Lampasona MP, Catalan CA. Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (Piper nigrum). Journal of agricultural and food chemistry. 2009;57(12):5358-64. **DOI: 10.1021/jf900642x.**

16. Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of Piper nigrum L. Asian Pacific journal of tropical medicine.2014;7(1):461-8 **DOI: 10.1016/S-1995 3-60275(14)7645.**

17. Schulz M, Łos A, Grzybek M, Scibior R, Strachecka A. Piperine as a new natural supplement with beneficial effects on the life-span and defence system of honeybees. The Journal of Agricultural Science. :140-9 2019;157(2). **DOI: 10.1017/S0021859619000431**

18. Williams GR, Alaux C, Costa C, Csaki T, Doublet V, Eisenhardt D, Fries I, Kuhn R, McMahon DP, Medrzycki P, Murray TE. Standard methods for maintaining adult Apis mellifera in cages under in vitro laboratory conditions. Journal of Apicultural Research. :1-36 2013;(1)52. **DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.04.**

19. Li C, Xu B, Wang Y, Yang Z, Yang W. Protein content in larval diet affects adult longevity and antioxidant gene expression in honey bee workers. Entomologia Experimentalis et Applicata. 2014;151(1) :19-26. **DOI: 10.1111/eea.12167**

20. Draper HH, Hadley M. Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radical Antioxidant. 421-31: 186; 1990. **DOI: 10.1016/0076-6879(90)86135-I.**

21. Do MT, Kim HG, Choi JH, Khanal T, Park BH, Tran TP, Jeong TC, Jeong HG. Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. Food Chemistry. 2013 ;141(3) :2591-9. **DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.04.125.**

22. Harwood G, Amdam G. Vitellogenin in the honey bee midgut. Apidologie. 2021 ;52(4) :837-47. **DOI: 10.1007/s13592-021-00869-3.**

23. Amdam GV, Fennern E, Havukainen H. Vitellogenin in honey bee behavior and lifespan. In Honeybee neurobiology and behavior. Springer, Dordrecht. Germany. 2012.

24. Li X, Ma W, Shen J, Long D, Feng Y, Su W, Xu K, Du Y, Jiang Y. Tolerance and response of two honeybee species Apis cerana and Apis mellifera to high temperature and relative humidity. PLoS One. e2019 ;14(6) ;0217921. **DOI: 10.1371/journal.pone.0217921**.

25. Association of Official Agricultural Chemists, Horwitz W. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists; Washington, DC: USA. 1975.

26. 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): 70-6. **DOI: 10.1006/abio.1996.0292.**

27. 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 18(9);114-9 **DOI: 10.14411/eje.2017.024**

28. Lee SG, Lee MY, Hong IP, Kim NS, Kim HK, Kim GH, Choi YS. Cloning, gene structure of Cu-Zn SOD (SOD1) and thioredoxin reductase (TrxR) from honeybee (Apis mellifera and Apis cerana). Korean Journal of Apiculture. 2010 ;12(1) :12-9. **DOI: 10.1093/jisesa/iev159**

29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods. 2001 ;25(4) :402-8.

30. McAfee A, Metz BN, Milone JP, Foster LJ, Tarpy DR. Drone honey bees are disproportionately sensitive to abiotic stressors despite expressing high levels of stress response proteins. Communications biology. 2022 ;5(1) :1-3. **DOI: 10.1038/s42003-022-03092-7**.

31. Winston ML. The biology of the honey bee. Harvard university press. USA. 1991.

32. Tautz J, Maier S, Groh C, Rössler W, Brockmann A. Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003 ;100(12) :7343-7. **DOI: 10.1073/pnas.1232346100.**

33. Medina RG, Paxton RJ, Hernández-Sotomayor ST, Pech-Jiménez C, Medina-Medina LA, Quezada-Euán JJ. Heat stress during development affects immunocompetence in workers, queens and drones of Africanized honey bees (Apis mellifera L.)(Hymenoptera: Apidae). Journal of Thermal Biology. 2020 ;89(2) :102541. **DOI: 10.1016/j.jtherbio.2020.102541**.

34. Nahak G, Sahu RK. Phytochemical evaluation and antioxidant activity of Piper cubeba and Piper nigrum. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2011 ;30(1) :153-7.

35. Srinivasan K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. Critical reviews in food science and nutrition. -48 2007 ;47(8) :735. **DOI: 10.1080/10408390601062054.**

36. Samuel M, Oliver SV, Coetzee M, Brooke BD. The larvicidal effects of black pepper (Piper nigrum L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of Anopheles malaria vector mosquitoes. Parasites & vectors. 2016 ;9(1) :1-9. **DOI: 10.1186/s13071-016-1521-6.**

37. Tavares WS, Cruz I, Petacci F, Freitas SS, Serrão JE, Zanuncio JC. Insecticide activity of piperine: Toxicity to eggs of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) and Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables. Journal of Medicine Plants Research. 2011;5(21) :5301-6. **DOI: 10.5897/JMPR.9000814.**

38. Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, Evans JD, Jiang H. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. Insect Molecular Biology. 2006;15(5) :603-14. **DOI: 10.1111/j.1365-2583.2006.00684.x.**