اثرتغذیه سطوح مختلف پروتئین بر الگوی پروتئین همولنف زنبورعسل آپیس ملیفرا

لیلا اسکندری [۱*]، غلامرضا قلمکاری[۲] ، عباسعلی قیصری [۳]

چکیده

تحقیق حاضر به منظوربررسی تغییرات پروتئین همولنف دراثرتغذیه با سطوح مختلف پروتئین زنبورعسل انجام شد.این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمارشامل سطوح مختلف پروتئین (۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد)و ٤ تکرار در شرایط انکوباتور انجام گرفت.جهت تفکیک پروتئین های استخراج شده از روش الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) استفاده شد. همچنین مصرف خوراک در دوره آخر آزمایش (۱۲-۹ روزگی) در گروه شاهد نسبت به دیگر تیمارها کمتر بود($p<۰/۰۵$). بیان پپتیدهای ضد باکتریایی دیفنسین و آباسین در همولنف در سن ۱۲ روزگی بین تیمارهای آزمایشی از لحاظ آماری معنی دار شد ($p<۰/۰۰۰۱$). و تیمار ٪۱۰ پروتئین بیشترین و گروه شاهد کمترین مقدار بیان را در پپتید دیفنسین نشان دادند (به ترتیب، ۲۲۹۳ واحد برابر ۱٤۱۲ واحد) و در مورد پپتید آباسین، تیمار ٪۵ پروتئین بیشترین مقدار بیان و تیمار شاهد و ٪۲/۵ پروتئین کمترین مقدار بیان را نشان دادند (به ترتیب برابر ۱۹۷۰ واحد در برابر ۱۲۵۷ و صفر) ($p<۰/۰۰۰۱$). به طور کلی نتایج نشان داد که الگوی پروتئینی همولنف زنبور با مصرف سطوح مختلف پروتئین تغییر و بهبود پیدا کرد.

واژگان کلیدی: تغذیه، پروتئین همولنف، زنبور عسل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲۷

مقدمه

میزان پروتئین در رشد و نگهداری کلنی ها یک عامل محدود کننده می باشد و به طور معمول از گرده گیاهان ،برای تولید نوزادان زنبورعسل استفاده می شود. پروتئین مهمترین عاملی است که طول عمر زنبورهای متولد شده را تحت تاثیر قرار میدهد هر چه پروتئین بدن بالاتر رود به همان میزان طول عمر زنبورها افزایش می یابد.(٤ و ١٦).کامل شدن عضلات پروازی، توسعه غدد شیری و فعالیت های متابولیکی زنبورهای جوان ارتباط مستقیم با میزان پروتئین گرده و جیره غذایی دارد (٦ و ٨ و١٣).با استفاده از اندازه‌گیری میزان پروتئین همولنف در زنبور عسل، به مقایسه و تاثیر استفاده از منابع مختلف پروتئینی به جای گرده گل در رژیم غذایی زنبورعسل پرداخته شده است. بنابراین تعیین سطح تغییرات پروتئین در همولنف زنبور عسل یک روش سریع و مطمئن برای ارزیابی کیفیت جیره‌های غذایی تلقی می‌شود (۷). در بررسی پروتئین‌های استخراج شده از همولنف زنبور عسل، تعداد ۸ پروتئین اصلی شناسایی و عملکرد آن‌ها در سیستم ایمنی بدن زنبور عسل بررسی شده است. با توجه به مطالعات انجام شده بر روی این پروتئین‌ها، مشخص گردیده است که بسیاری از این پروتئین‌ها نه تنها تحت شرایط مشخص در زنبور عسل، بلکه در موجودات دیگر نیز بیان می‌گردند (۱۸).از مشخص-ترین و پراهمیت‌ترین پروتئین‌های موجود در سیستم همولنف زنبور عسل می‌توان به آباسین، دیفنسین، هیمنوپتاسین، فنول‌اکسیداز، کربوکسیل‌استراز، آپولپ، ترانسفرین، ویتلوژنین، هگزامرین و پروتئین فتی اسید بندینگ اشاره کرد.آباسین ، دیفنسین، هیمنوپتاسین سه پپتید ضد باکتریایی در همولنف زنبورعسل هستند که برای مقابله با بیماری و دفع عفونت استفاده می شوند و بوسیله مشارکت این سه پپتید لاروهای زنبورعسل در شرایط پرورشی به واکنش های یکسان برای ضدعفونی کردن پاسخ می دهند (۱۸).پپتیدهایی که در همولنف بندپایان وجود دارند به عنوان یک عامل ضد میکروبی عمل می کنند که این امر موجب افزایش قدرت ایمنی در زنبورعسل خواهد شد (۹).طبق مطالعات صورت گرفته (١٤) در مطالعه واکنش

*۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد ،دانشکده کشاورزی، واحد خوراسگان ،گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی،ایران (Le.eskandari94@yahoo.com)

۲- دانشیار فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی ، واحد خوراسگان ،گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی،ایران

۳- عضو هیأت علمی، گروه علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان ،ایران

های ایمنی بر روی آپیس ملیفرا ،پپتید آباسین موجود در همولنف زنبورعسل به طور مستقیم در ایمنی نقش داشته و سطح رونوشت این پپتید تحت تاثیر چندین ژن با فعل و انفعالات پیچیده گزارش شد.همچنین در مطالعه کوئین وهمکاران مشاهده شد که تغییراتی در میزان پپتید آباسین و دیفنسین در حضور باکتری پانی باسیلوس لاروا ایجاد می شود که بیشترین میزان سطوح رونوشت ، مربوط به آباسین می باشد. این پژوهش با هدف بررسی تغییرات پروتئین همولنف زنبور عسل و نسبت آن با طول عمر زنبورعسل در اثر استفاده از سطوح مختلف پروتئینی بود.

مواد و روش‌کار

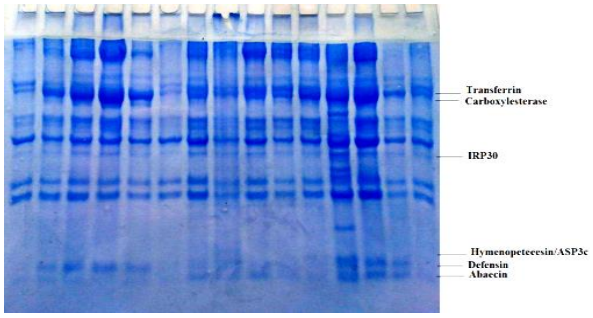
به منظور ارزیابی اثرات بررسی تغییرات پروتئین همولنف زنبور عسل و ارتباط آن با طول عمر زنبور عسل ، آزمایش حاضر به صورت یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ٤ تکرار در انکوباتور ویژه زنبورعسل انجام شد. شرایط انکوباتور در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ٦۰-۵۰ درصد با تهویه مناسب تنظیم شد. برای انجام آزمایش یک ماه قبل از اجرای طرح، مقدمات استفاده از اتاق انکوباتور شامل آماده کردن قفسه‌های پرورش زنبور، قرار دادن شان تغذیه و شان استراحت، ظروف آب، ضد عفونی قفسه‌ها و انکوباتور انجام شد.در هر مرحله زنبوران متولد شده از ملکه‌های خواهری یک روزه به تعداد ۱۰۰ عدد به داخل هر قفسه ریخته شد و به صورت تصادفی داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس ۵ نوع جیره غذایی با سطوح پروتئین مختلف (۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد)در اختیار زنبوران در کل دوره آزمایش و بصورت روزانه در اختیار زنبوران قرار داده شد. در مرحله اول میزان مصرف خوراک روزانه هر کندوچه ثبت شد. همچنین روزانه تلفات زنبوران هر کندوچه خارج و ثبت شد تا میزان زنبوران داخل هر قفس به نصف کاهش یابند و به این طریق میزان نیمه عمر زنبوران محاسبه شد. در مرحله دوم مانند مرحله اول آزمایش تکرار شد و در زمان های ٤،۸،۱۲ روز نمونه های زنبورعسل از کندوچه ها خارج و به آزمایشگاه منتقل شدند و در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد. بعد از استخراج همولنف در سه بازه زمانی (۱۲ ،۸، ٤ روزگی) ،غلظت پروتئین‌های آن ها ۳ روز بعد بوسیله آزمایش بردفورد و پروتئین‌های استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) تعیین شد (١٤). محلول‌های پروتئین استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و میزان جذب نور توسط دستگاه با طول موج ۵۹۵ اندازه گیری شد. برای هر نمونه یک استاندارد ثبت شد و با استفاده از غلظت پروتئین‌های مشخص شده خط رگرسیون ترسیم شد و منحنی استاندارد با رسم مقادیر خوانده شده توسط دستگاه در مقابل غلظت‌های معلوم آن‌ها رسم شد. سپس معنی‌دار بودن ضریب رگرسیون و عرض از مبدأ این خط آزمون گردید. پس از مشخص شدن معادله نهایی خط، غلظت پروتئین در نمونه‌های مورد بررسی تعیین شد(۱). سپس پروتئین‌های همولنف زنبور روی ژل برده شد و جهت تفکیک پروتئین‌های استخراجی از روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) استفاده شد. برای SDS معمولی (یک بعدی دارای چاهک) از دو ژل بنام ژل متمرکز کننده (ژل بالا) و ژل جدا کننده (ژل پایین) جهت تفکیک پروتئین‌ها استفاده شد. ژل متمرکز کننده شامل آب مقطر، بیس اکریلامید، Tris-HCL ۱/۵ مولار با PH ۸/۸، SDS۱۰٪، APS۱۰٪ و ژل جداکننده شامل آب مقطر، بیس اکریلامید ، Tris-HCL ۱ مولار با PH ٦/۸، SDS۱۰٪، APS۱۰٪ و TEMED است. ژل پایین ۱۲ درصد و ژل بالا ۵ درصد است. پس از آماده سازی نمونه‌ها در بافر(برومو فنول بلو، گلیسرول، اوره، SDS،

۱/۵Tris-HCL مولار با PH۸ و بتامرکاپتواتانول) مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بارگذاری شد. به منظور تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها، یک نشانگر دارای پروتئین‌هایی با وزن ملکولی مشخص (پروتئین‌های اوترانسفرین، آلبومین گاوی، اوآلبومین، اکتینیدین، بتامرکاپتو-اتانول، لاکتو گلوبولین و لیزوزیم) در اولین چاهک بارگیری شد. الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ ولت در ژل متمرکز کننده به مدت نیم ساعت و با ولتاژ ۱۵۰ ولت در ژل جداکننده به مدت یک و نیم ساعت انجام شد (۲). پس از رسیدن سطح رنگ به انتهای ژل، جریان برق قطع شده و ژل از دستگاه خارج شد. برای ظاهر سازی باندهای پروتئین، رنگ آمیزی ژل توسط کوماسی بریلیانت بلو۲۵۰ -R (آب مقطر، متانول، استیک اسید گلاسیال و کوماسی بریلیانت بلو(۲۵۰-R) انجام گرفته و ژل به مدت یک ساعت درون این محلول روی دستگاه همزن مغناطیسی قرارمی‌گیرد. به منظور وضوح باندهای پروتئین، رنگ‌زدایی در محلول رنگبر (آب مقطر، متانول و استیک اسید گلاسیال) به مدت ۳-۲ ساعت قرار گرفت تا زمینه ژل کاملا شفاف شد. سپس ژل اسکن شده و مورد مطالعه قرار گرفت (۵). برای آنالیزداده ها از نرم افزار SAS رویه GLM استفاده گردید و مقایسه بین میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح P≤۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

پپتیدهای شناسایی شده در همولنف زنبورهای عسل

در بررسی پروتئین‌های استخراج شده از همولنف زنبور عسل (شکل ٤-۲)، تعداد شش پروتئین اصلی شناسایی و عملکرد آن‌ها در سیستم ایمنی بدن زنبور عسل بررسی شد. با توجه به مطالعات انجام شده بر روی این پروتئین‌ها، مشخص گردیده است که بسیاری از این پروتئین‌ها نه تنها تحت شرایط مشخص در زنبور عسل، بلکه در موجودات دیگر نیز بیان می‌گردند (۱۸) که این خود واجد اهمیت است. از مشخص‌ترین پروتئین‌های موجود در سیستم همولنف زنبور عسل که در تحقیق حاضر مورد شناسایی قرار گرفتند آباسین، دیفنسین، هیمنوپتاسین، IRp30، کربوکسیل استراز، ترانسفرین بودند.



نگاره۱- مکان و موقعیت پروتئین‌های شناسایی شده در همولنف زنبور عسل تغذیه شده با تیمارهای مختلف.

اثر تغذیه سطوح مختلف پروتئین برالگوی پروتئین همولنف

با توجه به نتایج بدست آمده از جدول (۱)، بیشترین بیان پپتید ترانسفرین مربوط به سطوح ۲/۵ و ۵ درصد تیماری در روز چهارم نشان داده شد. (P<۰/۰۰۰۱) و تیمار شاهد نسبت به سایر سطوح کمترین میزان بیان را داشت.پپتید کربوکسیل استراز، هیمنوپتاسین و دیفنسین هیچ بیانی در روز چهارم استخراج در هیچ سطح تیماری مشاهده نشد.روند افزایشی در سطوح ۷/۵ تا ۱۰ درصد پروتئین پپتید IRP30 مشاهده گردید که بیانگر افزایش بیان این پپتید با افزایش سطوح پروتئینی بود. لازم به ذکر است که میزان بیان این پپتید در سطوح تیماری ۲/۵ و ۵ درصد پروتئین نسبت به شاهد کمتر بود.در آنالیز بیانی پپتید آباسین در روز چهارم، سطح ۲/۵ درصد پروتئین بیان کمتری را

نسبت به شاهد نشان داد ولی اختلاف معنی داری بین دیگر سطوح پروتئین با شاهد وجود نداشت.

جدول۱- مقایسه میانگین اثرات تغذیه ای سطوح مختلف پروتئین روی پپتیدهای همولتف در سن ٤ روزگی زنبوران عسل

صفت / سطوح پروتئینی جیره(٪)	پپتید ترانسفرین	پپتید IRP30	پپتید آباسین
جیره ۲/۵ ٪ پروتئین	۱۵۰۵^{b}	٤۲٦^{E}	۱۰٤^{E}
جیره ۵ ٪ پروتئین	۱۵۸۸^{a}	۵۳٦^{d}	۹٦۱^{c}
جیره ۷/۵ ٪ پروتئین	۱۱۹٦^{c}	۷۳۷^{b}	۷۱۵^{d}
جیره ۱۰ ٪ پروتئین	۱۱۳۸^{d}	۹۷۵^{a}	۱۰٦۷^{a}
جیره بدون پروتئین (شاهد)	۸۰۰^{E}	۵٦٦^{c}	۹۹۱^{b}
خطای معیار	۷۵/۳۲	۳۸/۹۸	۰
سطح احتمال	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

- درهر ستون میانگین‌هایی با حروف غیر مشترک با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ($p<۰/۰۵$).

نتایج حاصل از جدول (۲)،در روز هشتم تولد بیان های متفاوتی را بین سطوح تیماری در پپتیدهای مورد بررسی نشان داد. به طوریکه بیان پپتید ترانسفرین در سطح ۱۰٪ پروتئین بیان معنی داری را با شاهد مشاهده نشد. ($p>۰/۰۵$).

در ارتباط با پپتید کربوکسیل استراز تنها در سطح تیماری ۷/۵ درصد بیان بسیار معنی داری مشاهده شد.و در شاهد و دیگر سطوح پروتئینی بیانی مشاهده نشد.بیشترین بیان در پپتید IRP30 مربوط به سطح تیماری ۲/۵ درصد و کمترین آن مربوط به شاهد بدست آمد. پپتید هیمنوپتاسین در روز هشتم استخراج تنها در سطح ۷/۵ درصد پروتئین بیان بسیار بالایی را نشان داد. ولی در شاهد و دیگر سطوح پروتئینی بیانی مشاهده نشد.با توجه به بررسی های انجام شده در ارتباط با پپتید دیفنسین، بیان این پپتید در سطوح ۷/۵ و ۱۰ بسیار بالاتر از شاهد بدست آمد. که این ارتباط در مورد پپتید آباسین نیز مشاهده گردید. قابل ذکر است که در سطوح ۲/۵ و ۵ درصد تیماری بیان کمتری در پپتید آباسین نسبت به شاهد مشاهده گردید.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات تغذیه ای سطوح مختلف پروتئین روی پپتیدهای همولنف در سن ۸ روزگی زنبوران عسل

صفت / سطوح پروتئینی جیره(٪)	پپتید ترانسفرین	پپتید IRP30	پپتید دیفنسین	پپتید آباسین
جیره ۲/۵ ٪ پروتئین	۸٦٦^{c}	۱۰۳۷^{a}	۰^{d}	۲۳۹^{E}
جیره ۵ ٪ پروتئین	۸۳۰^{d}	۵۹۹^{d}	۰^{d}	۳٤۸^{d}
جیره ۷/۵ ٪ پروتئین	۷۹٦^{E}	۸٤۹^{c}	۸۲۸^{b}	۱۰٦۷^{b}
جیره ۱۰ ٪ پروتئین	۱۰۷۵^{a}	۹۱٦^{b}	۱۱۰۲^{a}	۱۱۰۷^{a}
جیره بدون پروتئین (شاهد)	۹۱۱^{b}	٤۸۰^{E}	۲۵۹^{c}	۵۰٦^{c}
خطای معیار	۲٦/۰۹	٤۲/۰۱	٦۹/٤۵	۱۱۷/۵۹
سطح احتمال	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

- درهر ستون میانگین‌هایی با حروف غیر مشترک با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ($p<۰/۰۵$).

بر اساس نتایج بدست آمده از جدول (۳) در روز دوازدهم تولد پپتید ترانسفرین در سطوح ۵ و ۷/۵ درصد پروتئین بیشترین بیان را نسبت به شاهد و در سطوح ۲/۵ و ۱۰ درصد پروتئین کمترین بیان را نسبت به شاهد دادند. در بیان پپتیدهای کربوکسیل استراز و هیمنوپتاسین تنها سطح ۱۰ درصد پروتئین تفاوت معنی داری نشان داد و در مقابل شاهد و دیگر سطوح پروتئین در این پپتید اختلاف معنی داری مشاهده نشد. بررسی های انجام شده در ارتباط با پپتید IRP30 نشان داد که تنها افزایش بیان در سطح ۱۰ درصد تیماری اتفاق افتاده است. و سایر سطوح تیماری تفاوت معنی داری را با شاهد وجود نداشت. آنالیزهای انجام شده در ارتباط با پپتید دیفنسین نشان داد که افزایش ۱۰ درصدی سطح تیماری افزایش اختلاف معنی داری در بیان این پپتید نشان می دهد. این روند در ارتباط با پپتید آباسین نیز قابل انطباق می‌باشد با این تفاوت که در پپتید آباسین اختلاف معنی داری در سطح تیماری ۲/۵ درصد مشاهده نشد. قابل ذکر است که در این دو پپتید میزان بیان شاهد نسبت سایر سطوح تیماری کمتر برآورد گردید.

میزان مصرف خوراک

مقایسه میانگین سطوح مختلف جیره ی پروتئینی و شاهد در میزان مصرف خوراک زنبور عسل در ٤-۰، ۸-۵ و۱۲-۹ روزگی در جدول(۵) آورده شده است.بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز آماری: مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی نشان داد که در مجموع غذای مصرف شده در دوره ۱۲-۹ روزگی بطور معنی داری تحت تاثیر جبره های آزمایش قرار گرفت ($p<۰/۰۵$). بیشترین مصرف غذا مربوط به سطح ۵درصد پروتئین. (۰/۸۹۰۰گرم) و کمترین میانگین مصرف خوراک مربوط به تیمار شاهد و برابر۰/۱۰۷۵ گرم بود.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات تغذیه ای سطوح مختلف پروتئین روی پپتیدهای همولتف در سن ۱۲روزگی زنبوران عسل

صفت / سطوح پروتئینی جیره(٪)	پپتید ترانسفرین	پپتید IRP30	پپتید دیفنسین	پپتید آباسین
جیره ۲/۵ ٪ پروتئین	۱۲۳۹^{d}	۱۳۲۵^{b}	۲۱۸۲^{b}	۰^{E}
جیره ۵ ٪ پروتئین	۱٦٦۷^{b}	۹۱۷^{d}	۱۸۱۸^{c}	۱۹۷۰^{a}
جیره ۷/۵ ٪ پروتئین	۱۸۱۹^{a}	۱۲۵۵^{c}	۱۷۲۳^{d}	۱۵٦۸^{c}
جیره ۱۰ ٪ پروتئین	۱۲۰٦^{E}	۲۱۵۲^{a}	۲۲۹۳^{a}	۱۷۱۹^{b}
جیره بدون پروتئین (شاهد)	۱٤٦۱^{c}	۱۲٦۲^{c}	۱٤۱۲^{E}	۱۲۵۷^{d}
خطای معیار	٦۳/٦٤	۱۰۹/۷٤	۲۰۳/۷٦	۸۵/۳۱
سطح احتمال	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

- درهر ستون میانگین‌هایی با حروف غیر مشترک با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ($p<۰/۰۵$).

میزان تلفات

مقایسه میانگین سطوح مختلف جیره ی پروتئینی و شاهد بر تلفات زنبورعسل در سنین ٤-۰، ۸-۵ و۱۲-۹ روزگی در جدول (۵) آورده شده است. براساس اطلاعات به دست آمده مقایسه تیمارهای آزمایشی و شاهد در سن ۸-۵ روزگی تفاوت معنی داری روی تلفات زنبورعسل نشان داد($p<۰/۰۵$).بیشترین تلفات مربوط به تیمار شاهد(۱۰/۵۰۰ درصد) بود.کمترین تلفات مربوط جیره غذایی سطح ۷/۵ (۱/۲۵۰ درصد) بود. در سن ٤-۰

جدول٤: ترکیبات غذایی جیره های مورد استفاده

جیره	پودرقند	عسل	نشاسته	گرده	کنجاله سویا	گلوتن گندم	شیرخشک	مخمر نانوایی	پودرزرده تخم مرغ
١	٧٨	٤٢	٥٥	٢٥	٠	٠	٠	٠	٠
٢	٧٨	٤٢	٤٤/٤	٢٥	٢/٢	٢/٢	٢	٢	٢
٣	٧٨	٤٢	٣٣/٨	٢٥	٤/٤	٤/٢	٤/٢	٤/٢	٤/٢
٤	٧٨	٤٢	٢٣/٢	٢٥	٦/٤	٦/٤	٦/٤	٦/٤	٦/٤
٥	٧٨	٤٢	١٥/٨	٠	٢٠	١١	١١	١١/٢	١١

- جیره های غذایی ٥،٤،٣،٢،١ به ترتیب دارای سطوح ٧/٢،٥،٥/٥، ١٠، صفر درصد پروتئین می باشند

جدول ٥ –مقایسه میانگین سطوح مختلف پروتئین جیره روی مصرف خوراک و تعداد تلفات زنبوران عسل

سطوح پروتئینی جیره(٪) / صفت	تعداد تلفات ٤-٠ روزگی (٪)	تعداد تلفات ٨-٥ روزگی (٪)	تعداد تلفات ١٢-٩ روزگی (٪)	مصرف خوراک ٤-٠ روزگی (گرم)	مصرف خوراک ٨-٥ روزگی (گرم)	مصرف خوراک ١٢-٩ روزگی (گرم)
جیره ٢/٥ ٪ پروتئین	٠/٥٠	٥	١١/٧٥	٢/٣٢	١/٥٤	٠/٧١
جیره ٥ ٪ پروتئین	٢/٧٥	٤	١٠/٢٥	٢/٠١	١/٨١	٠/٨٩
جیره ٧/٥ ٪ پروتئین	١	١/٢٥	٩	٢/٠٧	١/٠٨	٠/٥٥
جیره ١٠ ٪ پروتئین	٠/٧٥	٣/٧٥	٩/٢٥	١/٦٦	١/٢٧	٠/٢٥
جیره بدون پروتئین (شاهد)	٣/٥٠	١٠/٥٠	٧/٥٠	١/٧٠	١/٣٧	٠/١٠
خطای معیار	٠/٤١٧	١/٢٧٢	٠/١٠١	٠/١٢٩	٠/١٠٨	٠/٠٩٠
سطح احتمال	٠/٠٥٩٩	٠/٢١٦٢	٠/٨٣٧٦	٠/٥٠٤٧	٠/٢٦٩٥	٠/٠٢٧٩

- درهر ستون میانگین‌هایی با حروف غیر مشترک با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ($p<٠/٠٥$).

روزگی مقایسه اثر جیره ی سطوح مختلف پروتئینی با شاهد نشان داد که بیشترین تلفات مربوط به تیمار شاهد (٣/٥٠٠ درصد) و کمترین تلفات مربوط به تیمار ٢/٥ درصد پروتئینی بود ($p<٠/٠٥$).البته نسبت به شاهد تفاوت معنی داری را نشان ندادند.

بحث

پپتیدهایی که در همولنف بندپایان وجود دارند به عنوان یک عامل ضد میکروبی عمل می‌کنند که این امر موجب افزایش قدرت ایمنی در زنبور عسل خواهد شد (١٠).نتایج جدول(٢)مربوط به مقایسه میانگین اثرات تغذیه ای سطوح مختلف پروتئین روی پپتیدهای همولنف درسن ٤روزگی زنبوران عسل نشان داد که تفاوت معنی داری در بیان پپتید ترانسفرین وجود دارد. دو پروتئین آباسین و دیفنسین، از

جمله پروتئین‌های بسیار حائز اهمیت در سیستم ایمنی و طول عمر زنبور عسل هستند که دارای اثرات ضد باکتریایی بالایی می‌باشند. این دو پروتئین از نظر اندازه دارای طول بسیار کوچک‌تر (۵-٤ کیلودالتون) نسبت به سایر پروتئین-های موجود در همولنف بوده و مقدار بیان این دو پروتئین در اندازه بسیار کمتر نسبت به سایر پروتئین‌ها می‌باشد ولی اثرات بسیار مهمی در سیستم ایمنی ایفا می‌کنند. پپتید هیمنوپتاسین نیز با اندازه‌ای کوچکتر و در ارتفاعی پایین‌تر از پپتید فتی اسید بندینگ قرار می‌گیرد این در حالی است که عملکرد این دو پپتید تقریباً مشابه بوده و به عنوان عوامل ضد میکروبی فعالیت می‌کنند. واکنش‌های ایمنی بر روی آپیس ملیفرا، پپتید آباسین موجود در همولنف زنبور عسل به طور مستقیم در ایمنی نقش داشته و سطح رونوشت این پپتید تحت تأثیر چندین ژن با فعل و انفعالات پیچیده گزارش شد. همچنین در مطالعه کوئین و همکاران مشاهده شد که تغییراتی در میزان پپتید آباسین و دیفنسین در حضور باکتری پانی باسیلوس لاروا ایجاد می‌شود که بیشترین میزان سطوح رونوشت، مربوط به آباسین می‌باشد.بنابراین در این تحقیق بیشترین میزان بیان پپتید ترانسفرین در سطوح ۲/۵ و ۵ نشان داده است.نتایج جدول(۲)مربوط به مقایسه میانگین اثرات تغذیه ای سطوح مختلف پروتئین روی پپتیدهای همولنف درسن ۸ روزگی زنبوران عسل نشان داد که تفاوت معنی داری در بیان پپتید IRp30 وجود دارد. زنبورهای کارگر بالغ جوان بوسیله طیف گسترده‌ای از واکنش‌های ایمنی، عکس‌العمل‌هایی نشان می دهند که شامل فعال‌سازی پروفنول اکسیداز و ایمنی هومورال می‌باشد. همچنین در زنبورهای عسلی که درگیر پاسخ های ایمنی هستند مشاهده شده که حداقل هفت پروتئین به طور پیوسته در همولنف آن‌ها وجود دارد. سه مورد از این پروتئین‌ها مشخصاً سبب بیان هیمنوپتاسین در لاروها می‌شوند و چهار مورد دیگر که شامل پروتئین‌های فنول اکسیداز، پپتیدگلیکان ریکوگنیشن۲-S، کربوکسیل استراز و آپیس اسپیسیفیک هستند در زنبورهای بالغ به هیچ کارکردی اختصاص داده نشده‌اند (۱۸).که بیشترین میزان بیان پپتید IRp30 را در سطح ۲/۵ درصد پروتئینی داشته است.مطالعات معدودی در مورد ارتباط میان تغذیه پروتئین و ایمنی حشرات انجام گرفته است. مقدار پروتئین و تنوع رژیم غذایی در زنبور عسل آپیس ملیفرا می‌تواند شکل سیستم ایمنی پایه توسط اندازه‌گیری فراسنجه‌های ایمنی فردی را تغییر دهد و فعالیت گلوکز اکسیداز، زنبور عسل را قادر به استریلیزه کردن کلنی و غذای نوزاد کرده و به عنوان یک فراسنجه ایمنی اجتماعی عمل می‌کند.افزایش مقدار پروتئین‌های رژیم غذایی باعث افزایش سیستم ایمنی پایه نمی‌شود اما سیستم ایمنی پایه فردی و اجتماعی سبب تعدیل پروتئین‌های غذا می‌گردد. هرچند که تنوع رژیم غذایی باعث افزایش سطوح سیستم ایمنی پایه می‌شود. فعالیت گلوکز اکسیداز در القای تغذیه‌ای پلی‌فلورابه طور خاص در مقایسه با القای تغذیه منوفلورا غنی‌تر است. این نتایج نشان‌دهنده ارتباط میان تغذیه پروتئین و ایمنی در زنبور عسل است که در بررسی تأثیرات رژیم غذایی بر روی سیستم ایمنی زنبور عسل بدست آمد.در این مطالعه، از بین پپتیدهای موجود در همولنف و دخیل در سیستم ایمنی زنبور عسل، میزان تغییرات بیان شش پپتید (آباسین، دیفنسین، هیمنوپتاسین، IRp30، کربوکسیل استراز، ترانسفرین) مورد بررسی قرار گرفت و پس از آنالیز حجم بیان پپتیدهای آباسین، دیفنسین، هیمنوپتاسین، IRp30، کربوکسیل استراز و ترانسفرین، نمودار مقایسه‌ای بین سنین مختلف برای میزان بیان پپتیدهای فوق، رسم و نتایج بدست آمده مقایسه شدند.که بیشترین میزان بیان پپتید دیفنسین در سطوح ۱۰ درصد پروتئین داشت.و میزان بیان پپتید آباسین بیشترین میزان بیان رادر سطح ۵ درصد داشته است . که با افزایش سن زنبور افزایش معنی داری را نشان دادند.بابررسی این تحقیق حاضر به دست آمده الگوی

پروتئینی همولنف و همچنین طول عمر با مصرف سطوح مختلف پروتئینی باعث تغییر وبهبود می‌شود. در ساختار مواد تشکیل دهنده بره موم موادی از قبیل رزین، واکس، عسل، وانیلین وترکیبات معطری حضور دارند که می توانند باعث خوش خوراکی شدن جیره غذایی وتحریک اشتها شوند (۵)گزارش کردند از عوامل افزایش دهنده مصرف غذا حضور مواد فلاونوئیدی در بره موم می باشد. همچنین افزایش مصرف غذا به دلیل بهبود در سلامتی و نیز به خاطر آنتی اکسیدانی و ضد التهابی بره موم است که در نهایت موجب افزایش تمایل به مصرف خوراک گردد (۱۵).طبق نتایج به دست آمده جدول (۵) مربوط به مقایسه میانگین سطوح مختلف جیره ی پروتئینی روی مصرف خوراک زنبوران عسل نشان داد که در مجموع غذای مصرف شده در ۱۲-۰ روزگی اثر معنی داری روی مصرف خوراک زنبورعسل نشان داد.در نتیجه بیشترین میزان مصرف خوراک مربوط به سطح ۵ درصد پروتئین می باشد.. نتایج حاصل نشان می دهد که هرچه میزان پروتئین موجود در خوراک بیشتر باشد در نهایت موجب افزایش تمایل به مصرف خوراک گردد. بر اساس اطلاعات صورت گرفته (۱۲) طول عمر یک زنبورعسل کارگر معمولا ۴۰-۳۰ روز است . کارگران پرستار (جوان) کمتر از ۲۰ روز عمر در حالیکه زنبورعسل بالغ بیست روز عمر دارند .سطوح آزمایشی یا درصد پروتئینی سبب کاهش طول عمر زنبوران نگهداری شده در کندوچه شده است.

گرده گل به عنوان یک منبع غنی از پروتئین دارای خاصیت محرک طبیعی و جاذب که به صورت مکمل گرده با همراه جانشینی گرده به عنوان تغذیه تکمیلی زنبوران عسل استفاده می گردد و تخم گذاری ملکه و پرورش نوزادان را افزایش می دهد.ترکیبات مغذی دانه گرده باعث افزایش طول عمر می شود.دانه های گرده یک غذای پر ارزشی تشکیل داده که شامل کربوهیدراتها ،پروتئین ها،چربی ها،مواد معدنی و آب هستند (۱۱).

بیشترین تلفات مربوط به سطوح صفر (شاهد) درصد بود. و کمترین تلفات مربوط جیره غذایی سطح ۷/۵ درصد پروتئینی بود .طبق جدول (۵) نتایج نشان داد کاهش تلفات زنبور عسل با مصرف سطوح مختلف پروتئین باعث افزایش طول عمر، تغییر وبهبود پیدا کرد.

فهرست منابع

1. Sayedi N, Jalali GH, Moghadam M, Tabari M, Mohamadi A. Application of seed storage proteins ersity three populations of wild Plant Biology. 1389;2 (6):1-14.
2. Seyavoshi Y, Bahreyni Behzadi M, Behjanian Esfahani M. Investing changes in bee mammary gland proteins sodium acrylamide gel sulfide gel electrophoresis at dif ferent ages. Journal of Animal Research . 1396;30(4) : 1-18.
3. Rahimi SH. Effect protein Material services published on the amount of feed carcass protein, infant rearing and the growth of the European bee colony population. (Apis mellefar), Iranian jornal of Animal Sciene. 1384; 46(3): 345-355.
4. Abasiyan AR. The effect of different protein sources on the amount of dry matter,protein,carcass fat and bee length. Articles Summary of the Bee Research Seminar; 1376.
5. Mirzaei nodoshan H, Shariat A & Asadi karam F. Electrophoresis Of hawthorn species. Genetic research and improvement of rangeland and forest plants in Iran. Forset and Rangeland Research Intitute Publications. 1380; 7: 99-117.

6. Alqarni AS. Influence of some protein diet on the longevity and some physiological. conditions of Honeybees Apis mellifera L. workers . International Journal of Biological Sciences . 2006; 6(10): 734-737.
7. Basualdo M, Barraga S, Vanagas L, Garci, C, Solana H . Conversion of High and Low Pollen Protein Diets Into Protein in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) . Journal of Economic Entomology. 2013 ; 106(4):1553-8.
8. Hoover SE, Higo HA, Winston ML. Worker honeybee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition, Journal of Comparative Physiology B . 2006;176: 55-63.
9. Kirill A, PluzhnikovSergey A, KozlovAlexander A, VassilevskiOlga, V.,VorontsovaAlexei, V, FeofanovEugene V. Linear antimicrobial peptides from Ectatomma quadridens ant venom.journal Biochimie. 2014;107:211-215.
10. Muneer S, Jeong BR. A proteomic approach identifies novel proteins and metabolites for lesion mimic formation and disease resistance enhancement in rice. journal.pone. 2011; 10(7): 1- 18.
11. Nicolson s, Neves DS, Human H, Christian WW. Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees(Apis mellifera scutellata). Journal of Insect Physiologyjournal. 2018;107:302-308.
12. Ohashi k, Natori S, Kubo T. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (Apis mellifera L.) .European Journal of Biochemistry. 2001; 127-131.
13. Pernal SF, Currie RW. Pollen Quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees(Apis mellifera L).Apidologie . 2000;31: 387-409.
14.Queenie WT. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, Paenibacillus larvae. BMC Genomics. 2009; 10: 340-378.
15. Standifer LN, Macdonald RH, Levin D. Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (Apis mellifera). Apidologie. 2017;48 (11):425–436.
16.Somerville D.Honeybee nutrition and supplementary feeding .NSW.Agriculture (agonte) Goulburn.2000.
17.Vidauab C, Panekab J, Texier C.Differential proteomic analysis of midguts from Nosema ceranae-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. Journal of Invertebrate Pathology. 2014; 12(1):89-96.
18. Zeng Y, Ping X, Cao G. Hemolymph protein profiles of subterranean termite Reticulitermes flavipes challenged with methicillin resistant Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa. Scientificreports. 2018; 8:1-18.