15(1) 237-244, Spring 2023

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of different levels of *Rosa canina* hydroalcoholic extract on the development of hypopharyngeal glands, growth parameters and honey production of honey bee colonies (*Apis mellifera*)

Roghayeh Shahbazzadeh [1], Yousef Jafari Ahangari [1], Hossein Mohebodini [*2], Behrouz Dastar [1], Reza Ashrafi Parchin [3]

[1]Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Department of Animal Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[3]Excir Faravaran Sabalan Company, Science and Technology Park, Ardabil, Iran

Key Words
Colony Performance
Honey Bee
Hypopharyngeal Glands
Production
Rosa canina extract

Abstract

Introduction: Today, for the preservation and survival of honey bee colonies, special attention has been paid to the nutrition of colonies with extracts of medicinal plants. In this experiment, the effect of different levels of *Rosa canina* hydroalcoholic extract on population, queen egg laying, brood rearing, honey production and development of the hypopharyngeal glands of honey bee colonies (*Apis mellifera*) were studied during summer in an apiary in Ardabil province.

Materials & Methods: At the beginning of the experiment, the colonies were homogenized according to the population, food storage and queens with same age. The colonies were fed with control treatment and different concentrations of *Rosa canina* extract (2, 4 and 8% of the extract) during 1 month. Brood rearing and queen egg laying were measured using a grid with 5 cm × 5 cm squares that covered the entire side of a comb. 30 days after feeding the colonies, the population of adult honey bee was measured by frame. To investigate the development of the hypopharyngeal glands, length and width of 10 acini from different parts of the gland were measured with 3, 6, 9, 12 and 15 days using a stereomicroscope and in T Capture software. This experiment was performed in a completely randomized design with four replications and four treatments.

Results: The results showed that treatment with 2% *Rosa canina* extract had a significant effect on brood rearing. The effect of this treatment on queen egg laying, population and honey production was not statistically significant. In addition, the study of growth of hypopharyngeal glands showed that the highest growth of acini size was achieved at the age of 3 days for honey bees fed with 4% *Rosa canina* extract and at 9 and 12 days of age for the colonies fed with 2% *Rosa canina* extract ($P<0.05$).

Conclusion: In general, it can be concluded that the use of 2% of *Rosa canina* hydroalcoholic extract was effective in improving the performance of honey bee colonies. Therefore, it is recommended to beekeepers to use *Rosa canina* hydroalcoholic extract as a nutritional supplement.

* Corresponding Author's email: mohebodini@yahoo.com
Received: 26 January 2022; Reviewed: 25 February 2022; Revised: 27 April 2022; Accepted: 9 June 2022
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.336670.2786

مقاله پژوهشی

اثر افزودن عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) به رژیم غذایی بر توسعه غدد هیپوفارنژیال، تولید عسل و رشدکلنی‌های زنبورعسل (*Apis mellifera*)

رقیه شهباززاده[۱]، یوسف جعفری‌آهنگری[۱]، حسین محب‌الدینی[۲*]، بهروز دستار[۱]، رضا اشرفی‌پارچین[۳]

[۱] گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۲] گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۳] شرکت دانش بنیان اکسیر فراوران سبلان، پارک علم وفناوری، اردبیل، ایران

کلمات کلیدی

عصاره بادرنجبویه
زنبورعسل
غدد هیپوفارنژیال
عملکرد
تولید

چکیده

مقدمه: این تحقیق به‌منظور بررسی اثر تغذیه‌ای عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر صفات فیزیولوژیکی و عملکردی کلنی‌های زنبورعسل انجام گرفت.

مواد و روش: تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه‌های تغذیه‌شده با یک، دو و سه درصد عصاره بادرنجبویه بودند. در شروع آزمایش از کلنی‌هایی با جمعیت و ذخایر یکسان و ملکه‌های هم‌سن خواهری استفاده شدند. در این آزمایش تغذیه کلنی‌ها با عصاره بادرنجبویه به‌صورت یک روز درمیان انجام شد و بعد از تغذیه کلنی‌ها با تیمارهای آزمایشی به‌مدت یک‌ماه، پارامترهای ازقبیل جمعیت، میزان تخم‌گذاری ملکه، سطح پرورش نوزادان، میزان تولید عسل و رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری سطح پرورش نوزادان و میزان تخم‌گذاری ملکه به‌وسیله قاب مشبک (۵×۵ سانتی‌مترمربع) انجام شد. اندازه‌گیری میزان جمعیت زنبورهای بالغ به‌صورت قابی و ۳۰ روز بعد از تغذیه کلنی‌ها انجام شد. برای بررسی رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال، طول و عرض ۱۰ آسینی از قسمت‌های مختلف غده برای سنین ۳، ٦، ۹، ۱۲ و ۱۵ روزگی در زیر استریومیکروسکوپ و توسط نرم‌افزار (T Capture) اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در سطح پرورش نوزادان کلنی‌های تغذیه‌شده با ۲ درصد عصاره بادرنجبویه در مقایسه با تیمار شاهد ازنظر آماری افزایش معنی‌داری داشتند. برای پارامترهای جمعیت، میزان تخم‌گذاری ملکه و میزان تولید عسل اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ولی تیمار ۲ درصد عصاره بادرنجبویه هرچند از لحاظ آماری تاثیر معنی‌دار نداشت ولی از لحاظ عددی تاثیر بهتری گذاشته بود. بیش‌ترین رشد سطح آسینی در ۳ روزگی (۰/۰٤۱۷ میلی‌متر مربع) برای زنبورهای تغذیه شده با ۲ درصد عصاره بادرنجبویه بود ($P<0/05$). هم‌چنین در رشد غدد هیپوفارنژیال در زمان‌های مختلف برای هرکدام از تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت.

نتیجه‌گیری و بحث: به‌طورکلی می‌توان گفت که افزودن ۲ درصد عصاره بادرنجبویه به‌عنوان مکمل تغذیه‌ای به کلنی‌های زنبورعسل توصیه می‌شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Mohebodini@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۵ آبان ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱٦ آذر ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۷ بهمن ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۹ اسفند ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.331022.2764

مقدمه

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* و نام لاتین Lemon balm، گیاهی دارویی از تیره نعناعیان است. ازجمله ترکیبات مهم بادرنجبویه می‌توان به اسیدرزمارینیک، اسیدپی‌کوماریک، اسیدهای کافئیک، اسیدکلروژنیک و سه فلاونول شامل رامنوسیترین، رامنازین و کوئرسیترین و فلاونوئیدهایی ازجمله لوتئولین، آپیژنین، تانن‌ها، مونوترپن، گلیکوزیدها، بتا-کاریوفیلن و ترپن‌ها و روغن‌های فرار از جمله سیترونلال، سیترال، نرال، متیل سیترونلات، اوسیمن، ژرانیول، نرول، لینالول اشاره کرد (۱). به‌دلیل وجود برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه، عصاره بادرنجبویه دارای خاصیت ضدویروسی و اسانس آن خاصیت ضدمیکروبی دارد (۲). عصاره گیاهی همان ترکیبات خاص گیاه است که تمام موادمفید یک گیاه مانند تانن، ویتامین‌ها و املاح را دارا می‌باشد ولی اسانس تنها شامل ترکیبات ترپنی گیاه است. عصاره ترکیبی کلی‌تر از اسانس دارد یعنی اسانس گیاهی جزئی از عصاره گیاهی است. هم‌چنین عصاره‌ها قدرت اثربخشی بیش‌تری نسبت به اسانس‌ها دارند. اسانس‌ها در آب حل نمی‌شوند و در دمای محیط در مجاورت هوا تبخیر می‌شوند. عصاره‌ها حلال‌های متفاوتی مانند الکل و آب دارند و در واقع اصلی‌ترین تفاوت عصاره آبی و هیدروالکلی آن است که در عصاره آبی از آب و در عصاره هیدروالکلی از الکل و آب برای عصاره‌گیری استفاده می‌شود (۳). در سال‌های اخیر نابودی پوشش‌های گیاهی و کمبود گرده و شهد در طبیعت، به‌طور مستقیم بر رشد غدد هیپوفارنژیال، تخم‌گذاری ملکه، رشد نوزادان و جمعیت کلنی‌های زنبورعسل تأثیر منفی گذاشته است (۴). در چنین شرایطی تغذیه کلنی‌های زنبورعسل با مکمل‌های غذایی امری اجتناب‌ناپذیر است (۵، ۶). بررسی‌هایی در مورد تغذیه تکمیلی کلنی‌های زنبورعسل با فرمول‌های متشکل از مخلوط‌های گلوسیدی، پروتئینی و ویتامینی انجام شده است، اما مطالعات کم‌تری در مورد استفاده از عصاره‌های گیاهی در تغذیه تکمیلی کلنی‌های زنبورعسل به‌ویژه در مراحل مختلف رشد بیولوژیکی آن‌ها انجام شده است (۷). گیاهان دارویی دارای مقادیر قابل‌توجهی از مواد ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند که می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بعضی از بیماری‌های زنبورعسل استفاده شوند. تحقیقات گسترده‌ای در مورد اثربخشی استفاده از عصاره گیاهان دارویی به‌دلیل خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدالتهابی آن‌ها انجام‌شده است (۸). استفاده از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان مکمل برای زنبورهای عسل تأثیر مضاعفی در تحریک فعالیت تخم‌گذاری ملکه و تولیدعسل داشته‌است (۹). نتایج Marghitaş و همکاران، نشان داد که کلنی‌های تغذیه شده با عصاره گزنه، سیر، پیاز، اکیناسه و آویشن بیشترین سطح پرورش نوزادان را دارد (۷). Patruica و همکاران، استفاده از عصاره مرزه در تغذیه زنبورعسل به منظور جلوگیری از بروز بیماری‌ها در فصل زمستان و تحریک تخم‌گذاری ملکه و افزایش سطح پرورش نوزادان را توصیه کرده‌اند (۱۰). بررسی Al-Ghamdi و همکاران، نشان می‌دهد که عصاره‌های بابونه، دارچین و نعناع تأثیرمثبتی بر رشد کلنی‌های زنبورعسل داشته است (۱۱). استفاده‌از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی اثرات مطلوبی بر روی باروری ملکه، بهبود سلامت زنبورعسل و تولید عسل داشته است (۱۲). در چندین مطالعه، اسانس نعناع، بادرنجبویه، گشنیز و آویشن و سایر موادشیمیایی گیاهی ازجمله کافئین، اسیدگالیک، کامفرول و اسید پی‌کوماریک، فعالیت ضدمیکروبی، افزایش طول عمر زنبورعسل و کاهش سطح نوزموسیس (Nosemosis) را نشان داده است (۱۳، ۱۴، ۱۵). نتایج بررسی‌های Sentkowska و همکاران، نشان داد که عصاره آبی بادرنجبویه می‌تواند منبعی از ترکیبات فنلی ازجمله روتین، کوئرسیتین و میریستین از خانواده فلاونوییدها و هم‌چنین بعضی از اسیدهای فنلی باشد (۱۶). بررسی‌های Akhondali و همکاران، بیانگر این است که عصاره بادرنجبویه به‌عنوان یک عامل آنتی‌آریتمی درصد وقوع فیبریلاسیون، تاکیکاردی و ضربانات زودرس بطنی در موش صحرایی را کاهش داده و دارای اثر محافظتی بر روی قلب می‌باشد (۱۷). نتایج تحقیقات Abdinezhad و Mohammadi، نشان می‌دهد که افزودن عصاره آبی بادرنجبویه به‌میزان ۱/۵ میلی‌لیتر در لیتر آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی، ضمن کاهش ضریب تبدیل موجب بهبود فعالیت سیستم ایمنی هومورال می‌شود (۱۸). عصاره‌های بادرنجبویه اثر سمیت سلولی (cytotoxic) بر سلول‌های سرطانی پستان حتی در غلظت‌های (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کم نشان داده است (۱۹). تجویز خوراکی عصاره آبی بادرنجبویه باعث کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت مغزمیانی در موش‌ها می‌شود(۲۰). تاکنون گزارشی در رابطه با تأثیر عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر عملکرد کلنی‌های زنبورعسل صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت تغذیه در رشد و عملکرد کلنی‌های زنبورعسل و نیاز به اطلاعات بیش‌تر درخصوص تغذیه کلنی‌ها با عصاره‌های گیاهی هدف از این تحقیق بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر عملکرد و رشد کلنی‌های زنبور عسل بود.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه: برای تهیه عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه، گیاه بادرنجبویه از مزارع گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهران خریداری‌شده و بعداز تائید جنس و گونه در هرباریوم

جهاددانشگاهی، اندام‌های هوایی گیاه در دمای اتاق در سایه‌خشک و با استفاده از مخلوط‌کن به‌صورت مکانیکی پودر شدند. پودر گیاه بادرنجبویه در محلول حاوی ۳۰ درصد آب و ۷۰ درصد اتانول خالص، در دمای اتاق به‌مدت ۷۲ ساعت خیسانده و با استفاده از دستگاه هم‌زن مخلوط و سپس فیلتر گردید. پس از فیلتراسیون عصاره، حلال با استفاده از تبخیرکننده چرخشی در خلاء تبخیر شده تا عصاره هیدروالکلی خشک شود. سپس عصاره خشک به‌دست‌آمده تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس در فریزر نگه‌داری شد (۳).

تغذیه کلنی‌ها با عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه: به‌منظور بررسی اثر تغذیه‌ای عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر سطح پرورش نوزادان، تخم‌گذاری ملکه، جمعیت، میزان عسل تولیدی و رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال در کلنی‌های زنبورعسل، این آزمایش در زنبورستانی واقع در استان اردبیل انجام شد. عملیات صحرایی در فصل تابستان (تیر و مرداد ماه) به‌مدت ۶۰ روز (۳۰ روز تغذیه و ۳۰ روز بعد از تغذیه جهت اندازه‌گیری فاکتورها) به‌طول انجامید. در این آزمایش ۱۶ کلنی زنبورعسل که ازنظر جمعیت، میزان نوزادان و ذخیره غذایی در شرایط یکسانی قرار داشتند، تیمارهای آزمایشی به‌صورت تصادفی به آن‌ها تخصیص یافت. در این آزمایش برای اجتناب از اثر تفاوت‌های ژنتیکی بین کلنی‌ها از ملکه‌های هم‌سن خواهری استفاده شد. در این آزمایش تغذیه کلنی‌ها با عصاره بادرنجبویه به‌صورت یک روز در میان انجام شد (شکل ۱). تیمارهای آزمایشی در جدول ۱ آورده شده است.

اندازه‌گیری میزان تخم‌گذاری ملکه: برای اندازه‌گیری سطح تخم‌گذاری ملکه، تخم‌های روز به‌وسیله یک قاب مشبک ۵×۵ سانتی‌متر (شکل ۲) که مساحت هر مربع ۲۵ سانتی‌مترمربع بوده و در داخل هر مربع ۱۰۰ سلول قرار می‌گرفت با قرار دادن قاب خالی روی قاب‌های حاوی تخم و نوزاد تعداد مربع‌ها مشخص شده و مساحت آن‌ها محاسبه گردید. ارزیابی سطح تخم‌گذاری در کلنی‌ها ۵ تا ۱۰روز بعد از تغذیه کلنی‌ها انجام شد (۲۱، ۲۲).

جدول ۱: تیمارهای آزمایشی

تیمار	سطح مصرف عصاره بادرنجبویه
شاهد	۱۰۰ میلی‌لیتر آب+۴۰۰ میلی‌لیتر شربت
یک درصد عصاره بادرنجبویه	یک گرم عصاره در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب+ ۴۰۰ میلی‌لیتر شربت
دو درصد عصاره بادرنجبویه	دو گرم عصاره در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب+۴۰۰ میلی‌لیتر شربت
سه درصد عصاره بادرنجبویه	سه گرم عصاره در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب+۴۰۰ میلی‌لیتر شربت

شکل۱: بسته‌بندی و آماده‌سازی عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه برای تغذیه کلنی‌های زنبورعسل

اندازه‌گیری سطح پرورش نوزادان: اندازه‌گیری سطح پرورش نوزادان (شکل ۲) از طریق اندازه‌گیری سطحشان حاوی تخم، لارو و شفیره به‌وسیله قاب مشبک ۵×۵ سانتی‌مترمربع که داخل هر مربع در حدود صد حجره جا می‌گیرد، انجام شد. با قرار دادن این کادر روی سطحشان حاوی نوزادان، سطح پرورش نوزادان مشخص و بر حسب سانتی‌مترمربع بیان شد. ارزیابی سطح پرورش نوزادان در کلنی‌ها ۲۰ روز بعد از تغذیه کلنی‌ها انجام شد (۲۳، ۲۲).

اندازه‌گیری میزان جمعیت زنبورهای بالغ: اندازه‌گیری میزان جمعیت زنبورهای بالغ به‌صورت قابی بود بدین‌صورت که پر بودن دو طرف قاب برابر با عدد یک و کم‌تر از آن متناسب با جمعیت روی

قاب کسری از عدد یک محسوب شد. ارزیابی جمعیت زنبورهای کامل در کلنی‌ها ۳۰ روز بعد از تغذیه کلنی‌ها انجام شد (۲۳، ۲۲).

اندازه‌گیری تولیدعسل: تولید عسل درکلنی‌ها ازطریق جمع میزان‌عسل برداشت‌شده و عسل باقی‌مانده در هر کلنی به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری میزان عسل تولیدی برداشت شده، ابتدا قاب‌های عسل شماره‌گذاری شده از کندوهای آزمایشی جمع‌آوری و توزین شدند. سپس با استفاده از اکستراکتورعسل‌گیری‌انجام و مجدداً همه قاب‌ها توزین شدند. اختلاف وزن قاب‌ها قبل و بعد از عسل‌گیری میزان عسل تولیدشده را نشان می‌دهد (۲۴).

اندازه‌گیری رشدو نمو غدد هیپوفارنژیال: برای اندازه‌گیری رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال، تعداد ۱۰۰ زنبورعسل کارگر از هر کلنی به هنگام خروج از سلول (زنبورعسل یک‌روزه) با استفاده از ماژیک مخصوص، نشانه‌گذاری شدند (شکل۳). به تعداد ۱۲ عدد زنبورعسل کارگر نشان‌دار شده از هر کلنی (تکرار) برای هر سن (۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روزگی) انتخاب شدند. سر زنبورهای عسل انتخاب شده جداشده و غدد هیپوفارنژیال از داخل سرها خارج و در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد (ایزوتونیک نسبت به همولنف) قرار داده‌شد.

طول و عرض ۱۰ آسینی از قسمت‌های مختلف غدد در زیر استریومیکروسکوپ (echo LAB, SM 230 H) و توسط نرم‌افزار (T Capture) برحسب واحد پیکسل اندازه‌گیری شد. تبدیل پیکسل به میلی‌متر با لام مدرج میکرومتری با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر انجام شد و مساحت آسینی‌ها به‌عنوان شاخصی از رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال به‌وسیله معادله زیر محاسبه شد (۱۱، ۲۵):

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

طول: a، عرض: b، π: ۳/۱۴

داده‌های حاصل از مراحل مختلف آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس شدند. مقایسه میانگین بین تیمارها با آزمون دانکن و در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) و رویه GLM استفاده شد. مدل آماری این طرح عبارت است از: $Y\ i\ j = \mu + Ti + e\ ij$

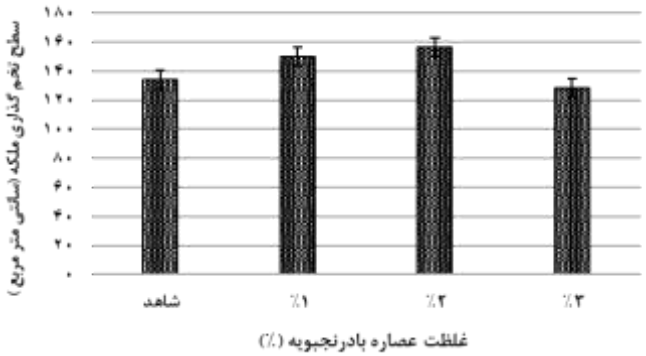
که در این فرمول Y ij مقدار هر مشاهده، μ میانگین مشاهدات، Ti اثر تیمار آزمایشی، e ij خطای آزمایش می‌باشند.

شکل۲: اندازه‌گیری میزان تخم‌گذاری ملکه و سطح پرورش نوزادان با استفاده از قاب مشبک ۵×۵ سانتی‌متر

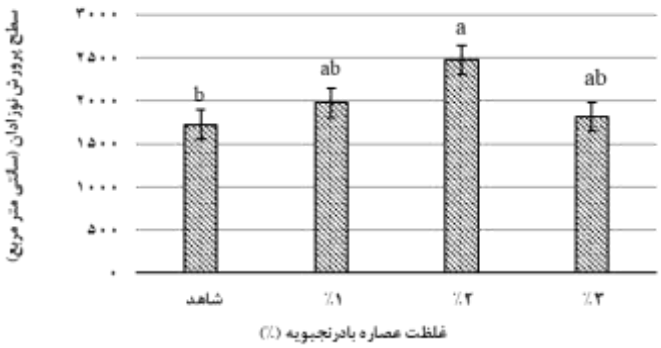
شکل ۳: نشان‌دارکردن زنبورهای کارگر تازه متولدشده (راست)، اندازه‌گیری آسینی‌ها با استریومیکروسکوپ (وسط)، غدد هیپوفارنژیال متشکل از آسینی‌ها (چپ)

نتایج

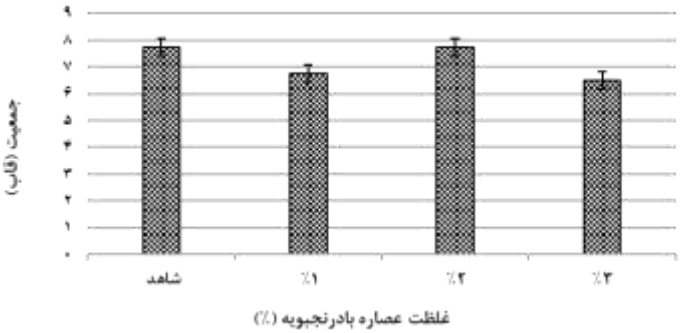
نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه بر میزان تخم‌گذاری ملکه در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بین کلنی‌های تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه با گروه شاهد در میزان تخم‌گذاری ملکه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. نتایج مقایسه میانگین سطح پرورش نوزادان در شکل ۵ نشان می‌دهد که کلنی‌های تغذیه شده با ۲ درصد عصاره بادرنجبویه در مقایسه با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشته است. گروه‌های تیماری ۱ و ۳ درصد عصاره بادرنجبویه در مقایسه با



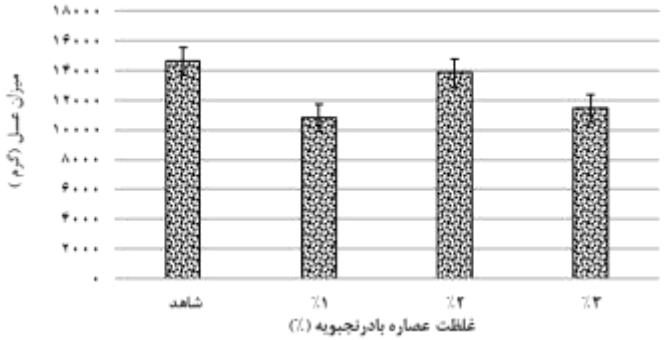
شکل ۴: نمودار مقایسه میزان تخم‌گذاری ملکه در کلنی‌های تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه



شکل ۵: نمودار مقایسه سطح پرورش نوزادان در کلنی‌های تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه



شکل ۶: نمودار مقایسه میزان جمعیت در کلنی‌های تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه



شکل ۷: نمودار مقایسه میزان عسل تولیدی در کلنی‌های تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه

رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال: مقایسه میانگین داده‌های مربوط به رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال زنبورهای عسل کارگر در جدول ۲ آورده شده است. در سن ۳ روزگی زنبورعسل، رشد غدد در تیمار ۲ درصد عصاره بادرنجبویه نسبت به گروه شاهد و بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. رشد غدد در ۶، ۹ و ۱۲روزگی، در بین کلنی‌های تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه تیمار شاهد و تیمار ۲ درصد عصاره بادرنجبویه اختلاف معنی‌داری نداشتند. میزان جمعیت در بین کلنی‌های تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۶). مقایسه میانگین میزان عسل تولیدی در شکل ۷ نشان می‌دهد که اگرچه بین تیمارها از لحاظ میزان تولید عسل اختلاف معنی‌دار وجود نداشته ولی تیمار شاهد و تیمار ۲ درصد عصاره بادرنجبویه در مقایسه با تیمار ۱ درصد و تیمار ۳ درصد عصاره بادرنجبویه از لحاظ عددی تولید عسل بیش‌تری داشتند.

اختلاف معنی‌داری نداشت. در ۱۵ روزگی رشد غدد برای تیمار شاهد در مقایسه با تیمار ۳ درصد عصاره بادرنجبویه در بیش‌ترین سطح خود حفظ شده بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود. اثر زمان برای تیمارها به‌صورت جداگانه تجزیه و تحلیل شد و نتایج در جدول ۲ گزارش شده است. اختلاف آماری معنی‌داری در زمان‌های مختلف برای هرکدام از تیمارها وجود دارد. برای تیمار شاهد بیش‌ترین

رشد غدد در سن ۱۵روزگی بوده که اختلاف معنی‌داری با روزهای ۳، ۶ و ۹ داشته است. برای کلنی‌های تغذیه شده با ۱ درصد عصاره بادرنجبویه، رشد غدد با افزایش سن در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ افزایش معنی‌داری داشته است. برای تیماری با ۲ درصد عصاره بادرنجبویه بین روزهای ۳ و ۱۲ اختلاف معنی‌دار بود. کلنی‌های تغذیه‌شده با ۳ درصدعصاره بادرنجبویه در۹ روزگی بیش‌ترین رشد غدد را داشته‌اند.

جدول۲: مقایسه میانگین سطح آسینی غدد هیپوفارنژیال (میلی‌متر مربع) در زنبورهای کارگر تغذیه‌شده با عصاره بادرنجبویه در سنین مختلف

تیمارهای آزمایشی	۳ روزگی	۶ روزگی	۹روزگی	۱۲ روزگی	۱۵ روزگی
شاهد	۰/۰۲۷۳ ±۰/۰۰۲۴$^{b, D}$	۰/۰۳۹۸±۰/۰۰۳۹^{CD}	۰/۰۵۲۲ ±۰/۰۰۴۱ ^{BC}	۰/۰۵۹۶ ±۰/۰۰۳۸ ^{AB}	۰/۰۶۹۲ ±۰/۰۰۶۳ $^{a, A}$
یک درصد عصاره بادرنجبویه	۰/ ۰۲۷۶±۰/۰۰۲۴$^{b, C}$	۰/۰۳۸۴ ± ۰/۰۰۳۹^{C}	۰/۰۵۱۳ ±۰/۰۰۴۱ ^{B}	۰/۰۶۷۷±۰/۰۰۳۸ ^{A}	۰/۰۶۴۶ ±۰/۰۰۶۳$^{ab, A}$
دو درصد عصاره بادرنجبویه	۰/۰۴۱۷ ±۰/۰۰۲۴ $^{a, B}$	۰/ ۰۴۴۵± ۰/۰۰۳۹ ^{AB}	۰/۰۵۱۹±۰/۰۰۴۱^{AB}	۰/۰۵۷۰±۰/۰۰۳۸ ^{A}	۰/۰۵۲۶ ±۰/۰۰۶۳ $^{ab, AB}$
سه درصد عصاره بادرنجبویه	۰/۰۲۹۳±۰/۰۰۲۴$^{b, C}$	۰/۰۳۸۱ ± ۰/۰۰۳۹ ^{BC}	۰/۰۶۳۵ ±۰/۰۰۴۱^{A}	۰/۰۵۶۸±۰/۰۰۳۸ ^{A}	۰/۰۴۵۷ ±۰/۰۰۶۳$^{b, B}$

a، b، c میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارها برای هر زمان)

C،B،A میانگین‌های هر ردیف با حروف متفاوت در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (مقایسه میانگین در طول زمان برای هر تیمار)

بحث

طبق بررسی‌های انجام‌شده در زمینه تأثیر عصاره‌های گیاهی بر روی کلنی‌های زنبورعسل، در طی اجرای آزمایش انتظار بر این بود که عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه تأثیر قابل‌توجهی بر پارامترهای جمعیت، تخم‌گذاری ملکه و میزان تولید عسل بگذارد، اما نتایج آزمایش طبق انتظار نبود. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره بادرنجبویه بر روی تخم‌گذاری ملکه تأثیر معنی‌دار نداشته است. بررسی‌ها نشان داده است که تعداد تخم‌ها در یک کلنی با جمعیت زنبورهای بالغ در کلنی ارتباط دارد. علاوه براین میزان تخم‌گذاری ملکه با فصول سال، وفور یا کمبود شهد و گرده در طبیعت و کیفیت و نژاد ملکه نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۲۶). این نتایج با نتایج تحقیقات Rashid و همکاران (۲۷) مطابقت داشته اما با نتایج Patruica و همکاران (۹، ۱۰)، Lazar و همکاران (۱۲) مغایر می‌باشد. در بررسی‌های Patruica و همکاران(۹)و Lazar و همکاران (۱۲) تغذیه کلنی‌های زنبورعسل با عصاره‌های گیاهی موجب تحریک فعالیت تخم‌گذاری ملکه شده‌است. تعداد شان‌های پوشیده شده با زنبورهای بالغ نشان‌دهنده قدرت کلنی و درنتیجه تراکم جمعیت زنبورهای کارگر بالغ در کلنی است. نتایج مربوط به‌میزان جمعیت در شکل ۶ نشان داد که گروه‌های تیماری ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. نتایج اخیر در مورد میزان جمعیت با نتایج تحقیقات Al-Zarog و El-Bassiouny (۸) و Al-Ghamdi و همکاران (۱۱) هم‌خوانی ندارد. Al-Zarog و El-Bassiouny گزارش کردند که عصاره‌های آویشن، شنبلیله و افسنتین باعث افزایش تعداد نوزادان و درنهایت افزایش جمعیت زنبورها شده‌است (۸). Al-Ghamdi و همکاران، گزارش کرده‌اند که عصاره بابونه و نعناع موجب افزایش رشد کلنی‌های زنبورعسل شده است (۱۱). افزایش تعداد نوزادان درکلنی زنبورعسل به‌عنوان شاخص سرزندگی و زنده‌مانی ملکه و هم‌چنین قدرت و سلامت کلنی درنظر گرفته می‌شود. در این تحقیق مشاهده شد که تغذیه کلنی‌های زنبورعسل با ۲ درصد عصاره بادرنجبویه، افزایش معنی‌داری را درسطح پرورش نوزادان نشان داده است. این نتیجه در سطح پرورش نوزادان با تحقیقات Patruica و همکاران(۱۰)، Lazarو همکاران (۱۲)، Al-Zarog و El-Bassiouny (۸) و Marghitas و همکاران (۷) مطابقت داشته اما با بررسی‌های Rashid و همکاران(۲۷)مغایر می‌باشد. تحقیقات Lazar و همکاران، نشان می‌دهد که استفاده از اسانس آویشن، ریحان، پونه کوهی، نعناع و رزماری منجر به افزایش ۵۰ درصدی در سطح پرورش نوزادان و میزان جمعیت و میزان تولید عسل شده است (۱۲). در مورد میزان تولید عسل Rashid و همکاران، به نتایج غیر معنی‌دار دست یافتند (۲۷) که مشابه نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بوده‌است،اما نتایج تحقیقات Lazar و همکاران (۱۲) با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت. استفاده‌از ترکیبات جدید گیاهی(سینئول، کافور، کارواکرول، β-توجون، تیمول، α-توجون و سایمن) در کلنی‌های زنبورعسل توسط Rashid و همکاران، باعث کاهش سطح پرورش نوزادان، تخم‌گذاری ملکه، افزایش میزان جمعیت زنبورهای بالغ شده ولی در میزان تولید عسل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است (۲۷). Mărghitaş و همکاران، به این نتیجه رسیدند که بیش‌ترین سطح رشد نوزادان در گروه‌های تیماری حاوی عصاره‌های گزنه، سیر، پیاز، اکیناسه و آویشن بوده است (۷). Patruica و همکاران، استفاده از عصاره مرزه برای تحریک تخم‌گذاری ملکه و افزایش سطح پرورش نوزادان را تائید کرده‌اند (۱۰). هم‌چنین در این تحقیق رشد و نمو غده هیپوفارنژیال (غده اصلی ترشح‌کننده ژل رویال در سر زنبورعسل کارگر) ارزیابی شد. در شرایط عادی، غدد هیپوفارنژیال بین روز سوم و ششم زندگی زنبورهای کارگر شروع به فعالیت می‌کنند. بین روز ششم و چهاردهم غدد به‌طور کامل رشد کرده و بیش‌ترین فعالیت ترشحی را نشان می‌دهند. درنتیجه انجام کارهای متوالی توسط زنبورها در کندو و قطع تغذیه لاروهای نوزادی، غدد به‌تدریج تحلیل می‌روند (۲۸). نتایج مربوط به رشد و نمو غدد هیپوفارنژیال زنبورهای عسل درجدول ۲ نشان می‌دهدکه در ۳ روزگی بیش‌ترین رشد ناحیه آسینی زمانی مشاهده شد که زنبورها با ۲ درصد عصاره بادرنجبویه تغذیه شدند. برای کلنی‌های تغذیه شده با ۱ درصد عصاره بادرنجبویه، رشد غدد با افزایش سن در روزهای ۳،۶،۹و۱۲ افزایش معنی‌داری داشته

است. در این تحقیق اوج رشد آسینی برای گروه شاهد در ۱۵ روزگی و برای تیمارهای ۱ درصد و ۲ درصد عصاره در ۱۲روزگی بوده که با نتایج تحقیقات Al-Ghamdi همکاران (۶) و Atallah و همکاران (۲۹) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کردند که سطح آسینی با افزایش سن افزایش‌یافته و در سن ۱۲و ۱۵ روزگی به اوج رشد می‌رسد. از طرفی کلنی‌های تغذیه‌شده با ۳ درصد عصاره بادرنجبویه در۹ روزگی بیش‌ترین رشد غدد را داشته‌اند که این نتیجه با نتایج Hrassnigg و Crailsheim (۳۰) و Feng و همکاران (۳۱) هم‌خوانی داشته، زیرا گزارش این محققان نشان می‌دهد که سطح آسینی در ۶ و ۹ روزگی افزایش‌یافته و سپس رو به کاهش می‌گذارد. در زنبورهای کارگر پرستار تا ۱۳ روزگی غدد هیپوفارنژیال به حدنهایی رشد رسیده و ژله رویال بیش‌تری را برای تغذیه لاروها ترشح می‌کنند. بعد از ۱۸ روزگی وقتی که زنبورهای پرستار تغییر وظیفه دادند یعنی به زنبورهای صحرارو تبدیل شدند، اندازه غدد هیپوفارنژیال کاهش می‌یابد (۳۱). لازم به ذکر است که رشد و فعالیت غدد هیپوفارنژیال در زنبورهای کارگر با سن، نوع خوراک تغذیه‌شده و نوع وظیفه در کندو ارتباط دارد. علاوه بر آن‌یکی از فاکتورهای تأثیرگذار بر تفاوت در رشد غدد هیپوفارنژیال، وجود یا عدم وجود نوزادان لاروی است که به‌عنوان محرکی برای رشد و فعال شدن غدد هیپوفارنژیال عمل می‌کند (۳۲). فاکتورهای دیگر ازجمله نژاد زنبورعسل، اندازه بدن، فرمون‌های لاروی، عوامل اکولوژیکی، گرسنگی، استرس گرمایی، آلودگی واروآ، بیماری‌ها و آفت‌کش‌ها (۳۳، ۳۴، ۳۵) و موقعیت جغرافیایی، ترجیح غذایی در بین نژادهای زنبورعسل (۳۶، ۳۷) می‌توانند نقش مهمی در اندازه آسینی و رشد غدد هیپوفارنژیال داشته باشند. تفاوت در نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات صورت گرفته می‌تواند به‌دلیل موقعیت جغرافیایی و محل قرارگیری کلنی زنبورعسل، تغییرات فصلی، شرایط آب‌وهوایی و روش‌های عصاره-گیری گیاهان باشد. از طرفی عصاره‌های گیاهی به‌طور طبیعی بخشی از رژیم غذایی زنبورعسل نیستند و رژیم‌های حاوی عصاره-های گیاهان همیشه مؤثر نبوده و ممکن است توسط زنبورعسل رد شده یا فقط در مقادیر کم‌مصرف شود. از این‌رو باید از خوش‌طعم بودن و جذابیت عصاره‌های گیاهی اطمینان حاصل شود. دلیل تأثیرگذار دیگر برای تفاوت در نتایج آزمایش‌ها، متابولیت‌های ثانویه گیاه می‌باشند که در عصاره‌ها وجود دارد. همان‌طورکه قبلاً اشاره شد بادرنجبویه دارای ترکیبات فنولیک مانند رزمارینیک اسید، اسید پی‌کوماریک، کوئرستین می‌باشد. گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر این ترکیبات بر رشد کلنی‌های زنبورعسل وجود دارد. گزارش Mao و همکاران، نشان می‌دهدکه مصرف اسید پی‌کوماریک بقا و طول عمر زنبورعسل را افزایش می‌دهد (۳۸). Nicodemo و همکاران، دریافتند که طول عمر زنبورعسل در کندوهایی با بره موم سرشار از کوئرستین، ۶/۶درصد بیش‌تر است (۳۹). Liao و همکاران، گزارش کرده‌اند که اسید پی‌کوماریک و کوئرستین موجود در رژیم غذایی طبیعی زنبورهای عسل، با بیان ژن‌های طول عمر (خانواده Sirtuin) و بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با طول عمر تأثیر مفیدی بر طول عمر زنبورعسل داشته است (۴۰). بااین‌حال برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که کوئرستین در رژیم غذایی زنبور عسل، می-تواند اثرات نامطلوبی بر زنبورها داشته باشد. مصرف غلظت‌های بالای کوئرستین با اختلال در فرمون ملکه و تحریک رشد تخمدان زنبورهای کارگر منجر به رفتار پرخاشگرانه اجتماعی نسبت به ملکه شده (۴۱) و رونویسی ژن‌های هسته‌ای و ژن‌های میتوکندری، ساخت کانال غشای میتوکندری و فسفوریلاسیون اکسیداتیو را کاهش داده و منجر به تداخل در تولید ATP و کاهش انرژی برای پرواز و سایر فعالیت‌های زنبورعسل می‌شود (۴۲). اگرچه ممکن است مصرف دوزهای بیش‌تر از ترکیبات فنولیک موجود در عصاره‌ها تأثیر عکس بر کلنی‌های زنبورعسل بگذارد ولی این ترکیبات نمی‌تواند باعث کاهش رشد زنبورهای کارگر *A. Mellifera* باشد، زیرا خواص آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در محصولات زنبورعسل نیز شناسایی شده است (۴۳). براساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت که سطح پرورش نوزادان و غدد هیپوفارنژیال در ۳ روزگی در تیمار ۲ درصد عصاره افزایش معنی‌داری داشت ولی در تخم‌گذاری ملکه، جمعیت و تولید عسل هرچند از لحاظ آماری این تاثیر معنی‌دار نبود ولی از لحاظ عددی تاثیر بهتری گذاشته بود و این تاثیر می‌تواند ناشی از خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره بادرنجبویه و وجود ترکیبات فنولیک ازجمله رزمارینیک اسید، اسید پی کوماریک، کوئرستین باشد.

منابع

1. **Metwally, M.A.A., 2009.** Effects of garlic *(Allium sativum)* on some antioxidant activities in Tilapia Nilotica *(Oreochromis niloticus)*. World Journal of Fish Marine Science. 1(1): 56-64.
2. **Mirai, S., Azizi, N. and Kiani, S., 2016.** A review of chemical components and pharmacological effects of *Melissa officinalis* L. Der Pharmacia Lettre. 8(6): 229-237.
3. **Zhang, Q.W., Lin, L.G. and Ye, W.C., 2018.** Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chinese Medicine. 13: 20.
4. **Somerville, D., 2005.** Fat bees, skinny bees–a manual on honey bee nutrition for beekeepers. Australian rural industries research & development corporation publication.
5. **De Grandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E. and Huang, M.H., 2010.** The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees *(Apis mellifera L.)*. Journal of Insect Physiology. 56(9): 1184-1191.
6. **Al-Ghamdi, A.A., Al-Khaibari, A.M. and Omar, M.O., 2011.** Consumption rate of some proteinic diets affecting hypopharyngeal glands development in honeybee workers. Saudi Journal of Biological Sciences. 18: 73-77.
7. **Marghitas, L.A., Bobis, O. and Tofalvi, M., 2010.** The effect of Plant supplements on the development of artificially weaken bee families. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies. 43(1): 402-406.
8. **Al-Zarog, A.A. and El-Bassiouny, A.M., 2013.** Influence of some plant extracts on Varroa mite and performance of honey bee *Apis mellifera* colonies. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control. 5(2): 15-20.

mellifera meda) fed with different levels of thiamine. Animal Science Journal. 29(110): 203-212. (In Persian)

26. **Khoury, D.S., Myerscough, M.R. and Barron, A.B., 2011.** A quantitative model of honey bee colony population dynamics. PLoS ONE. 6: e18491.
27. **Rashid, B., Khani, A., Ghasemi, V., Ghadamyari, M., Sahebzadeh, N. and Moharramipour, S., 2020.** Evaluation of a new plant-based formulation for the treatment of varroosis in the honey bee colonies: efficacy and safety. Apidologie. 51: 1074-1090.
28. **Pohorecka, K., 2004.** Effect of standardized plant herb extracts on general condition of the honey bee. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 48(4): 415-419.
29. **Atallah, M.A., Mofttah, E.A., Eahbah, H.M., Mohamed, A.A. and Eyssa, N.A., 1995.** Effect of protein feeding on the development of hypopharyngeal gland of two races of honeybee and the chemical composition of royal jelly. 6th Nat. Conf. of Pest. & Dis. Of Veg. &Fruits in Egypt. 88-100.
30. **Hrassnigg, N. and Crailsheim, K., 1998.** The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera L.*). Journal of Insect Physiology. 44: 393-404.
31. **Feng, M., Fang, Y. and Li, J., 2009.** Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. BMC Genomics. 10: 645-657.
32. **Pinto, F. de A., 2012.** Nutritional and Temporal Effects on Hypopharyngeal Glands of Africanized Honeybees (Hymenoptera-Apidae). Sociobiology. 59(2): 447-456.
33. **Le Conte, Y., Mohammedi, A. and Robinson, G.E., 2001.** Primer effects of a brood pheromone on honey bee behavioural development. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences. 268: 163-168.
34. **Yousef, S.I., Basheir, Z.M., Teleb, S.S. and Ibraheem, E.E., 2014.** Effect of Varroa infestation on the morphological and histological structure of the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* workers. Journal of American Science. 10: 79-77.
35. **De Smet, L., Hatjina, F., Ioannidis, P., Hamamtzoglou, A., Schoonvaere, K., Francis, F., Meeus, I., Smagghe, G. and de Graaf, D.C., 2017.** Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. Plos ONE. 12: e0171529.
36. **Cheng, S.L., 2001.** Special management of *Apis cerana cerana*. In: Liu BH (Ed.). The Apicultural Science in China. Chiense Agricultural Press, Beijing. 488-512.
37. **Alqarni, A.S., 2006.** Tolerance of summer temperature in imported and indigenous honey bee *Apis mellifera* L. races in central Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences. 13: 123-127.
38. **Mao, W., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R., 2015.** A dietary phytochemical alters caste-associated gene expression in honey bees. Science advances. 1(7).
39. **Nicodemo, D., Malheiros, E.B., De Jong, D. and Couto, R.H.N., 2014.** Increased brood viability and longer lifespan of honeybees selected for propolis production. Apidologie. 45: 269-275.
40. **Liao, L.H., Wu, W.Y. and Berenbaum, M.R., 2017.** Impacts of Dietary Phytochemicals in the Presence and Absence of Pesticides on Longevity of Honey Bees (*Apis mellifera*). Insects. 8(1): 22.
41. **Gao, J., Zhao, G., Yu, Y. and Liu, F., 2010.** High concentration of nectar quercetin enhances worker resistance to queen's signals in bees. Journal of Chemical Ecology. 36(11): 1241-1243.
42. **Mao, W., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R., 2017.** Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). Proceedings of the National Academy of Sciences. 114(10): 2538-2543.
43. **Nascimento, K.S., Sattler, J.A.G., Macedo, L.F.L., González, C.V.S., de Melo, I.L.P., da Silva Araújo, E. and de Almeida-Muradian, L.B., 2018.** Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. 91: 85-94.
9. **Patruica, S., Mot, D. and Popovici, D., 2017.** The effect of using medicinal plant extracts upon the health of bee colonies. Romanian Biotechnological Letters. 6(22): 13182-13185.
10. **Patruica, S., Dunea, I.B., Jivan, A., Jivan, A. and Stroe, A., 2011.** Research on the Influence of Apiary Biostimulators on Bee Families Development in spring. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies. 44(2): 267-270.
11. **Al-Ghamdi, A.A., Abou-Shaara, H.F. and Ansari, M.J., 2021.** Effects of sugar feeding supplemented with three plant extracts on some parameters of honey bee colonies. Saudi Journal of Biological Sciences. 28(4): 2076-2082.
12. **Lazar, R.N., Mot, D., Alexa, E., Boldea, M., Stef, L. and Patruica, S., 2021.** Influence of essential oils on bioproductive indices and health of bee colonies. Scientific Papers: Series D, Animal Science-The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science. 64(2): 247-253.
13. **Wiese, N., Fischer, J., Heidler, J., Lewkowski, O., Degenhardt, J. and Erler, S., 2018.** The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (*Thymus vulgaris*) inhibit growth of bee disease-associated microbes. Scientific reports. 8(1): 1-12.
14. **Bernklau, E., Bjostad, L., Hogeboom, A. and Carlisle, A.H.S.A., 2019.** Dietary Phytochemicals, Honey Bee Longevity and Pathogen Tolerance. Insects. 10(1): 14.
15. **Dumitru, A., Chioveanu, G., Ionita, M., Dobre, G. and Mitrea, I.L., 2017.** In Vitro Studies on using Natural Essential Oils in Treatment of Nosemosis in Honey Bees: Determination of the Therapeutic dose. Scientific Works Series C. Veterinary Medicine. 63(2): 165-170.
16. **Sentkowska, A., Biesaga, M. and Pyrzynska, K., 2015.** Polyphenolic composition and antioxidative properties of Lemon balm *(Melissa officinalis L.)* extract affected by different brewing processes. International Journal of Food Properties. 18: 2009-2014.
17. **Akhondali, Z., Dianat, M. and Radan, M., 2015.** Negative Chronotropic and Antidysrhythmic Effects of Hydroalcoholic Extract of Lemon Balm *(Melissa Officinalis L.)* on CaCl2-Induced Arrhythmias in Rats. Electron Physician. 7(1): 971-976.
18. **Abdinezhad, F. and Mohammadi, M., 2015.** Effect of Lemon balm *(Melissa officinalis)* aqueous extract on immune response and performance of broilers. Journal of Animal Production. 17(2): 281-290. (In Persian)
19. **Moaca, E.A., Farca, C., Ghiuu, A., Coricovac, D., Ardelean, F., Antal, A.S., Dehelean, C. and Avram, F., 2018.** A comparative study of *Melissa officinalis* leaves and stems ethanolic extracts in terms of antioxidant, cytotoxic, and antiproliferative potential. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 6: 1-12.
20. **Malek-Mohammadi, R., Roghani, M. and Salami, M., 2015.** The effect of aqueous extract of *Melissa officinalis* on the oxidative stress indices in the midbrain tissue. Feyz Medical Sciences Journal. 19(1): 8-14. (In Persian)
21. **Sharma, V.P. and Kumar, N.R., 2010.** Changes in honeybee behaviour and biology under the influence of cellphone radiations. Current Science. 98(10): 1376-1378.
22. **Mohebodini, H., Tahmasbi, G.H., Dastar, B., Jafari-Ahangari, Y. and Zerehdaran, S., 2013.** Effect of dietary thiamine on growth of the Iranian honey bee colonies (*Apis mellifera meda*) in different seasons. Agriculture and Forestry. 59(3): 119-126.
23. **DeGrandi-Hoffmanh, G., Wardell, G., Ahumada-Segura, F., Rinderer, T., Danka, R. and Pettis, J., 2008.** Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. Journal of Apicultural Research and Bee World. 47: 265-270.
24. **Zarin, F., 2000.** Investigating the level of homozygosity of sexual alleles and its correlation with honey production in honey bee colonies of Tehran, Isfahan, Markazi and Qazvin provinces. Honeybee Master's thesis, Imam Khomeini Higher Education Center. (In Persian)
25. **Mohebodini, H., Tahmasbi, Gh., Dastar, B., Jafari ahangari, Y., Zerehdaran, S., 2016.** The hypopharyngeal glands development in Iranian honey bee workers (*Apis*