Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 53, No 1, Spring and Summer 2022 (11-26)
DOI: 10.22059/IJPPS.2022.309403.1006950

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۵۳، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۱ (ص۲۶-۱۱) مقاله پژوهشی

تاثیر توام تریپتوفان و اسید آسکوربیک بر برخی از فراسنجه های فیزیولوژیکی، زیستی و رفتاری کارگرهای زنبور عسل ایرانی *Apis mellifaera meda* L.

علی همراهی[1]، مرتضی موحدی فاضل[2*]، مریم معرفی[3] و نیما ایلا[4]
۱و۲، دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان. زنجان. ایران
۳. استادیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی ، کرج. ایران.
۴. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج. ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۸- تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۱۰/۲۷)

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تاثیر تغذیه همزمان تریپتوفان و اسید اسکوربیک بر برخی از پارامترهای فیزیولوژیکی، رفتاری ، زیستی و تولیدی در زنبور عسل ایرانی *Apis mellifera* L. انجام شد. تیمارهای انتخابی شامل تریپتوفان(12mg/gr)، اسید آسکوربیک(2mg/gr)، مخلوط هر دو و تیمار شاهد در قالب شربت ۱:۱ (۱ کیلو گرم شکر در ۱ لیتر آب) که هفته ای یکبار در اختیار زنبورها قرار گرفت. نتایج بررسی ها نشان داد تغذیه زنبورها با رژیم غذایی حاوی تریپتوفان و اسید آسکوربیک بر میزان مالون دی آلدهید(MDA)، ملاتونین(MEL) و سرتونین(SER) تاثیر معنی داری داشته است (P<0.01). بیشترین مقدار MDA ، MEL و SER بترتیب در تیمارهای تریپتوفان (۳۱.۵۹ ± ۰.۷۲ pg/ml)، مخلوط تریپتوفان و اسید آسکوربیک(178±5.02 pg/ml) و اسید آسکوربیک (28.31±0.5 pg/ml) مشاهده شد. همچنین کمترین مقادیر MDA ، MEL وSER به ترتیب در تیمارهای اسید آسکوربیک .(۱۷.۵۹±۰.36 pg/ml)، (74±3.06 pg/ml) و تریپتوفان (15.2±0.31 pg/ml) اندازه گیری شد. تفاوت وزنی زنبورهای تیمار شده بطور معنی داری متفاوت بود (P<0.001). سنگین ترین و سبک ترین زنبورها بترتیب در تیمار مخلوط تریپتوفان و اسید آسکوربیک(mg ۳.۲۶ ± ۱۱۱.۲۶) و شاهد (mg ۱.۷۵± ۹۰.۳۴) مشاهده شد. نتایج حاصل از واکنش زنبورها نسبت به گوی چرمی (بعنوان واکنش دفاعی) نشان از عدم تاثیر معنی دار تیمارهای غذایی بر رفتار دفاعی زنبورهای کارگر داشت. رژیم های غذایی بر آرامش زنبورهای درون کلنی (P<0.05) و روی رفتار تهاجمی زنبورها تاثیر معنی داری داشته است (P<0.05) . تیمارهای غذایی بر جمعیت های تخم، لارو ، شفیره و تولید عسل تاثیر قابل توجهی را در مقایسه با شاهد داشته است (P<0.001) . نتایج تحقیق نشان می دهد که کاربرد توام تریپتوفان و اسید آسکوربیک با ایجاد آرامش بیشتر، افزایش جمعیت کلنی ها و تولید بیشتر عسل را بهمراه داشته است.

واژه‌های کلیدی: مالون دی آلدهید، سرتونین ، ملاتونین، تغذیه.

Investigation on pathogenicity of *Dilophospora alopecuri*, cause of twist disease of Combined effects of edible tryptophan and ascorbic acid on some physiological, biological and behavioral parameters on workers of the Iranian honey bee, *Apis mellifera meda* L.

Ali Hamrahi[1] , Morteze Moahedi Fazel[2], Maryam Moarefi[3] and Nima Eila[4]
1and2. Associate professor Plant Protection Department, Agricultural College. Univercity of Zanjan. Zanjan. Iran.
3. Assistant Professor, Department of Plant Breeding, College of Agriculture. Islamic Azad University-Karaj Branch. Karaj. Iran.
4.Assistant Professor Department of Animal Science, College of Agriculture. Islamic Azad University-Karaj Branch. Karaj. Iran.
(Received: Jul, 5, 2021 - Accepted: Jan, 17, 2022)

ABSTRACT

This study was considered the effect of bees feeding with mixture of tryptophan and ascorbic acid on some physiological, behavioral, and productive parameters in the Iranian honey bee, *Apis mellifera meda* L.. The treatments included tryptophan(12 mg/gr) , ascorbic acid (2 mg/gr) combined in 1:1 syrup (sugar 1 kg per 1 liter of water), and for control treatment only used syrup. Bees were fed once a week.
The results showed that feeding bees with syrup contain tryptophan and ascorbic acid had significant effect on malondialdehyde (MDA), melatonin(MEL) and serotonin(SER) levels (P<0.01). The highest levels of MDA, MEL and SER was observed in worker bees which they fed with tryptophan (31.59± 0.72 pg/ml), combined tryptophan and ascorbic acid (178 ± 5.02 pg/ml) and ascorbic acid treatment (28.31± 5.02 pg/ml) respectively. The minimum levels was recorded in ascorbic acid (17.59± 0.35 pg/ml), (74±3.06 pg/ml) and tryptophan (15.2±0.31 pg/ml) treatments respectively. The weight of treated bees was affected statistically (P<0.001). The heaviest and lightest bees were observed in combined tryptophan and ascorbic acid syrup (111.26 ± 3.26 mg) and control group (90.34 ± 1.75 mg) respectively. The reaction of bees to the leather ball showed that dietary treatments had no effect on the defensive behavior of worker bees. The defined diets had a significant effect on the peace of bees within the colony (P<0.05) and also on the offensive behavior of bees (P<0.05). All treatments had significant effects on eggs, larvae and pupae density and honey production compared to the control (P<0.001). The results show that the combined use of tryptophan and ascorbic acid has led to more relaxation, increased colony population and honey production.

Key words: Malondialdehyde, Melatonin, Serotonin, Nutrition

* Corresponding author E-mail: movahedi@znu.ac.ir

مقدمه

زنبور عسل برای انجام فعالیت های خود به مواد مغذی نیاز دارد (Javaheri *et al*., 2012) و بقاء و سلامت طولانی مدت آن در گرو تغذیه متعادل است (Broadschneider and crailsheim, 2010; Avni *et al*., 2014; wright *et al*., 2018). زمانی که گیاهان دارای شهد و گرده هستند، زنبور عسل مواد مورد نیاز خود را از طبیعت به دست می آورد و هنگامی که دسترسی به منابع شهد و گرده محدود باشد، تغذیه مصنوعی برای بقای کلنی زنبور عسل ضروری است(Fengkui *et al*., 2015). کلنی های زنبور عسل برای ادامه حیات، فعالیت و رشد به کربوهیدرات ها، پروتئین ها، چربی ها، آب، ویتامین ها و مواد معدنی نیاز دارند. زنبورها کربوهیدرات ها را به طور طبیعی عمدتا" از طریق شهد گل و پروتئین، چربی ها، ویتامین ها و مواد معدنی را از طریق گرده دریافت می نمایند(Babayi et al., 2012). میزان تخم گذاری ملکه افزون بر طول روز و شرایط آب وهوایی به مقدار شهد و به خصوص به مقدار گرده ای که زنبورها وارد کندو می کنند، بستگی دارد(Somervill, 2005). متاسفانه تخریب اکوسیستم های طبیعی و کاهش گل ها و تنوع آنها مخاطره جدی برای زنبور عسل است(Goulson *et al*., 2015) . تنش های غذایی می تواند زنبور عسل را آماده تسلیم در برابر انگل ها و پاتوژن ها نموده (Dolezal and Toth, 2018) و مسمومیت آنها در برابر سموم شیمیایی را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد(Tosi *et al*., 2017) .بر این اساس استفاده از غذاهای مکمل امروزه امری رایج در بین زنبور داران است(Glavinic *et al*., 2017) بطوریکه توسعه پیوسته کلنی ها و داشتن جمعیت مناسب در اول بهار برای بجه دهی، ضرورت انجام گرده افشانی و نیز تحمل شرایط آب و هوایی نامطلوب و تهیه ذخایر غذایی کافی برای زمستان گذرانی، زنبور داران را وادار به استفاده از مکمل های غذایی نموده است(Standifer., 1978). از طرفی تغذیه درست زنبور عسل برای بقاء و سلامتی دراز مدت آن ضروری است

تغذیه تکمیلی در زنبور عسل معمولا" به دو صورت تغذیه با مواد قندی و پروتئینی انجام می شود، هر چند که ممکن است در تغذیه با مواد پروتئینی نیز بخشی از جیره از مواد قندی تشکیل شده باشد(Nehzati., 2008). در تغذیه تکمیلی زنبور عسل می توان از منابع پروتئینی متفاوتی شامل گلوتن گندم، سویا، گلوتن ذرت، مخمر ترولا، مخمر آبجو، مخمر نانوایی، پودر ماهی، پودر شیرخشک بدون چربی و پودر کازئین استفاده کرد(Moritz and Crailshiem., 1987).

پروتئین نقش مهمی در تغذیه زنبور عسل دارد. برای رشد و تکامل نوزادان و بقای آنها مقادیر زیادی پروتئین لازم است. ملکه نیز برای تخم گذاری نیازمند پروتئین است (Somervill., 2000). پروتئین مهم ترین عاملی است که طول عمر زنبورهای متولد شده را تحت تاثیر قرار می دهد و هرچه پروتئین بدن بالاتر رود به همان میزان طول عمر زنبورها افزایش می یابد(Somervill., 2000). کامل شدن عضلات پروازی توسعه غدد شیری و فعالیت متابولیکی زنبورهای جوان ارتباط مستقیم با میزان پروتئین گرده و جیره غذایی دارد (Pernal *et al*., 2000 ;Hoover *et al*., 2006).

تریپتوفان یک اسید آمینه ضروری در رژیم غذایی است که می تواند طیف وسیعی از اعمال مانند تنظیم رشد حیوانات، سنتز پروتئین، مصرف غذا و تنظیم رفتار را مدیریت کند(Henry *et al*.,1992; Eder *et al*.,2001;Blokland *et al*., 2002;Young and Leyton., 2002). این اسید آمینه در ساختمان بسیاری از پروتئین ها وجود دارد و نیز در ساخت برخی میانجی های عصبی مانند سروتونین، ملاتونین و کوآنزیم هایی مانند نیاسین موثر است(Livingstone and Tempel., 1983). در درون بدن زنبور تریپتوفان در حضور آنزیم تریپتوفان هیدروکسی لاز به ترکیب ۵-هیدروکسی تریپتوفان (5-HT) تبدیل می شود (Neckamever and White., 1992) . طبق تحقیقات انجام شده 5-HT می تواند بر روی رفتار، سیکل های تولید مثلی، تاثیر آنتی اکسیدانی، سطوح پرخاشگری و طول عمر کارگرهای زنبور عسل تاثیر نماید (Tierney., 2001). چهار گیرنده اصلی 5-HT در زنبور عسل شناسایی شده است (Hauser *et al*., 2006;

Schlenstedt *et al*., 2006; Thamm *et al*., 2010) که در زنبورهای کارگر گیرنده های ذکر شده در تنظیم بینایی، بویایی، یادگیری، حافظه ، رفتار نور گرایی و تنظیم رفتار پرخاشگری نقش دارند (Barnes and Sharp., 1999; Pauwels., 2000; Hannon and Hoyer., 2008) . محققین بر این باورند که تریپتوفان در حالت ترکیبی و آزاد دونقش مجزا را عهده دار است. در حالت ترکیبی در ساختمان پروتئین ها مشارکت نموده و نیز بر روی رشد و نموزنبور عسل تاثیر دارد. در حالت آزاد بر روی رفتار، طول عمرو فعالیت های آنتی اکسیدانی از مسیر 5-HT اثر گذار می باشد (Johnson *et al*., 2009;Thamm *et al*.,2010) . فعالیت اخیر از طریق تولید مالون دی آلدهید (Malondialdehyde) (MDA) محقق می شود که محصول نهایی ناشی از پراکسیداسیون چربی ها است. افزایش میزان MDA بیانگر پراکسیداسیون بیشتر چربی ها و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی است (Suji and Sivakami., 2008; Bitzer-Quintero *et al*. 2010) . بر این اساس، در تحقیق حاضر تاثیر تغذیه زنبور عسل با منابع کمکی تریپتوفان و اسید آسکوربیک(بعنوان یک آنتی اکسیدان تسهیل کننده عمل تریپتوفان) بر فعالیت های بیولوژیکی و رفتاری این حشره مورد ارزیابی قرار گرفت. برای رشد و تکامل هر موجود زنده تعدادی از ویتامین ها نقش اساسی داشته و فقدان آن ها در رژیم غذایی سبب بروز بیماری های مختلفی می گردد(Crailsheim., 2005). ویتامین ث یا همان اسید اسکوربیک جزو ویتامین های اساسی برای جانوران و گیاهان است که نه تنها نقش ویژه آنتی اکسیدانی را بازی می کند بلکه بعنوان کوفاکتور آنزیمی و نیز تنظیم کننده بیان ژن ها و علایم سلولی(Cell signaling) است (Goggin *et al*., 2010) . در حشرات بنظر می رسد این ویتامین در کنترل پروسه جلداندازی (Navon *et al*., 1985) ، تنظیم ذخیره سازی منابع انرژی در همولنف (Bounias., 1980) ، محرک حفاظت از منابع انرژی از طریق کاهش فعالیت آنزیم های تنفسی (Garg and Mahajan., 1994) و نیز تعدیل کننده پاسخ های ایمنی (Pristavko and Dovzhenot.,1974; Kumar *et al*., 2003) نقش دارد. اگرچه خاصیت آنتی اکسیدانی آن مهمترین و برجسته ترین نقش حیاتی آن می باشد (Goggin *et al*., 2010) که سبب افزایش مقدار جذب مواد غذایی در معده میانی حشرات را مهیا می نماید (Felton and Summers., 1993). بر اساس منابع موجود ویتامین ث یک ضرورت غذایی برای بیشتر حشرات تغذیه کننده از منابع گیاهی به خصوص زنبور عسل بوده و نقش مهمی را در زندگی این حشره خصوصا در تخم گذاری ملکه (Huang., 2012) و پرورش لاروها دارا می باشد(Dadd., 1973).

مواد و روش ها

انتخاب، آماده سازی و پرورش کلنی

تحقیق حاضر در زنبورستان دانشگاه آزاد واحد کرج (E'51°00, N' 48°35) در سال ۱۳۹۵ انجام شد. در این آزمایش چهار کلنی زنبور عسل ایرانی *Apis mellifaera meda* L. شناسنامه دار (دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات) انتخاب و یکسان سازی شدند. در داخل هر کلنی دو قاب جمعیت، یک قاب شفیره، یک قاب لارو، یک قاب تخم ویک قاب عسل قرار داده شد. پس از یکسان سازی کندوها، در تیرماه ملکه ها حذف شدند. پنج روز بعد اقدام به شاخون تراشی شد و چهار روز بعد ملکه های خواهری همسن جفت خورده از نژاد ایرانی با قفس مخصوص(ساخت شرکت هفت گوهر) که در دهانه دارای کیک گرده بود، به کندوها معرفی شد. یکی از قاب های جمعیت انتخاب و قفس ها در نیمه بالایی قاب قرار داده شد. دو روز بعد دریچه مربوط به کیک گرده باز شد تا زنبورهای جوان همراه ملکه از داخل و همچنین زنبورهای کلنی از خارج تغذیه کنند تا ملکه آزاد شود. یک روز بعد ملکه ها خارج و در کلنی مستقر شدند.

تیمارهای آزمایشی

با توجه به آنکه هدف تحقیق بررسی اثرات همزمان تریپتوفان و اسید آسکوربیک بر پارامترهای فیزیولوژیکی و فعالیت های رفتاری کارگران زنبور

عسل و در نهایت تاثیرات جمعیتی و عملکردی کندوها بود، لذا تیمارهای آزمایشی بر پایه ۱۲ (mg/gr) تریپتوفان (Merck) (Fengkui *et al*., 2015) و ۲ (mg/gr) اسید آسکوربیک (ویتامین ث) (Merck) (Elton *et al*., 2005 ; Ahmadi *et al*., 2014) به شرح ذیل انتخاب گردید. گروه اول شاهد(تغذیه بدون تریپتوفان و ویتامین ث) گروه دوم(۱۲ گرم تریپتوفان)، گروه سوم (۲ گرم ویتامین ث) وگروه چهارم (۲ گرم ویتامین ث+۱۲ گرم تریپتوفان). تمامی تیمارهای مذکور به یک لیتر شربت ساکارز ۱:۱ (۱ کیلو گرم شکر در ۱ لیتر آب ولرم)(وزنی/حجمی) (Javaheri et al.,2012) اضافه شده و هر هفته یک مرتبه در روز و ساعت معین و به مدت ۴۵ روز بعنوان مکمل در اختیار زنبورها قرار گرفتند.

پارامترهای مورد سنجش

فراسنجه های زیستی و عملکردی

برای تعیین میزان باروری و تخمگذاری ملکه از روش مستقیم برای شمارش استفاده شد. بدین صورت که در هر نمونه برداری تمام قاب های هر کلنی به لحاظ تخم های موجود شمارش گردید. برای تعیین سطح پرورش نوزادان(لارو وشفیره) شمارش به صورت مستقیم و طبق روش (Monajati., 2015) انجام شد. بدین صورت که قابها توسط صفحات شطرنجی که بوسیله سیم های فلزی باریک ساخته شده بود سطح بندی و شمارش گردید .جمعیت بر اساس قاب و با احتساب پوشش کامل جمعیت در دو طرف قاب به منزله یک قاب کامل و در صورت کامل نبودن با احتساب کسری از آن اندازه گیری شد(Rezaei *et al*., 2015 ; Hasanvakili *et al*.,2014 ; Javaheri *et al*.,2012). برای سنجش تولید عسل طبق روش (Monajati., 2015) قبل از آزمایش شان های کلنی هر تیمار را وزن نموده سپس در اواسط و پایان ۴۵ روز توزین شدند. تفاوت وزن شانهای کلنی به عنوان ، میزان تولید عسل توام با موم محاسبه شد.

ویژگی های رفتاری

در این تحقیق صفات آرامش روی قاب و رفتار تهاجمی بر اساس ارزیابی ۴ گانه با روش (Jamshidi *et al*., 2008) تعیین گردید.

آرامش روی قاب:

- اگر در هنگام بازدید اکثر زنبورها از روی قاب پرواز کرده و قاب را ترک کرده باشند، نمره ۱ داده می شد.
- اگر در هنگام بازدید تعدادی از زنبورها پرواز کرده و بقیه روی قاب حرکت کرده باشند، نمره ۲ داده می شد.
- اگر در هنگام بازدید حرکت زنبورها روی قاب کند بود و تعداد کمی از روی قاب پرواز کرده و کلنی را ترک کرده باشند، نمره ۳ داده می شد.
- اگر در هنگام بازدید حرکت زنبورها روی قاب بسیار کند باشد و تقریبا" از قاب ها جدا نشده و زنبورها آرام بوده باشند، نمره ۴ داده می شد.

رفتار تهاجمی

- کندوهایی که بدون دود آرام بودند و بازدید از کلنی ها امکان پذیر بود، نمره ۴ داده می شد.
- کندوهایی که با دود کم آرام می شدند، نمره ۳ داده می شد.
- کندوهایی که با دود کم آرام نشده و عصبی بودند، نمره ۲ داده می شد.
- کندوهایی که با دود زیاد نیز مهاجم بودند، نمره ۱ داده می شد.

ارزیابی رفتار دفاعی کلنی ها طبق روش گوی چرمی سیاه انجام شد(Tahmasbi., 2007) . در این روش عکس العمل زنبورها نسبت به گوی چرمی سیاه رنگی که مانند پاندول حرکت رفت و برگشتی در برابر دریچه پرواز داشت، سنجیده شد. این گوی به مدت یک دقیقه در جلوی دریچه پرواز هر کلنی حرکت داده شد. زنبورهای کارگر کلنی ها متناسب با وضعیت رفتاری خود در مقابل حرکت این گوی چرمی تیره رنگ در جلوی دریچه پرواز می‌کنند و عکس العمل نشان می‌دهند و برای دفاع از کلنی به آن حمله ور شده و آن را نیش می‌زنند. کلنی های آرام تر در

مقابل حرکت گوی چرمی عکس العمل ملایم تری نشان داده و نیش کمتر و یا اصلا نیش نمی‌زنند. ملاک سنجش تعداد نیش فرورفته در گوی چرمی می باشد.

ویژگی های فیزیولوژیکی

۱۵ روز پس از آخرین تغذیه (Monajati.,2015)، از هر تیمار تعداد۱۰ عدد زنبور کارگر فعال بصورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل گردید. برای استخراج همولنف یکی از پاهای زنبور با استفاده از قیچی جراحی به طور عرضی قطع و سپس بدون هیچ گونه فشاری همولنف در میکروتیوب هایی به حجم ۵ میلی لیترجمع آوری شد. برای جلوگیری از فعالیت آنزیم پروفنل اکسیداز که سبب ملانیزه شدن همولنف می گردد، فنیل تیو اوره به نمونه ها اضافه و در یخچال نگهداری شد(Takeda *et al*,.1996).

سنجش مالون دی آلدهید (MAD) :

همولنف استحصالی از زنبورها با ۱۵ میلی لیتر مخلوط TCA 7/5% (P/V) (TCA، EDTA 0.1%(P/V) و0.1% (P/V) پروپیل گالات رقیق گردید. مخلوط با هموژنایزر (پلی ترون PT3000) به مدت یک دقیقه و در دور 5000 rpm هموژنیزه و سپس توسط کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. محلول حاصله برای مدت ۱۰ دقیقه با دور (6000(rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. میزان مالون دی آلدهید در بخش بالا نشین [1] با واکنشگر تیوباربیتوریک اسید(TBA) مورد سنجش قرار گرفت. حدود ۵ میلی لیتر از محلول بالا نشین حاصله از مرحله قبل را انتخاب و به لوله های درپیچ دار منتقل نموده و مقدار ۵ میلی لیتر از ترکیب TBA ۲۰ مولار به آن اضافه شده و پس از تکان های شدید برای مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم و در دمای۱۰۰درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از سرد شدن، مقدار کمپلکس MDA-TBA توسط دستگاه HPLC تعیین گردید. در این دستگاه از ستون C18 (150×4.6 mm, 5µm) و در فاز متحرک از مخلوط بافر KH2PO4 ۵۰ میلی مولار ، متانول و استونیتریل به نسبت ۷۲:۱۷:۱۱ (حجمی /حجمی) استفاده شد. میزان حلال در فاز متحرک 1 ml/minانتخاب گردید. کمپلکسMDA-TBA در دقیقه 5.5 در آشکار ساز اسپکتروفتومتر در طول موج های ۵۲۵ و ۵۶۰ نانومتر ظاهر و قرائت گردید .منحنی استاندارد MDAدر غلظت های ۸،۶،۴،۲ و ۱۰ میکرومولار تعیین گردید (Seljeskog *et al*., 2006).

اندازه گیری سروتونین همولنف

از هر زنبور حدود ۱۵ میکرولیتر همولمف اخذ و به یک میکروتیوب حاوی 20 µl اسید پرکلریک ۰/۱ مولار منتقل و بر روی یخ قرارداده شد. نمونه با استفاده از اسید پرکلریک به حجم نهایی 100 µl رسانده شد، و برای مدت۵ دقیقه در 13000 rpm تحت سانتریوفیوژ یخچال دار قرار گرفت. محلول بالا نشین به لوله دیگری منتقل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. نمونه های همولنف قبل از تزریق به HPLC با حلال فاز مایع با غلظت ۱:۴ رقیق شد. میزان سرتونین موجود در نمونه با حجم نهایی 50 µl با استفاده از HPLC تعیین گردید. یک محلول استوک HT- ۵ سولفات کراتینین (Sigma-Ablrich) 10^{-3} مولار در اسید پرکلریک 0/1 مولار تهیه و در داخل فاز مایع به غلظت 10^{-9} مولار رقیق شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد (-5 fmol 50 HT) به فواصل هر ده نمونه یکبار تزریق شد تا کالیبراسیون غلظت ها محاسبه و کنترل شود. هم چنین فاز ثابت یک ستون C18 reverse phase (3µm Microsorb 100mm×4.6mm) بود که در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تثبیت شد. فاز متحرک شامل مخلوط (NaH2PO4 ۱۲۷ میلی مولار، 1/5mM اسید سولفیک اکتان، EDTA 46.5 mM، متانول ۱۵٪ وPH معادل ۳.۷) انتخاب گردید. میزان دبی حلال حدود ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه بود. ارتفاع پیک های حاصله با توجه به استاندارد محاسبه شد(Alice *et al*., 2013 ; Wright *et al*., 2009).

1 Supernatant

اندازه گیری ملاتونین (Melatonin)

برای اندازه گیری ملاتونین از کیت شرکت Enzo (ENZ-KIT150-0001) استفاده و مقدار ملاتونین در طول موج ۴۵۰ نانومترقرائت شد (Wolf et al., 2016). حساسیت این کیت ۰/۰۸ ng/ml -۵۰ بود.

سنجش وزنی

برای تعیین وزن تر، وزن خشک و همچنین رطوبت از هر گروه تعداد ۱۰ عدد زنبور کارگر انتخاب و در حرارت آون با دمای ۶۵ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. نمونه ها قبل از آون برای وزن تر توزین شدند و پس از خشک شدن به دیسکاتور منتقل و پس از سرد شدن با ترازوی دیجیتال با دقت ۰.۰۰۱ گرم اندازه گیری شد.

تجزیه های آماری

در این تحقیق تاثیر تیمار های غذایی بر پارامترهای فیزیولوژیکی، وزن خشک و مقدار آب بدن بصورت آنالیز واریانس تجزیه و میانگین ها با روش توکی-کرامر گروه بندی شد. پارامترهای رفتاری همچون آرامش روی قاب ها و رفتار تهاجمی با روش کروسکال والیس آنالیز و مقایسه میانگین ها با روش آزمون دوتایی من-ویتنی انجام شد. رفتار دفاعی و پارامترهای زیستی و تولیدی با آزمون کای اسکویر ارزیابی گردید. با توجه به نرمال نبودن برخی از داده ها، پس از تبدیل درصد آب بدن به $ArcSin\sqrt{x}$ و اعمال تبدیل جانسون بر روی وزن خشک و مقدار ملاتونین، تجزیه آماری انجام شد. تجزیه های آماری با نرم افزار مینی تب - ۱۷ انجام شد.

نتایج

پارامترهای فیزیولوژیکی

تغذیه زنبورها با رژیم های غذایی حاوی تریپتوفان و اسید آسکوربیک بر روی میزان مالون دی آلدهید موثر بوده و اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف غذایی ایجاد کرده است ($F_{3,36}=136.52$; $P<0.01$)بطوری که بیشترین مقدار مالون دی آلدهید در زنبورهای کارگر تغذیه شده با تریپتوفان با میانگین۳۱.۵۹۰±۰.۷۲۲ پیکوگرم بر میلی لیتر مشاهده شد(جدول و شکل۱). همچنین میزان ملاتونین بطور معنی داری تحت تاثیر تیمارهای غذایی قرار گرفت ($F_{3,36}=38.31$; $P<0.001$). بیشترین مقدار ملاتونین مربوط به زنبوهای تغذیه شده با مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث با میانگین۱۷۸±۵.۰۲پیکو گرم بر میلی لیتر بود(جدول و شکل ۱). سروتونین یکی دیگر از آمین های بیوژنیک بود که بطور معنی داری تحت تاثیر رژیم های غذایی مختلف قرار گرفت ($F_{3,36}=141.29$; $P<0.01$)بطوری که بیشترین مقدار مربوط به زنبوهای تغذیه شده با ویتامین ث با میانگین ۲۸.۳۱۰±۰.۵۱ پیکو گرم بر میلی لیتر مشاهده شد(جدول و شکل۱).ملاتونین نیز متاثر از رژیم های غذایی مکمل بود و تاثیر معنی داری را بر کمیت ملاتونین داشتند($F_{3,36}=38.31$; $P<0.001$).

بیشترین مقدار ملاتونین مربوط به زنبوهای تغذیه شده با مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث با میانگین۱۷۸ ± ۵.۰۲پیکو گرم بر میلی لیتر مشاهده شد(جدول ۱). همچنین تغذیه زنبورها از رژیم های غذایی مکمل بر وزن گیری آنها موثر بوده و در پایان آزمایش تفاوت معنی داری را در وزن تر ($P<0.01$; $F_{3,36}=8.95$) و وزن خشک ($F_{3,36}=3.63$; $P<0.01$) آنها نشان داد.

بیشترین وزن تر و خشک در تیمار مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث بترتیب با میانگین های وزنی ۱۱۱.۲۶ ± ۳.۲۶۵ میلی گرم و ۳۳.۰۴۷ ±۰.۰۰۲۵ میلی گرم مشاهده شد(جدول ۱) و درصد آب بدن در بین تیمارهای مختلف تفاوتی نداشت ($F_{3,36}=1.49$; $P=0.235$).

جدول ۱. مقایسه میانگین پارامترهای فیزیولوژیکی زنبور های عسل کارگر تحت تاثیر تیمارهای مختلف غذایی تریپتوفان، ویتامین ث و مخلوط آنها.

Table 1. Comparison of the average physiological parameters in worker bees under the effect of different dietary treatments of tryptophan, vitamin C and their mixtures (Treatments indicated by different letters are significantly different at the 5% level).

Treatments Parameters	Tryptophan Mean ± SE	Vitamin C Mean ± SE	Tryptophan+vitamin c Mean ± SE	Control Mean ± SE
Malondialdehyde(pgr/ml)	31.59 ± 0.72 a	17.59 ± 0.359 d	20.4 ± 0.41 c	25.22 ± 0.5 b
Melatonin(pgr/ml)	74 ±3.06 c	119.1 ± 4.81 b	178 ± 5.02 a	81.1 ± 2.97 c
Seretonin(pgr/ml)	15.2 ± 0.316 d	28.31 ± 0.51 a	18.8 ± 0.358 c	23.09 ± 0.64 b
Fresh weight(mg)	103.8 ± 3.87 ab	99.27 ± 2.3 bc	111.26 ± 3.2 a	90.34 ± 1.7 c
Dry weight(mg)	29.09 ± 0.03 b	26.01 ± 0.02 b	33.047 ± 0.002 a	25.36 ± 0.00 b
% water content	72.15 ± 17.2 a	73.66 ± 16.5 a	70.06 ± 14.2 a	71.76 ± 11.5 a

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در سطح ۵٪ تفاوت معنی داری دارند.

رفتار دفاعی

نتایج حاصل از واکنش زنبورها نسبت به گوی چرمی (بعنوان واکنش دفاعی) علیرغم مشاهده تفاوت های عددی قابل توجه خصوصا بین شاهد و تیمار مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث، نشان از عدم تاثیر معنی دار آماری تیمارهای غذایی بر رفتار دفاعی زنبورهای کارگر داشت(جدول ۲).

جدول ۲ : مقایسات آماری پاسخ دفاعی زنبورهای کارگر تغذیه شده با تریپتوفان و ویتامین ث در برابر آزمون گوی سیاه.

Table 2. Statistical comparisons of defense response of Tryptophan and Vitamin C-fed worker bees against black ball test.

Treatments parameters	The time of measuring	tryptophan+ vitamin c	Vitamin C	tryptophan	control
The average number of bites on black ball per minute	At the beginning	2	3	2	3
	At the middle	1	3	2	4
	At the end	1	3	2	4
Statistical comparison with control(χ^2)	-	0.682 = χ^2 P=0.711	0.344= χ^2 P=0.842	0.485 = χ^2 P=0.785	-

همچنین تیمارهای غذایی مکمل بر فاکتور آرامش زنبورهای درون کلنی تاثیر مثبت و معنی داری داشته است($P<0.05$). اگرچه ویتامین ث به تنهایی تاثیر قابل توجهی نداشته است ولیکن مخلوط آن با تریپتوفان و نیز تریپتوفان به تنهایی باعث افزایش آرامش نسبی زنبورها در پایان آزمون شده است (جدول۳). رفتار تهاجمی کارگرها نیز تحت تاثیر تغذیه از رژیم های غذایی مکمل قرار گرفت بطوریکه مخلوط تریپتوفان و اسید آسکوربیک باعث کاهش معنی دار این رفتار در پایان آزمایش شده است ($P<0.05$) ولی هر کدام از ترکیبات فوق به تنهایی نتوانسته اند این فاکتور را تحت تاثیر قرار دهند (جدول ۳).

پارامترهای زیستی و تولیدی

فراسنجه های زیستی و تولیدی در سه بازه زمانی شروع آزمون، پس از ۲۳ روز (وسط دوره) و در پایان دوره آزمایش (۴۵ روز) و در قالب جمعیت تخم های تولیدی، لاروها، شفیره ها، زنبورهای کارگر و میزان تولید عسل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تغذیه زنبورها با مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث و ویتامین ث به تنهایی نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش معنی دار جمعیت حشرات کامل شده است

(P<0.01) اما بر خلاف دو تیمار فوق، تغذیه زنبورها با تریپتوفان به تنهایی تفاوت معنـی داری را در افـزایش جمعیت حشرات کامل با شاهد نشان نـداد.(P<0/05) (جدول ۴).

تاثیر افزایشی تیمارهـا بـر میـزان تخـم گـذاری و باروری ملکه هـا بطـور معنـی داری قابـل توجـه بـود. مقایسه تیمار ها با شاهد نشان داد که هـر سـه تیمـار غذایی تاثیر قابل تـوجهی را بـر افـزایش میـزان تخـم کندوها داشته است(P<0.01). اگرچه بیشترین میزان تخمریزی در رژیم مکمل تریپتوفان توام با ویتامین ث مشاهده شد(جدول ۴).تیمارهـای مـذکور نتـایج قابـل توجه معنی داری را بر افزایش جمعیت لاروهـا داشـته است بطوری که تغذیه با مخلوط تریپتوفان و ویتـامین ث (P<0.01)، با ویتامین ث به تنهایی (P<0.01) و با تریپتوفان به تنهـایی (P<0.01) در مقایسـه بـا شـاهد داشته است (جدول ۴). بطور مشابه تیمارهـای غـذایی تاثیر افزایشی قابل توجهی را بـر جمعیـت شـفیره هـا داشته است بطوریکـه تغذیـه بـا مخلـوط تریپتوفـان و ویتـامین ث (P<0.01) ، بـا ویتـامین ث بـه تنهـایی (P<0.01) و بـا تریپتوفـان بـه تنهـایی (P<0.01)در مقایسه بـا شـاهد تفـاوت معنـی داری را در جمعیـت شفیره ها ایجاد کرده است (جدول ۴).

با عنایت به اثرات افزایشـی تیمارهـای غـذایی بـر پارامترهای جمعیتی، تولید میزان عسل کنـدوها نیـز بطور قابل توجهی تحت تاثیر قـرار گرفتنـد بطوریکـه تغذیه با مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث (P<0.01)، بـا ویتامین ث بـه تنهـایی (P<0.01) و بـا تریپتوفـان بـه تنهایی (P<0.01) در مقایسه بـا شـاهد تفـاوت معنـی داری را در افزایش میزان تولید عسـل کنـدوها داشـته است (جدول ۴).

جدول ۳ : تجزیه آماری داده های فاکتور های آرامش و تهاجم در کارگران زنبور عسل تغذیه شده با تیمارهای تریپتوفان، ویتامین ث و مخلوط آنها طی سه مقطع زمانی شروع آزمون، ۲۳ روز و ۴۵ روز بعد.(میانه هایی که در هر ردیف با حروف متفاوتی گروه بندی شده اند به لحاظ آماری در سطح ۵٪ و طبق آزمون من ویتنی تفاوت معنی داری داشته اند).

Table 3. Statistical analysis of data on relaxation and aggression factors in bee workers fed with tryptophan, vitamin C and their mixtures during the three test periods, at the onset, 23 days and 45 days later. (Medians that indicated by various letters are significantly different at the 5% leve, according to the Mann-Whitney test).

Treatments	Peace factor				
	Median			Kruskal wallis test	
	Onset	After 23 days	After 45 days	H	P
tryptophan	1b	3ab	4a	6.44	0.04
Vitamin c	2a	3a	3a	3.8	0.15
Tryptophan+ vitamin c	2b	3ab	4a	6.15	0.046
control	2a	1a	1a	3.92	0.141
	Aggressiveness factor				
tryptophan	2a	3a	3a	5.78	0.056
Vitamin c	2a	2a	3a	2.91	0.234
Tryptophan+ vitamin c	2b	3ab	4a	7.09	0.029
control	1a	1a	1a	0	1

جدول ۴ : تجزیه آماری داده های فاکتورهای جمعیتی و تولیدی زنبورهای عسل کارگر تغذیه شده با تیمارهای تریپتوفان و ویتامین ث اخذ شده در طی سه مقطع زمانی شروع آزمون، ۲۳ و ۴۵ روز بعد با آزمون کای اسکویر.

Table 4. Statistical analysis of population and production factors data of worker bees fed with tryptophan, vitamin C and their mixture treatments obtained during three test intervals, at the time of beginning , 23 and 45 days later according to the Chi-square test.

Treatments	Time recording	control	Trypthophan	Vitamin C	Tryptophan+ Vitamin C
Workers (combs number)	At the beginning	5	5	5	5
	After 23 days	4	5.5	5.5	6
	After 45 days	3	6	6.5	7.5
Statistical comparison with control	-	-	5.4 = χ^2 P<0/05	6.84 = χ^2 P<0/011	9.88 = χ^2 P<0/0
Eggs	At the beginning	520	503	530	542
	After 23 days	209	607	657	705
	After 45 days	107	805	907	1300
Statistical comparison with control		-	360.9 = χ^2 P<0/01	395.8 = χ^2 P<0/01	558/7 = χ^2 P<0/01
Larvae	At the beginning	243	279	231	250
	After 23 days	102	318	308	497
	After 45 days	54	350	410	553
Statistical comparison with control		-	128.4 = χ^2 P<0/01	183 = χ^2 P<0/01	268.48 = χ^2 P<0/01
Pupae	At the beginning	684	781	729	792
	After 23 days	587	800	893	1021
	After 45 days	410	938	1100	1500
Statistical comparison with control		-	82 = χ^2 P<0/01	141.8 = χ^2 P<0/01	239.3 = χ^2 P<0/01
Honey production(kg)	At the beginning	5.2	5.3	5.5	5.5
	After 23 days	3	6.2	6.5	7
	After 45 days	2.5	7	8	9
Statistical comparison with control		-	1251.3 = $\chi2$ P<0/01	1499.1 = $\chi2$ P<0/01	$\chi2$= 1870.3 P<0/01

بحث

مصرف مطلوب و بهینه مواد غذایی یکی از فاکتورهـای مهم در پرورش اقتصادی جـانوران اهلـی اسـت. بـرای اغلب آنها از جمله زنبور عسـل، مصـرف بیشـتر منـابع غذایی و نهاده های اولیه، تولیدات بیشـتری را بهمـراه خواهد داشت. در این تحقیـق آثـار تغذیـه از غـذاهای حاوی دو مکمل غذایی تریپتوفان و ویتامین ث بر روی زنبور عسل مورد ارزیابی قرار گرفت. در تحقیق حاضـر بیشـترین مقـدار مـالون دی آلدهیـد در تیمارحـاوی تریپتوفان مشاهده شده است و مقادیر کمتر در تیمـار ویتامین ث و مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث مشـاهده شد. فعالیت آنتی اکسیداسـیونی تریپتوفـان منجـر بـه کاهش ترکیب مالون دی آلدهید(MDA) خواهـد شـد چرا کـه در طـی پروسـه اکسیداسـیون، ایـن ترکیـب تولید میشود که محصول نهایی پراکسیداسـیونی لایـه های چربی است، بگونه ای که تجمع آن بیانگر کاهش فعالیـت آنتـی اکسیداسـیونی بـدن اسـت (Sujii and Sivakami *et al*., 2008; Bitzer- Quintero *et al*., 2010). بر خلاف انتظار در زنبورهای تغذیـه شـده بـا تریپتوفان میزان MDA افزایش یافته است کـه طبـق تحقیقـات فنـگ کـوی طبیعـت آنتـی اکسـیدانی تریپتوفان تابع غلظت این ترکیب است بطوریکه مقادیر بالاتر از ۱۲ میلی گرم بر گرم باعـث افـزایش MDA و مقادیر کمتر، باعث کاهش آن خواهد شد (Fengkui *et al*., 2015). اگرچه در این تحقیق نیز مقدار ۱۲ میلی گرم بر گرم پیشنهادی استفاده شد ولی علت بالا بودن میزان MDA احتمالا می تواند بدلیل تفـاوت نژادهـای مورد استفاده و شرایط محیطـی در دو تحقیـق باشـد. ضمن آنکه زنبورهای کارگر ضمن تغذیه از غذای مورد استفاده در قالب تیمارهـا، از شـهد و گـرده گـل هـای بیرونی نیز استفاده کرده انـد کـه بـا توجـه بـه گونـه گیاهان مورد تغذیه، مقادیر متفاوتی از ترکیبات غذایی از جمله تریپتوفان در اختیار زنبورها قرار گرفته اسـت. در تیمار مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث میزان MDA آنها بطور معنی داری از تیمار شاهد کمتر شده اسـت. بنظر میرسد وجـود ویتـامین ث آثارنـامطلوب غلظـت بالای تریپتوفان را تعدیل نموده است. با توجه به آنکـه تریپتوفان علاوه بر مشارکت در سـاختار پـروتئین هـا می تواند بعنوان پیش ماده سنتز سرتونین و ملاتونین باشـــد(tryptophan→5- hydroxytryptophan→5-hydroxytryptamine(serotonin)→N-acetylserotonin→melatonin) (Chattoraj *et al*., 2009; Khan *et al*., 2021)، در این تحقیق مقادیر این دو ترکیـب انـدازه گیـری شـد. نتـایج نشـان داد کـه استفاده از ویتامین ث به تنهایی و توام بـا تریپتوفـان میزان ملاتونین را نسبت به تیمار شاهد بطـور معنـی داری افزایش داده است ولـیکن ایـن میـزان در تیمـار تریپتوفان نسبت به شاهد تفاوت معنی داری نداشـته اســـت. طبـــق نتـــایج اخـــذ شـــده در ســـایر موجـــودات (Livingstone and Tempel ,.1983; Poormortazavi *et al*., 2013) انتظـار افـزایش ملاتونین در تیمار تغذیه بـا تریپتوفـان وجـود داشـت ولیکن داده های حاصله موید این افـزایش در تحقیـق حاضر نیست. بنظر می رسد وجود ویتامین ث در کنار تریپتوفان بطور معنی داری میزان ملاتونین را افـزایش داده است. ملاتونین نه تنها بعنوان یک اکسید کننـده قوی است بلکه خود بعنوان یک ناقل عصبی است کـه افزایش آن باعث کاهش رفتار های تهاجمی در بعضـی از گونـه هـا شـده اسـت (Johnson *et al*., 2009) کـه البته این تاثیر در تحقیق حاضـر نیـز مشـاهده گردیـد بطوریکه فاکتور تهاجمی را به کمترین مقـدار در بـین سایر تیمارهـا رسـاند(جدول-۳). میـزان سـرتونین یـا همان ۵-هیدروکسی تریپتامین بعنـوان یکـی دیگـر از فاکتورهـای تحـت تـاثیر تریپتوفـان، در ایـن تحقیـق تغییرات قابل توجهی را نشـان داد بطوریکـه کمتـرین مقدار را در تیمـار تریپتوفـان و بیشـترین را در تیمـار ویتامین ث نشان داد. بنظر میرسد بـا توجـه بـه آنکـه سرتونین پیش ماده سـنتز ملاتـونین اسـت لـذا بـرای تحلیل منطقی نتایج بایستی مجموع کمیت ملاتونین و سرتونین را مـورد توجـه قـرار داد. بنـابراین بیشـترین مجموع دو فراسنجه اخیر در تیمار مخلوط تریپتوفان و ویتـامین ث بـا مقـدار ۱۹۶ picogram/ml مشـاهده گردید که تفاوت قابل توجهی با سایر تیمارهـا دارد. در تحقیق حاضر انتظار می رفت که در زنبورهـای تغذیـه شده با تریپتوفان میزان سرتونین بیشتری وجود داشته باشد، در حالیکه میزان آن حتـی از تیمـار شـاهد نیـز

کمتر است. تحلیل این تغییر با توجه به کمبود اطلاعات در حوزه حشرات سخت است اما اطلاعات موجود در روی مهره داران خصوصا انسان شاید بتواند کمی این تغییرات را توجیه نماید. آنچه که در تحقیق حاضر انجام شده است مقدار سرتونین در همولنف اندازه گیری شده است در حالیکه مقدار آن در مغز حشره مهم است. چرا که سرتونین موجود در مغز و سیستم عصبی مرکزی است که بسیاری از فعالیت های رفتاری حشره را تحت کنترل خود دارد. افزایش میزان تریپتوفان در ترکیبات غذایی لزوما" منجر به افزایش سرتونین در بافت های مغزی نخواهد شد. اگر چه در غذاهای طبیعی حاوی تریپتوفان بالا بقیه اسیدهای آمینه خنثی در حد متعادلی وجود دارند که این نسبت را تامین می نماید (Strasser *et al*., 2016) . اگر چه در تحقیق حاضر تنها از اسید امینه تریپتوفان استفاده شد ولیکن زنبورهای کارگر خود میتوانستند از شهد و گرده گل های بیرونی نیز استفاده نمایند اگر چه طبق اصل مطرح شده شاید نتوانسته اند نسبت بین اسید های آمینه را متعادل سازند. یکی از نکات دیگر قابل توجه در زنبور عسل رفتار های تهاجمی و میزان آرامش موجود در کلنی است که هرچه آرامش کلنی بیشتر باشد میزان تولید محصولات کندو افزایش می یابد. از طرفی میزان آرامش و نیز کاهش رفتار های تهاجمی با مقادیر سرتونین در مغز مرتبط است. در تحقیقات انجام شده روی انسان و حیوانات مشخص شده است که رفتار های تهاجمی و متقابل تحت تاثیر گیرنده های سرتونرژیک می باشد(Moore *et al*., 2002; Olivier and Van Oorschot, 2005). در مطالعات انجام شده به رابطه معکوس بین سرتونین و رفتار های تهاجمی در گونه های مختلف اشاره شده است (Saudou and Hen., 1994) و نیز شواهدی برای قدرت تنظیم کنندگی سرتونین روی رفتارهای تهاجمی بر روی گونه های مختلف وجود دارد (Olivier and Van Oorschot,. 2005) . البته بسیاری از اطلاعات موجود بیانگر آنست که کمبود سرتونین به تنهایی نمی تواند باعث ایجاد تنش ها و بیماری های عصبی گردد (Jans *et al*., 2007; Russo *et al*., 2009) . در تحقیق حاضر رفتار های دفاعی بطور معنی داری تحت تاثیر هیچکدام از تیمارها قرار نگرفته است ولیکن رفتار تهاجمی در تیمار مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث بطور معنی داری تحت تاثیر قرار گرفته و آرامش بیشتری داشته اند. ۵-هیدرکسی تریپتوفان به عنوان یک ناقل عصبی به گیرنده های HTR7-5 و HT2R-5 که در زنبور عسل نیز وجود دارد، متصل می شود و مانع از بروز رفتار تهاجمی می شود (Johnson *et al*., 2009). وجود ویتامین ث بعنوان آنتی اکسیدان در کنار تریپتوفان باعث تبدیل تریپتوفان به سرتونین در مغز خواهد شد که مکانیزم آن بطور مبسوط در منابع ذکر شده است(Strasser *et al*., 2016) که البته در این تحقیق سرتونین موجود در مغز زنبورها اندازه گیری نشد که بتوان تحلیل محکم تری برای علت ایجاد آرامش بیشتر در زنبورهای مورد تغذیه با مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث ارایه نمود.

در تحقیق انجام شده توسط مناجاتی بر روی زنبور عسل بیان شده است که تیمارهایی که تریپتوفان دریافت کرده اند حالت تهاجمی کمتری نسبت به شاهد داشته اند(Monajati.,2015) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. تغذیه زنبورها با رژیم های غذایی حاوی تریپتوفان و نیز مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث بر آرامش زنبورهای درون کلنی تاثیر مثبت و معنی داری داشته است که میتواند در راستای مطالب ذکر شده در بالا باشد. در این تحقیق تیمارهای غذایی تاثیر معنی داری را بر واکنش های دفاعی نداشته است. بررسی های جواهری و همکاران نشان داد که استفاده از غلظت ۳۰۰۰ پی پی ام ویتامین ث در تغذیه شربت بهاره کلنی ها باعث بروز رفتار دفاعی شدید تر نسبت به گروه شاهد گردید (Javaheri *et al*., 2012). بنظر می رسد تفاوت مشاهده شده بدلیل غلظت بالاتر ویتامین ث استفاده شده در تحقیقات مناجاتی و همکاران بوده است. در تحقیق حاضر تغذیه زنبورها با مخلوط تریپتوفان و ویتامین ث ،ویتامین ث به تنهایی و تریپتوفان نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش میزان تخم گذاری ملکه، جمعیت لاروها، شفیره ها و حشرات کامل و در نهایت باعث افزایش

تولید عسل گردید. تریپتوفان یکی از اسیدهای آمینه اصلی برای موجودات است که نقش قابل توجهی را در بدن موجودات از جمله سنتز پروتئین ها بازی می کند. اگرچه میزان این اسید آمینه در قالب پروتئین های موجود کم است (Bender.,1983)، ولیکن می تواند تاثیرات قابل توجهی را بر تولید جمعیت و بالطبع افزایش تولید عسل داشته باشد، ضمن آنکه برقراری آرامش در کلنی خود منجر به تمرکز انرژی ها در جهت تولید جمعیت و عسل خواهد بود. نکته قابل توجهی که در این تحقیق است آنست که افزایش تریپتوفان باعث افزایش سرتونین نشده است چرا که در گونه های مختلف حشرات افزایش سرتونین باعث کاهش تغذیه شده است (Dacks *et al*., 2003; Nackameyer, 2010; French *et al*., 2014). بطور کلی ویتامین ث به مقدار کافی در گرده گل تازه وجود دارد ولی با ذخیره شدن آن در شان ها و در درجه حرارت کندو به سرعت اکسید شده و از شکل فعال ویتامین (اسید آسکوربیک و اسید دی هیدرواسکوربیک) به شکل غیر فعال آن تبدیل شده و مقدار آن به تدریج کاهش یافته و از دسترس خارج می شود، بنابراین توصیه می شود که این ویتامین به صورت دستی در رژیم های غذایی تکمیلی و تحریکی زنبورهای عسل اضافه شود (Dadd., 1973). اثر ویتامین ث بر تخم گذاری ملکه قطعی بوده(Huang., 2012) و تغذیه زنبورهای عسل با رژیم های فاقد این ویتامین منجر به کاهش شدیدی در پرورش جمعیت نوزادان می گردد (Haydak,. 1970) . در تحقیقات مختلف افزودن مقدار ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ پی پی ام ویتامین ث به غذای زنبورها را باعث تولید بیشترین تخم در ملکه ها دانسته اند (Herbert *et al*., 1985; Elton *et al*., 2005, Javaheri *et al*., 2012; Nikkar *et al*., 2013). در تحقیقی دیگر، رژیم غذایی حاوی ویتامین ث را موجب افزایش تعداد زنبورهای کارگر دانسته و یک رابطه مثبت و دوجانبه میان تخم گذاری و تولید عسل در کلنی مشاهده شده است(Zahra and Taha,. 2008). جواهری و همکاران ویتامین ث را عامل افزایش تخمریزی در ملکه و افزایش تولید عسل در زنبورهای کارگر می دانند (Javaheri *et al*., 2012) . همچنین در منابع اشاره شده است که در تغذیه کمکی کلنی های زنبورعسل بهتراست برای افزایش تخم گذاری ملکه و ترمیم و بازسازی کلنی های ضعیف از ویتامین ث محلول در شربت شکر با غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم بر گرم (2000ppm)استفاده شود(Ahmadi *et al*., 2014). نتایج این تحقیق نشان داد که تغذیه زنبورها با رژیم های غذایی حاوی تریپتوفان و اسید آسکوربیک بر روی وزن تر و مقدار وزن خشک زنبورها تاثیر معنی داری داشته است($p<0.05$)، ولی بر روی میزان آب بدن تاثیر معنی داری نداشته است. در زنبور عسل وزن بدن نشان دهنده قدرت و توانمندی زنبورهای کارگر است وکلنی های زنبور عسل با قوی ترین زنبورهای کارگر قوی ترین بهره وری را خواهند داشت (Fengkui *et al*., 2015). در تحقیقی که اخیرا انجام شده است افزودن مقدار ۱۲ میلی گرم بر کیلوگرم تریپتوفان به شربت شکر باعث افزایش وزن قابل توجهی در زنبورهای کارگر شده است. (Fengkui *et al*., 2015) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. .با توجه به آنکه پروتئین ها بخش قابل توجهی از وزن خشک بدن را تشکیل می دهند طبیعتا" افزایش تریپتوفان می تواند نقش مستقیمی را در تولید برخی از پروتئین ها و در نهایت افزایش وزن بدن بازی نماید و از طرفی ویتامین ث بدلیل نقش آنتی اکسیدانی می تواند زمینه تاثیر عوامل استرس زا را کاهش داده و این امر خود بستر ارتقاء فاکتور های زیستی را فراهم نماید. به صورت کلی نتایج این تحقیق نشان می دهد که استفاده هم زمان از تریپتوفان با غلظت ۱۲ (mg/gr) و ویتامین ث با غلظت ۲ (mg/gr) می تواند فاکتورهای فیزیولوژیکی، رفتاری، زیستی و اقتصادی زنبور عسل ایرانی را بهبود بخشیده که در نهایت ضمن افزایش جمعیت کارگران و حفظ آرامش بیشتر در آنها افزایش تولید و بازده اقتصادی بیشتری را نیز به همراه داشته است.

REFERENCES

1. Ahmadi,A ., Nehzati, Gh.A., Amiri Zandi, M., Abbasi,S. (2014). Effect of different levels of vitamin C on queen laying rate and body protein percentage of worker in honey bee colonies (*Apis mellifera* L.). Iranian Journal of Animal Science, 45(1)37-42.(In Farsi)

2. Alice S. F., Simcock, K.L., Rolke, D., Wright, G.A. (2013). The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honey bee., Journal of Insect Physiology, 61(100)8-15.

3.Avni, D., Hendriksma, H.P., Dag, A., Uni, Z., Shafir, S. (2014). Nutritional aspects of honey bee-collected pollen and constraints on colony development in the eastern Mediterranean. Journal of Insect Physiology, 69, 65–73.

4. Babayi, S., Nehzati, Gh. A., Malekzade, H and Abbasi, S. (2012). Effect of Feeding PRO BEE Diets (as Protein Supplement)on Worker Honey Bees, Body Weight, Protein and Lipid Storage(*Apis mellifera*). Iranian Journal of Animal Science, 43(1):33-40. (In Farsi)

5. Barnes,N.M. and Shaep,T. (1999).A review of central 5-HT receptors andtheir function. Neuropharmacology, 38(8):1083–1152.

6. Bender.,D.A. (1983). Biochemistry of tryptophan in health and disease.Molecular Aspects Of Medicine, 6(2)101-197.

7. Bitzer-Quintero, O.K., Davalos – Marin, A.J., Ortize, G.G., Meza, A.R., Torres – Mendoza, B.M., Robles, R.G., Huerta, V.C., Beas – Zarate, C.M. (2010). Antioxidant activity of tryptophan in rats under experimental endotoxicshock. Biomedicine and Pharmacotherapy, 64:77-81.

8. Blokland, A., Lieben, C., and Deutz, N.E.P. (2002). Antxiogenic and depressive like effects, but on congnitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletioninn the rat. Journal of Psychopharmacology, 16:39-49.

9.Bounias, M. (1980). Effects of ascorbic acid and dehydroascorbic acids per os on the larval glycemia and amino-acidemia of the artificially fed *Laspereysia pomonella* (Lepidoptera). Insect Biochemistry, 10: 521–7.

10. Brodschneider, R., Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in the honeybee (Review). Apidologie, 41, 278–294

11. Chattoraj, A., Liu, T., Zhang, L.S., Huang, Z., Borjigin, J. (2009). Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. *Reviews of Endocrine Metabolic Disorders*, 10(4):237–243.

12. Crailsheim, k. (2005). Unlike nectar foragers, honey bee drones *Apis melifera* are not able to utilize starch as fuel for flight . Apidologie, 36:547–557.

13. Dacks, A.M., Nickel, T., and Mitchell, B.K. (2003). An examination of serotonin and feeding in the flesh fly *Neobellieria bullata* (Sarcophagidae: Diptera). Journal of insect Behavior, 16:1-21.

14. Dadd, R.H. (1973). Insect Nutrition: Current developments and metabolic implications. Annual Review of Entomology.18:381-420.

15. Dearce, A . N. and Huang, A. (2001). Juvenile hormones aggression in honey bees . Journal of Apicultural Research, 8:158-161.

16. Dolezal, A.G., Toth, A.L. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. Current Opinion of Insect Science, 26, 114–119.

17. Eder, K., Peganova, S., and Kluge, H. (2001). Studies on the tryptophan requirement of piglets.Arch Tierernahr, 55:281-297.

18. Elton, W., Herbert, H.R., and Shimanuki, H. (2005). Mineral requirements for brood rearing by hony bees feed a synthetic diet. Journal Apicultural Reserch. 17(3):118-122**.**

19. Felton,G.W., and Summers, C.B. (1993). Potential role of ascorbate oxidase as a plant defense protein against insect herbivory, Journal of Chemical Ecology, 19(7)1553-1568.

20. Fengkui, Xu., Baohua, Ge., and Hongfang, W. (2015).The Appropriate supplementy levels of tryptophan in the Diet of *Apsi mellifera* (Hymenoptera:Apidae) Worker bees. Jornal of Insect Science, 15(1):1-7.

21. Finocchiaro, L., Callebert, J., Launay, J. M., and Jallon, J.M. (1988). Melatonin Biosynthesis in *Drosophila:* Its nature and its effects . Journal of Neurochemistry. 50:382–387.

22. French,A.S., Simcock, K.L., Rolke, D., Gartside, S.E., Blenau, W., and Wright, G.A. (2014).The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. Journal of Insect Physiology, 61:8-15.

23. Garg,S.K., and Mahajan, S. (1994). Effect of ascorbic acid on longevity and biochemical alterations in *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). Archives of Gerontology and Geriatrics. 18(2):149-159.

24. Glavinic, U., Stankovic, B., Draskovic, V., Stevanovic, J., Petrovic, T., Lakic, N., et al. (2017).Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. PLoS ONE, 12(11): e0187726. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187726.

25. Goggin, FL., Avila, CA,. and Lorence, A. (2010). Vitamin C content in plants is modified by insects and influences susceptibility to herbivory. Bioessays, 32:777-790.
26. Goulson, D., Nicholls, E., BotõÂas, C., Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science, 347: 1255957. https://doi.org/10.1126/ science.1255957.PMID: 25721506
27. Hannon, J. and Hoyer, D. (2008).Molecular biology of 5-HT receptors. Behavioural Brain Research, 195: 198.
28. Hassan Vakili, M., Dabiri,N., Negzati,G.A. Moarefi,M. (2014). The nutritional effect of different levels of starch on brood rearing and population growth of honeybee colony (*Apis mellifera*). Iranian Journal of Bee Science and Technology, 11:3-9.(In Farsi)
29. Henry, Y., Colle aux, Y., Ganier, P., Saligaut, A. and Jego, P. (1992). Interactiv effects of dietary levels of tryptophan and protein on voluntary feed intake and growth performance in pigs, in relation to plasmaferr amino acid and hypothalamic serotonin. Journal of animal science, 70:1873 – 1887.
30. Herbert, J.R., Vanderslice, J., and Higgs, D. (1985). Effect of dietary vitamin C levels on the rate of brood production of free – flying and confined colonies of honey bees . Apidologie, 16(4) 385 - 394.
31. Hoover, S.E.R., Higo, H.A., and Winiston, M.L. (2006).Worker honey bee ovary development seasonal variation and the influence of larve land, adolt nutrition. Journal Compretiv Physiology, 176:55-63.
32. Huang, Z. (2012). Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. Terrestrial Arthropod Reviews, 5: 175-189.
33. Hussein, M.R., Ahmed, O.G., Hassan, A.F., and Ahmed, M.A. (2007). Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. International Journal of Experimental Patology, 88:19-29.
34. Hydak, M.H ., (1970). Honey bee Nutrition . Annual review Entomology, 15 : 143 – 651.
35.Jamshidi,M.,Nejati-Javaremi,A.,Ebadi,R.,Tahmasbi,Gh.H. (2008).Estimatingphenotypic correlation between several traits of honeybee population in Tehran, Markazi, Ghazvin and Isfahan provinces of Iran. Pajouhesh & Sazandegi, 79:36-44.(In Farsi)
36. Jans, L.A., Riedel, W.J., Markus, C.R. and Blokland, A. (2006).Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. Molecular psychiatry, 12(6):522-543.
37. Javaheri, S.D., Tahmasebi, Gh.H., Mirhadi, S.A and Tajabadi,N. (2012). Effect of various dietary vitamin C (L – Ascorbic acid) levels on the Rate of population size and honey production in honeybee colonies. Animal Sciences Journal(Pajouhesh & Sazandegi), 97:1-6.(In Farsi)
38. Johnson, O. Becnel, J. and Nichols, C.D. (2009). Serotonin 5-HT2 and 5-HT1A-likereceptors differentially modulate aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster*. Neuroscience, 158: 1292–1300.
39. Khan, Z.A., Hong, P.J.S., Lee, C.H., Hong, Y. (2021). Recent advances in electrochemical and optical sensors for detecting tryptophan and melatonin. International Journal of Nanomedicine, 16: 6861–6888.
40. Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R. (2003). The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 100: 14139–44.
41. Livingstone, M.S. and Tempel, B.L. (1983). Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. Nature, 303: 67-70.
42. Menzel, R., Heyne, A., Kinzel, C., Gerber, B., and Fiala, A. (1999). Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. Behavioral Neuroscience, 113:744-754 .
43. Monajati, S.M. (2015). Effect of L-Tryptophan on behavioral characteristics and function in honeybees (*Apis mellifera meda* L.).MS.C dissertation ,Islamic Azad University, Karaj Branch, Faculty Of Agriculture and Natural Resources Department of Animal Science.(In Farsi)
44. Moore, TM., Scarpa, A., Raine, A. (2002) A meta-analysis of serotonin metabolite 5-HIAA and antisocial behavior. Aggressive Behavior, 28(4):299–316.
45. Moritz, B. and Crailshiem, K. (1987). Physiologyof protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). journal of Insect Physiology, 33 (12) 923-931.
46. Navon, A., Nesbitt, J., Henzel, W. (1985). Effects of ascorbic-acid deficiency on growth and cuticle composition of *Manduca sexta* and *Spodoptera littoralis*. Insect Biochemistry, 15: 285–91.
47. Neckameyer, W.S. (2010). A trophic role for serotonin in the development of a simple feeding circuit.Developmental Neuroscience, 32:217-237.
48. Neckameyer, W.S., and White, K. (1992). A single locus encodes both phenyl-alanine hydroxylase and tryptophan hydroxylase activities in *Drosophila*. Journal of Biological Chemistry, 267: 4199–4206.

49. Nehzati, Gh.A. (2008).Study of Multiple Protein Digestion in Bees. Ph. D. dissertation, University of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran.
50. Nik-kar,M., Ghotbie,A.A., Nehzati,Gh,A. (2013). Effects of Different Levels of Vitamin C on Population Size, Queen Laying Rate of Honey Bee Colonies In Autumn.2nd National Conference on new concepts in Agriculture, 266-271(in Farsi)
51. Novak, M.G., Ribeiro, J.M.C., and Hildebrand, J.G. (1995). 5-Hydroxytryptamine in the salivary-glands of adult female *Aedes aegypti* and its role in regulation of salivation. The Journal of Experimental Biology, 198:167-174.
52. Olivier, B., and van Oorschot, R. (2005). 5-HT1B receptors and aggression: a review. European Journal of Pharmacology, 526:207–217.
53. Pauwels,P.J. (2000).Diverse signaling by5–hydroxytryptophan(5–HT) receptors. Biochimical Pharmacology, 60(12)1743–1750.
54. Pernal, S. F. and Currie, R.W. (2000). Pollen Quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees(*Apis mellifera* L).Apidologie, 31: 387-409.
55. Poor-mortazavi,M.S.,Zarei,A.,Eila, N. and Boojar,M.M. (2013). Effect Level of Tryptophan on Performance in Broiler. National Conference on Animal Nutrition, 291-297.
56. Pristavko, V., and Dovzhenot N. (1974). Ascorbic-acid influence on larval blood-cell number and susceptibility to bacterial and fungal infection in codling moth, *Laspereysia pomonella* (Lepidoptera:tortricidae). Journal of Invertebrate Pathology, 24(2):165-168.
57. Rezaei,A., Nehzati,Gh.A., Moradi-Shahre Babak,M. and GhanjKhanlo, M. (2015). Protein supplement ensiling effects of ensiling on platability, body protein, brood rearing and population growth of honey bee colony (*Apis mellifera*). Iranian Journal of Animal Science, 46(3):345-350. (In Farsi)
58. Russo, S., Kema, IP,. Bosker,F., Haavik,J., Korf,J. (2009). Tryptophan as an evolutionarily conserved signal to brain serotonin: molecular evidence and psychiatric implications. Journal The World Journal of Biological Psychiatry, 10(4)258-268.
59.Saudou,F.,Hen,R.(1994).5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. Neurochemistry International Journal, 25:503–532.
60. Seljeskog,E., Hervig,T., and Mansoor, M. A. (2006). A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. Clinical Biochemistry, 39:947–954.
61. Schlenstedt, J., Balfanz, S., Baumann, A. and Blenau, W. (2006). Am5-HT7:molecular and pharmacological characterization of the first serotonin receptorof the honeybee (*Apis mellifera*). Journal of Neurochemistry, 98: 1985–1998.
62. Shit, N., Singh, R.P., Sastry, K.V.H., Agarwal1, R., Singh, R., N. K. Pandey, N.K. and Mohan, J.M. (2012). Effect of Dietary L-ascorbic Acid (L-AA) on Production Performance, Egg Quality Traits and Fertility in Japanese Quail (*Coturnix japonica*) at Low Ambient Temperature. Asian-Australian Journal of Animal Science, 25(7): 1009 – 1014.
63. Somervill , D. (2005). Fat bees , skinny bees, a manual on honey bee Nutrition for beekeeper , PRIDC publication No . 05/054 , Goulburn , Australia.
64. Somervill, D. (2000). Honey bee nutrition and supplementary feeding. NSW Agricultur Goulburn. 8 pages.
65. Standifer, L.N. (1978). Supplemental feeding of honey bee colonies, USDA Bulletin , No: 413. 8 pages.
66. Strasser, B., Gostner, J.M., and Fuchs, D. (2016). Mood, food, and cognition: role of tryptophan and serotonin. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 19:55–61.
67. Suji, G. and Sivakami, S. (2008). Malondialdehyde, a lipid-derive d aldehyde alters the reactivity of Cys34 and the esterase activity of serum albumin. Toxicology in Vitro, 22: 618–624.
68. Tahmasbi,Gh. (2007). Breeding the Queen bee(2th ed).University of Applied Science and Technology, (in Farsi)
69. Takeda, H.,Y., Kawaguchi,T.,Oshiki,H.,Maekawa, and Tsuchida,K. (1996).Impaired yolk protein uptake by oocytes of a *Bombyx mori* Mutant, Insect. Biochemistry & Molecular Biology Journal, 26:607-616.
70. Thamm, M., Balfanz, S., Scheiner, R., Baumann, A., and Blenau, W. (2010). Characterization of the 5-HT1A receptor of the honeybee (*Apis mellifera*) and involvement of serotonin in phototactic behavior. Cellular and Molecular Life Sciences, 67: 2467–2479.
71. Tierney,A.J. (2001). Starure and function of inverte brate 5–HT receptors:a review . Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular and Integrative physiology, 128 (4):791– 804.
72. Tosi, S., Nieh, J.C., Sgolastra, F., Cabbri, R., Medrzycki, P. (2017). Neonicotinoid pesticides and

nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. Proceding of Biological Science, 284 (1869) PMID: 29263280.
73. . Verma, S., and phogat, K. (1982). Studies on the effect of water soluble vitamin C on brood rearing and comb building activities of worker honey bees (*Apis cerana* indica F.), Indian Bee Journal, 44-58.
74. Vleugels, R., Verlinden, H. and Broeck, J.V. (2015). Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. Neurotransmitter, 2: 1-14.
75. Wolf, K., Braun, A., Haining, E.J., Tseng, Y.L., Kraft, P., Schuhmann, M.K., et al. (2016). Partially defective store operated calcium entry and hem. (ITAM) signaling in platelets of serotonin transporter deficient mice. PLoS ONE, 11(1): e0147664. doi:10.1371/journal.pone.0147664
76. Wright, G.A., Carlton, M., Smith, B.H. (2009). A honeybee's ability to learn, recognize, and discriminate odors depends upon odor sampling time and concentration. Behavioral Neuroscience, 123, 36–43.
77. Wright, G.E., Nicolson, S.W., Shafir, S. (2018). Nutritional physiology and ecology of honey bees. Annual Review of Entomology, 63 (1), 327–344.
78. Yang, L., Qin,Y., Li, X., Song, D., Qi, M. (2007). Brain melatonin content and polyethism in adult workers of *Apis mellifera* and *Apis cerana* (Hym:Apidae).Journal of Applied Entomology, 131(9-10)734-739.
79. Young, S.N., and Leyton,M. (2002). The role of serotonin in human mood and social interaction Insight from altered tryptophan levels. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 71:857-865.
80. Yuan, Q., Joiner, W.J., and Sehgal, A. (2006). A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor. Current Biology, 16:1051-1062 .
81. Yuan, Q., Lin, F., Zheng, X., and Sehgal, A.M. (2005). Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. Neuron, 47:115-127.
82. Zahra, A., and Tala, M. (2008). Impact of pollen supplements and vitamins on the development of hypopharyngeal glands and brood area in hony bees. Jornal of Apicultural Science, .52 (2)5-12 .
83. Zhang, J.Z., Xue, X.F., Zhou, J.H., Chen, F., Wu, L.M., Li, Y. and Zhao, J. (2009). Determination of tryptophan in bee pollen and royal jelly by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Biomedical Chromatography, 23: 994–998.

پیوست ۱: تجزیه آماری پارامترهای فیزیولوژیکی زنبور های عسل کارگر تحت تاثیر تیمارهای مختلف غذایی تریپتوفان، ویتامین ث و مخلوط آنها.

Appendix 1. ANOVA of physiological parameters in worker bees under the effect of different dietary treatments of tryptophan, vitamin C and their mixtures.

SOV	df	SS	MS	F	P
Malondialdehide	3	1130.96	376.99	136.52	0.00
Error	36	99.41	2.76		
Total	39	1230.37	12.77		
Melotonin	3	38.313	0.27122	47.09	0.00
Error	36	9.764			
Total	39	48.077			
Serretonin	3	957.94	319.3	141.29	0.00
Error	36	81.36	2.26		
Total	39	1039.3			
Wet weight	3	2296	765.41	8.95	0.00
Error	36	3078	85.5		
Total	39	5374			
Dry weight*	3	15.31	5.104	8.51	0.00
Error	36	21.59	0.599		
Total	39	36.9			
Water content**	3	0.00801	0.00267	1.5	0.229
Error	36	0.0638	0.00177		
Total	39	0.08183			

Data were analyzed after Johnson* and Arcsin√x ** transformed.