Iranian Journal of Animal Science
Vol 48, No 1, Spring 2017 (101-107)
DOI: 10.22059/ijas.2017.133536.653366

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۸، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۶ (ص ۱۰۷-۱۰۱)

تأثیر عصارۀ آبی اندام‌های هوایی گیاه سرخارگل بر فراسنجه‌های ایمنی زنبورعسل (*Apis mellifera*)

زهرا گرزین[۱]، حسین مروج [۲*]، غلامعلی نهضتی پاقلعه[۳]، لیلا تبریزی[۳] و علیرضا مرادی[٤]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
٤. کارشناس ارشد، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۷/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/٤)

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی عصارۀ اندام‌های هوایی گیاه سرخارگل در تغذیۀ زنبورعسل و تأثیر آن بر سامانۀ ایمنی از جمله سنجش شمار هموسیت‌ها و آنزیم فنل اکسیداز بر پایۀ آزمایش صحرایی در بهار و تابستان ۱۳۹۳ به مدت چهار ماه انجام شد. شمار ۲۸ کلنی همسان‌سازی شده به‌طور تصادفی به چهار تیمار و هفت تکرار تقسیم شدند، تیمارها عبارت بودند از: ۱- شربت شکر خالص بدون عصاره، ۲- شربت شکر غنی‌شده با ۱۰ سی‌سی عصاره، ۳- شربت شکر غنی‌شده با ۲۰ سی‌سی عصاره، ٤- شربت شکر غنی‌شده با ۳۰ سی‌سی عصاره. نتایج نشان داد آنزیم فنل اکسیداز در ایمنی کوتاه‌مدت و بلندمدت در زنبورهایی که شربت حاوی ۳۰ سی‌سی عصاره را دریافت کردند بیشتر و در زنبورهایی که شربت شکر خالص دریافت کردند کمتر بود (p<۰/۰۵). در ایمنی کوتاه‌مدت، شمار هموسیت‌ها در زنبورهایی که از شربت حاوی ۲۰ سی‌سی عصاره استفاده کردند نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر و در زنبورهایی که از شربت شکر خالص استفاده کردند کمتر بود (p<۰/۰۵). در ایمنی بلندمدت نیز شمار هموسیت‌ها در زنبورهایی که شربت شکر با ۳۰ سی‌سی عصاره را دریافت کردند بیشتر و آن‌هایی که شریت شکر خالص دریافت کردند کمتر بود (p<۰/۰۵). بر پایۀ نتایج به‌دست‌آمده استفاده از این عصاره سمانۀ ایمنی زنبورعسل را بهبود می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: زنبورعسل، تغذیه، سرخارگل، سامانۀ ایمنی.

Effect of *Echinacea purpurea* herbal extract on immune parameters in honey bee (*Apis mellifera*)

Zahra Gorzin[1], Hossein Moravej[2*], Gholam Ali Nehzati Paghale[3], Leyla Tabrizi[3] and Alireza Moradi[4]
1, 2, 3. M. Sc. Student, Associate Professor and Asistance Professor, University of Agricultural Sciences & Natural Resources University of Tehran, Karaj, Iran
4. Former M. Sc. Student, University of Urmia, Iran
(Received: Oct. 5, 2015 - Accepted: Sep. 25, 2016)

ABSTRACT

This study investigated Echinacea purpurea herbal extract in honey bee nutrition and its effect immune system including measuring total haemocyte counts and phenoloxidase enzyme. 28 colonies were randomly divided into 4 treatments and 7 replicates.1- sugar syup – control, 2- sugar syrup enriched with 10 cc extract 3- sugar syrup enriched with 20 cc extract, 4- sugar syrup enriched with 30 cc extract. This experiment was conducted in the laboratory and Apiaries University of Tehran-Karaj in completely randomized design repeated in time during spring and summer of 2013. The results showed treatments had a significant effect on phenol oxidase enzyme activity in short and long-term immune ($p<0.05$), the enzyme was higher in bees that get sugar syrup enriched with 30 cc extract and lower in bees that get sugar syrup. In total haemocyte counts treatments had significant effect in short-term ($p<0.05$), the factor was highest was in bees that get sugar syrup enriched with 20 cc extract and lower in bees that get sugar syrup.too was observed that higher in bees that get sugar syrup enriched with 30 cc extract and lower in bees that get sugar syrup in long immune. The results showed that this extract had a positive effect on the immune system.

Keywords: *Echinacea purpurea*, honey bee, immune system, nutrition.

* Corresponding author E-mail: hmoraveg@ut.ac.ir Tel: +98 26 32248082

مقدمه

زنبورعسل، افزون بر تولید محصولات گوناگون از جمله عسل، موم، بره‌موم و ژل رویال و همچنین اشتغال‌زایی در صنایع مختلف، مهم‌ترین نقش خود را در طبیعت با دخالت در عمل گرده‌افشانی و افزایش تولید محصولات کشاورزی و احیای محیط‌زیست ایفا می‌کند. حدود یک‌سوم از کل غذای انسان مستقیم یا غیرمستقیم از گیاهانی به دست می‌آید که به‌وسیلهٔ حشرات گرده‌افشانی می‌شوند، نزدیک به ۸۰ درصد عمل گرده‌افشانی به‌وسیلهٔ زنبورعسل انجام می‌شود. با توجه به اینکه زنبورعسل زندگی اجتماعی دارد بیشتر تحت تأثیر آفات، بیماری‌ها و عامل‌های خارجی قرار می‌گیرد که این امر باعث کاهش عملکرد کلنی می‌شود (Alaux *et al*., 2010). CCD (Colony Collapse Disorder) یا سندرم ریزش کلنی یک نوع ناهنجاری است که در فرآیند آن زنبوران کارگر یا چرارو به‌طور ناگهانی از مجموعهٔ جمعیت ناپدید می‌شوند درحالی‌که در اطراف کلنی‌ها اثر چندانی از زنبوران تلف‌شده مشاهده نمی‌شود، به‌عبارت‌دیگر زنبوران کارگر برای انجام فعالیت‌های روزانه از کندو خارج شده و دیگر باز نمی‌گردند. بنابراین آنچه در کندو باقی می‌ماند ملکهٔ کلنی، شفیره‌ها، زنبوران جوان و میزان شایان‌توجهی از ذخیرهٔ مواد غذایی است (Poncea *et al*., 2009). زنبورعسل برای رویارویی با بیماری‌ها از سازوکارهای دفاعی از جمله رفتارهای بهداشتی، فرمون‌ها و نیش به‌عنوان نخستین خط دفاعی استفاده می‌کند، دومین خط دفاعی پوشش خارجی یا کوتیکول است و پس از آن همولنف است. خط دفاعی بعدی سمانهٔ ایمنی است زنبوران عسل بدون سمانهٔ ایمنی اکتسابی هستند و تنها سمانهٔ ایمنی ذاتی دارند. ایمنی ذاتی شامل: ایمنی یاخته‌ای و ایمنی هومورال است. ایمنی یاخته‌ای نقش فاگوسیتوز، تشکیل گره، تشکیل کپسول، انعقاد خون و ترمیم زخم‌ها را دارد. ایمنی هومورال نیز از پروتئین‌های شناسایی‌کنندهٔ الگوها، سیستم پروفنل اکسیداز، ترکیب‌های اکسیژنی و نیتروژنی واکنش‌زا، پپتیدها و پروتئین‌ها با خاصیت ضدمیکروبی تشکیل می‌شود. آنزیم فنل اکسیداز سبب اکسایش (اکسیداسیون) ترکیب‌های منوفنلی (مانند تیروزین) و تبدیل آن‌ها به ترکیب‌های دی فنلی (دی هیدروکسی فنیل آلانین) می‌شود. ترکیب‌های دی فنلی هم به‌وسیلهٔ آنزیم فنل اکسیداز، اکسید شده و تبدیل به کوینون می‌شوند. کوینون بدون دخالت آنزیم، وارد واکنش‌های دیگری خواهد شد که ملانین تشکیل می‌شود که در نهایت این ماده عامل‌های خارجی و ریزجانداران (میکروارگانیسم‌های) مهاجم را نابود می‌کند (Evans *et al*., 2006).

شناسایی و پیشگیری از بیماری‌های زنبورعسل و کشف راه‌هایی برای بالا بردن سطح بهداشت کلنی هم از جنبهٔ اقتصادی و هم از لحاظ علمی اهمیت دارد. با توجه به اینکه روش‌های شیمیایی عوارض جانبی دارند و استفاده از آن‌ها محدود شده است اسانس و عصارهٔ گیاهان دارویی به دلیل فعالیت ضدانگلی و میکروبی گزینهٔ بسیار مناسبی برای پیشگیری و جلوگیری از توسعهٔ بیماری‌ها، افزایش مقاومت بدن در برابر عفونت‌ها و تقویت سمانهٔ ایمنی است (Poncea *et al*., 2009).

در یک بررسی Pohorecka *et al*. (2009) تأثیر عصارهٔ گل همیشه‌بهار، گزنه، اکیناسه آنگوستیفولیا را در وضعیت عمومی زنبورعسل از جمله وزن بدن، غدد شیری، گسترش چربی بدن بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصارهٔ آنگوستیفولیا در گسترش چربی بدن، گزنه در گسترش وزن بدن و گل همیشه‌بهار در گسترش غدد شیری بیشترین تأثیر را داشته است. با توجه به اینکه چربی بدن جزئی از سمانهٔ ایمنی زنبورعسل به‌شمار می‌آید می‌توان نتیجه گرفت که عصارهٔ آنگوستیفولیا سمانهٔ ایمنی را تقویت می‌کند.

در یک بررسی اسانس اندام هوایی کافور، نعناع و آویشن را برای از بین بردن کنهٔ واروا به کار بردند، بنابر نتایج به‌دست‌آمده اسانس این گیاهان تأثیر بسیاری در کاهش جمعیت کنه‌ها داشته است (Calderone, 1999).

در بررسی اسانس گل شمعدانی و ریحان را برای رویارویی با کنهٔ واروا در نظام نگهداری در قفس و در فصل‌های پاییز، زمستان و بهار استفاده و درصد آلودگی نوزادان و زنبورها، کاهش شمار کنه‌ها و درصد مرگ‌ومیر آن‌ها را اندازه‌گیری کردند، در این بررسی اسانس‌ها به‌طور یکپارچه با مخلوط با فرمیک اسید و اگزالیک اسید به گرده اضافه و استفاده شدند، نتایج نشان داد که کلنی‌های تحت درمان در مقایسه با آن‌هایی که درمان نشدند بدون خطر آلودگی عسل

تأثیر بسزایی را در کاهش شمار کنه‌ها و همچنین افزایش جمعیت دارد (Ismail *et al*., 2006).

در یک گزارش اسانس زیرۀ سیاه و اسید فرمیک را در پانزده کلنی زنبورعسل و تأثیر آن‌ها روی رفتارهای دفاعی در برابر کنه بررسی کردند، این مواد به‌صورت نوار در شان‌ها تا سه هفته استفاده شد که در نتیجه باعث افزایش رفتار دفاعی و نظافت در زنبوران کارگر شدند و رفتار درپوش‌برداری از حجره‌های آلوده به کنۀ واروا، در شان‌های کندوی زنبورعسل جستجو و حذف این حجره‌ها، رفتار گاز گرفتن و آسیب رساندن به کنۀ واروا را نیز افزایش دادند (Zakaria *et al*., 2007).

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* گیاهی چندساله و علفی متعلق به خانوادۀ Asteraceae است و جنس اکیناسه شامل ۹ گونه است که سه گونۀ آن یعنی *E. pallia*، *E. purpurea* و *E. angustifolia* کاربرد درمانی دارند، در این بررسی گونۀ پورپورا مدنظر است. این گیاه بومی امریکاست و در گیاهان (فلور) ایران وجود نداشته و بذرهای اصلاح‌شدۀ آن در سال ۱۳۷۲ از مجارستان به ایران آورده شد و توسط متخصصان گیاه‌شناس نام سرخارگل برای آن انتخاب شد (Omidbeigi, 2005).

اکیناسه شامل مشتقات کافئیک اسید به‌ویژه شیکوریک اسید، کافتاریک اسید، کلروژنیک اسید و اکیناکوزید است و یازده ترکیب آلکیل آمیدی از جمله ایزوبوتیل آمید، متیل بوتیل آمید، ۲-متیل بوتیل آمید دارد، همچنین ریشه و پیکر رویشی آن فلاونوئید، پلی استیلن وآلکالوئید دارند، سرشاخه‌های هوایی گونۀ پورپورا نیز سرشار از اسیدهای شیکوریک و کافتاریک بوده و میزان اسید کلروژنیک آن ناچیز است (Ghaemi *et al*., 2008).

سرخارگل به‌منظور پیشگیری و درمان سرماخوردگی و سرفه، برونشیت، عفونت‌های ریوی، اختلالات جلدی، مارگزیدگی، بیماری‌های دهان و دندان، معالجۀ مسمومیت‌ها، سوءهاضمه و تب‌خال در انسان استفاده می‌شود (Ghaemi *et al*., 2008).

هدف از این بررسی تأثیر عصارۀ آبی گیاه سرخارگل بر سمانۀ ایمنی زنبورعسل از جمله اندازه‌گیری شمار هموسیت و آنزیم فنل اکسیداز است.

مواد و روش‌ها

این بررسی در زنبورستان مزرعۀ آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران اجرا شد. از شمار ۲۸ کلنی زنبورعسل که همگی از نظر ملکه و جمعیت یکسان‌سازی شده بودند استفاده شد، در طول دورۀ آزمایش عصارۀ سرخارگل با دزهای متفاوت مخلوط با شربت شکر ۱ به ۱ به‌صورت یک روز در میان و به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر شربت برای هر کندو مصرف شد این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی تکرار شده در زمان با چهار تیمار و هفت تکرار به شرح زیر انجام گرفت:

۱- ۵۰۰ سی‌سی شربت شکر خالص بدون عصاره (شاهد)

۲-۵۰۰ سی‌سی شربت شکر غنی‌شده با ۱۰ سی‌سی عصاره

۳- ۵۰۰ سی‌سی شربت شکر غنی‌شده با ۲۰ سی‌سی عصاره

۴- ۵۰۰ سی‌سی شربت شکر غنی‌شده با ۳۰ سی‌سی عصاره

آماده‌سازی عصارۀ سرخارگل

اندام‌های هوایی گیاه سرخارگل در تابستان ۱۳۹۲ از مزرعۀ باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی گردآوری و در سایه خشک شدند. برای عصاره‌گیری از این گیاه اندام‌های هوایی پس از خشک شدن آسیاب شده، آن را به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر مخلوط کرده و به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه لرزا (شیکر) قرار داده شد، سپس محلول از کاغذ صافی عبور داده شد و عصارۀ مخلوط با شربت شکر با دزهای متفاوت در اختیار کلنی‌ها قرار گرفت.

ایمنی به دو روش ایمنی کوتاه‌مدت به فاصلۀ زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ساعت و ایمنی بلندمدت به فاصلۀ ۷، ۱۴ و ۲۸ روز با توجه به روش Korner *et al*. (2004) انجام شد. با توجه به اینکه طول دورۀ رشد کامل زنبورعسل حدود سی روز است این زمان‌بندی انتخاب شد. برای بررسی ایمنی از شمارش شمار هموسیت‌ها و اندازه‌گیری فنل اکسیداز در همولنف استفاده شد.

شمارش هموسیت‌ها

در این روش پس از وارد کردن تکانهٔ (شوک) سرمایی به زنبورها و ایجاد یک شکاف در فاصلهٔ بین بندهای ۳ و ۴ شکمی، همولنف با استفاده از نمونه‌بردار (سمپلر) گردآوری شد. برای شمارش هموسیت‌ها ۱۰ میکرولیتر از همولنف بی‌درنگ با ۱۰ میکرولیتر محلول تایسون (NaCl 2.72 Mm,Na_2So_4 8.96 mM,glycerol 43.68Mm, methyl violate 0.061 Mm) درون یک اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط شد. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها ۱۰ میکرولیتر از آن را روی لام گلبول شمار (نئوبار) قرار داده و پس از پخش شدن کامل نمونه روی لام، لامهٔ سنگی روی آن قرار گرفت و یاخته‌ها با استفاده از فرمول زیر شمارش شد (Human *et al*., 2013).

$$\frac{\text{تعداد کل سلول‌های خونی}}{\text{تعداد کل ذرات شمارش‌شده} \times \text{فاکتور رقت}} = \text{مساحت مربع‌های شمارش شده } (mm^2) \times \text{عمق اتاقک } (mm)$$

تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

در این روش همولنف از بند سوم شکم زنبوران بالغ گردآوری شد و میزان ۵۰ میکرولیتر از همولنف با ۵۰ میکرولیتر بافر ضد انعقاد خون مخلوط و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس در ۱۰۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد، آنگاه از محلول رویی به‌عنوان منبع آنزیمی استفاده شد، بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به ۲۰ میکرولیتر از محلول ۰/۰۲ مولار ال-دهیدروکسی فنیل آلانین و ۱۰۰ میکرولیتر از بافرفسفات اضافه شد و در دستگاه ریزصفحه‌خوان (microplate reader) در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر، هر ده دقیقه یک‌بار به‌مدت چهل دقیقه خوانده شد (Laughton *et al*., 2010).

نتایج و بحث

تأثیر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز، ایمنی کوتاه‌مدت و بلندمدت

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز که برحسب (OD[1]) طول‌موج نوری اندازه‌گیری‌شده در جدول ۱ ارائه شده است. بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ آماری داده‌ها تأثیر تیمارهای آزمایشی در ایمنی کوتاه‌مدت در ده ساعت پس از تغذیه معنی‌دار بود ($P<$ ۰/۰۵)، در زنبورهایی که از شربت شکر حاوی ۳۰ سی‌سی عصاره استفاده کردند بیشتر و در آن‌هایی که از شربت شکر خالص استفاده کردند کمتر بود. در بیست ساعت پس از تغذیه نیز تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان دادند به‌طوری‌که در زنبورهایی که شربت شکر حاوی ۳۰ سی‌سی عصاره را دریافت کردند بیشتر و در زنبورهایی که شربت شکر خالص دریافت کردند کمتر بود. در سی ساعت پس از تغذیه تیمار با ۲۰ سی‌سی عصاره و تیمار با ۳۰ سی‌سی عصاره تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند در تیمار شاهد و تیمار ۱۰ سی‌سی عصاره نیز همین حالت مشاهده شد.

در ایمنی کوتاه‌مدت در تیمار شاهد و تیمار با ۱۰ سی‌سی عصاره بین ده و سی ساعت پس از تغذیه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، ولی بین این دو زمان با بیست ساعت پس از تغذیه اختلاف معنی‌دار بود. در تیمار با ۲۰ سی‌سی عصاره بین ده و بیست ساعت پس از تغذیه تفاوت معنی‌داری دیده نشد، ولی بین این دو زمان با سی ساعت پس از تغذیه تفاوت معنی‌دار بود. در تیمار با ۳۰ سی‌سی عصاره بین سه زمان مختلف تفاوت معنی‌دار بود و میزان آنزیم در سی ساعت پس از تغذیه نسبت به دیگر زمان‌ها بیشتر و در بیست ساعت پس از تغذیه نسبت به دیگر زمان‌ها کمتر بود.

بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ آماری داده‌ها تأثیر تیمارهای آزمایشی در ایمنی بلندمدت در هفت روز پس از تغذیه معنی‌داری بود. میزان آنزیم در زنبورهایی که از شربت شکر حاوی ۲۰ سی‌سی عصاره استفاده کردند نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر و آن‌هایی که از شربت شکر خالص استفاده کردند کمتر بود. در چهارده روز پس از تغذیه تیمار با ۲۰ سی‌سی عصاره و تیمار با ۳۰ سی‌سی عصاره تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند در تیمار شاهد و تیمار با ۲۰ سی‌سی عصاره نیز همین حالت مشاهده شد. تأثیر تیمارهای آزمایشی در ۲۸ روز پس از تغذیه معنی‌داری بود میزان آنزیم در زنبورهایی که شربت شکر حاوی ۳۰ سی‌سی عصاره را دریافت کردند نسبت به

1. Optical Density

دیگر گروه‌ها بیشتر و در زنبورهایی که شربت شکر خالص را دریافت کردند کمتر بود.

در ایمنی بلندمدت بنابر جدول ۱ در تیمار شاهد بین روز ۷ و ۱۴ تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد، ولی بین این دو زمان با روز ۲۸ تفاوت معنی‌دار بود. در تیمار ۱۰، ۲۰ و ۳۰ سی‌سی عصاره بین زمان‌ها اختلاف معنی‌دار دیده شد و میزان آنزیم در ۲۸ روز پس از تغذیه نسبت به دیگر زمان‌ها بیشتر و در ۱۴ روز پس از تغذیه نسبت به دیگر زمان‌ها کمتر بود.

جدول۱. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر میانگین حداقل مربعات آنزیم فنل اکسیداز، واحد: (OD) طول‌موج نوری

Table 1. Effect of treatments on Least-squares phenoloxidase enzymes, (OD) Optical Density

Time	Sugar syup control	Sugar syrup with 10 cc extract	Sugar syrup with 20 cc extract	Sugar syrup with 30 cc extract
Short term immune				
10 h	0.324^{Abc}	0.363^{Ab}	0.312^{Bc}	0.458^{Ba}
20 h	0.185^{Bc}	0.272^{Bb}	0.305^{Bab}	0.339^{Ca}
30 h	0.347^{Ab}	0.378^{Ab}	0.536^{Aa}	0.536^{Aa}
Total	0.285^{d}	0.337^{c}	0.384^{b}	0.444^{a}
Long term immune				
7 d	0.145^{Bd}	0.238^{Bc}	0.384^{Ba}	0.331^{Bb}
14 d	0.146^{Bb}	0.150^{Cb}	0.214^{Ca}	0.225^{Ca}
28 d	0.294^{Ad}	0.365^{Ac}	0.482^{Ab}	0.602^{Aa}
Total	0.195^{d}	0.251^{c}	0.360^{b}	0.386^{a}

a-b: حرف‌های نا همسان در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ تیمارها در هر زمان و کل به‌صورت مستقل است.

A-B: حرف‌های نا همسان در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ تیمارها به‌طور مستقل تنها در دوره‌های مختلف است.

a-b: Different letters in each row indicate a significant difference at the error level of 0.05 of treatments at any time and as a whole independently.
A-B: Different letters in each column indicate a significant difference at the error level of 0.05 of treatments independently in different periods.

تأثیر تیمارهای مختلف بر شمار هموسیت، ایمنی کوتاه‌مدت و بلندمدت

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر شمار هموسیت‌ها (شمار در میلی‌لیتر) در جدول (۲) ارائه شده است، اثر تیمارها در ده ساعت پس از تغذیه معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میزان هموسیت در زنبورهایی که از شربت شکر با ۲۰ سی‌سی عصاره استفاده کردند نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر و در آن‌هایی که از شربت شکر با ۱۰ سی‌سی عصاره استفاده کردند کمتر بود. در بیست ساعت و سی ساعت پس از تغذیه اختلاف‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، میزان هموسیت در زنبورهایی که شربت شکر حاوی ۲۰ سی‌سی عصاره دریافت کردند نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر و در آن‌هایی که شربت شکر خالص دریافت کردند کمتر بود. در ایمنی کوتاه‌مدت در تیمار شاهد بین زمان‌های بیست و سی ساعت پس از تغذیه اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد، ولی بین این دو زمان با ده ساعت تفاوت معنی‌دار بود. در تیمار با ۱۰ سی‌سی عصاره بین سه زمان تفاوت معنی‌داری دیده شد، میزان هموسیت در بیست ساعت پس از تغذیه نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر و در ده ساعت پس از تغذیه نسبت به دیگر گروه‌ها کمتر بود. در تیمار با ۲۰ سی‌سی عصاره و تیمار با ۳۰ سی‌سی عصاره نیز تفاوت‌ها معنی‌دار بود.

در ایمنی بلندمدت بنابر جدول ۲ تیمارها در هفت روز پس از تغذیه اختلاف معنی‌دار داشتند، ولی تیمار شاهد و تیمار با ۳۰ سی‌سی عصاره تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند، در چهارده روز پس از تغذیه بین تیمار با ۳۰ سی‌سی عصاره نسبت به دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و در ۲۸روز پس از تغذیه نیز تأثیر تیمارها معنی‌دار بود، در زنبورهایی که از شربت شکر حاوی ۳۰ سی‌سی عصاره استفاده کردند نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر و در زنبورهایی که از شربت شکر خالص استفاده کردند کمتر بود.

در ایمنی بلندمدت بنابر جدول ۲ در تیمار شاهد بین روز هفت و چهارده تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد، ولی بین این دو زمان با روز ۲۸ تفاوت معنی‌دار بود، در تیمار با ۱۰ سی‌سی عصاره بین روزهای ۱۴ و ۲۸ تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ولی بین این دو زمان با روز هفت تفاوت‌ها معنی‌دار بود. در تیمار با ۲۰ سی‌سی عصاره و تیمار با ۳۰ سی‌سی عصاره نیز تفاوت معنی‌دار بین سه زمان مشاهده شد.

جدول ۲. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر میانگین حداقل مربعات هموسیت (شمار در میلی‌لیتر)

Table 2. Effect of treatments on Least-squares total haemocyte counts (number/ml)

Time	Sugar syup control	Sugar syrup with 10 cc extract	Sugar syrup with 20 cc extract	Sugar syrup with 30 cc extract
Short term immune				
10 h	560 Bb	517 Cc	613 Ca	583 Cab
20 h	600 Ad	638 Ac	757 Ba	680 Bb
30 h	597 Ac	583 Bc	876 Aa	765 Ab
Total	585 c	613 c	748 a	676 d
Long term immune				
7 d	535 Aa	290 Bc	405 Cb	559 Ba
14 d	450 Ab	483 Ab	451 Bb	516 Ca
28 d	316 Bd	483 Ac	550 Ab	619 Aa
Total	456.33 b	418.88 d	469 c	542.77 a

a-b: حرف‌های نا همسان در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ تیمارها در هر زمان و کل به‌صورت مستقل است.

A-B: حرف‌های نا همسان در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ تیمارها به‌طور مستقل تنها در دوره‌های مختلف است.

a-b: Different letters in each row indicate a significant difference at the error level of 0.05 of treatments at any time and as a whole independently.
A-B: Different letters in each column indicate a significant difference at the error level of 0.05 of treatments independently in different periods.

افزایش میزان عصاره در شربت شکر باعث افزایش آنزیم فنل اکسیداز و شمار هموسیت‌ها می‌شود زیرا ترکیب‌های موجود در سرخارگل از جمله آلکامیدها و مشتقات کافئیک اسید باعث افزایش یاخته‌های خونی که در فاگوسیتوز نقش دارند می‌شود، همچنین افزایش پلی ساکاریدها و اسید شیکوریک موجود در این گیاه سبب فعال شدن سرین پروتئاز و افزایش فعالیت فنل اکسیداز می‌شود.

ازآنجایی‌که منبعی راجع به عصارهٔ مورد بررسی در زنبورعسل یافت نشد از موارد همسان استفاده شده است.

در یک بررسی میزان فنل اکسیداز را در زنبورعسل کارگر اندازه‌گیری کردند، آنان از فعال‌کننده‌هایی از جمله LPS، لامینارین و α-کیموتریپسین برای فعالیت فنل اکسیداز به‌طور مصنوعی استفاده کردند، و به این نتیجه رسیدند این فعال‌کننده‌ها باعث افزایش آنزیم فنل اکسیداز می‌شود که با نتایج به‌دست‌آمده همخوانی دارد (Laughton *et al*., 2010).

در بررسی دیگری میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز و شمار هموسیت‌ها را در زنبوران مخملی پس از چالش با LPS (دیوارهٔ یاخته‌ای مشتق‌شده از باکتری اشریشیاکلی) و لامینارین (β-۱ و ۳ گلوکان موجود روی سطح قارچ و جلبک) بررسی کردند، ایمنی کوتاه‌مدت ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق و ایمنی بلندمدت ۷، ۱۴ و ۲۸ روز پس از تزریق اندازه‌گیری شد، در ایمنی کوتاه‌مدت بالاترین میزان فنل اکسیداز مربوط به ۸ تا ۲۴ ساعت پس از تزریق LPS و در ایمنی بلندمدت هفت روز پس از تزریق بوده است، در ایمنی کوتاه‌مدت شمار هموسیت‌ها دو ساعت پس از تزریق لامینارین و چهار ساعت پس از تزریق LPS افزایش ولی در ۴۸ ساعت پس از تزریق این دو ماده شمار هموسیت‌ها روند کاهشی دارد. در ایمنی بلندمدت نیز دو هفته پس از تزریق این دو ماده شمار هموسیت‌ها کاهش یافته است (Korner *et al*., 2004).

Alaux *et al*. (2010) رژیم غذایی تک‌گلی و چند گلی و تأثیر این رژیم برای مقاومت در برابر بیماری‌ها را با اندازه‌گیری فراسنجه‌های ایمنی از جمله آنزیم فنل اکسیداز، شمار هموسیت‌ها و محتوای چربی بدن بررسی کردند این بررسی ارتباط بین تغذیهٔ پروتئینی و ایمنی زنبورعسل و عامل‌های مؤثر روی بهداشت کلنی را نشان می‌دهد، نتایج نشان داد تیمارهایی که از رژیم چندگیاهی استفاده کردند فعالیت فنل اکسیداز و چربی بدن در آن‌ها بیشتر بوده است، ولی شمار هموسیت‌ها در تیمارهایی که از رژیم غذایی تک‌گیاهی استفاده کردند بیشتر از آن‌هایی است که رژیم غذایی چندگیاهی را استفاده کردند.

Williams *et al*. (2008)، تأثیر عصارهٔ سرخارگل را (۱۰۰۰ میلی‌گرم در تغذیه) در هشت اسب

به‌مدت ۴۲ روز بررسی کردند، یافته‌های به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که در اسب‌های تحت درمان با این عصاره افزایش لنفوسیت‌ها در ۳۵ روز پس از مصرف افزایش یافت، همچنین شمار گلبول‌های قرمز و هموگلوبین نیز به‌طور شایان‌توجهی افزایش یافت، اما در شمار نوتروفیل‌ها افزایش چندانی مشاهده نشد.

Currier *et al.* (2001) تأثیر عصارۀ سرخارگل را در رژیم غذایی موش مبتلا به سرطان خون بررسی کردند. موش‌ها به مدت پنجاه روز از عصاره تغذیه شدند و پس از این زمان نمونه‌برداری از آن‌ها انجام شد، نتایج نشان داد که این ماده باعث افزایش گلبول‌های سفید، قرمز و افزایش ملاتونین در خون شده است و به‌طور شایان‌توجهی در کاهش این بیماری تأثیر دارد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش با اضافه کردن عصارۀ سرخارگل به شربت شکر میزان فنل اکسیداز و شمار هموسیت‌ها افزایش می‌یابد و سطح ۳۰ سی‌سی سطح مطلوب‌تری برای تقویت سمانۀ ایمنی است و در واقع این عصاره تأثیر مثبت روی عامل‌های ایمنی دارد در نتیجه پیشنهاد می‌شود زنبورداران عصاره‌های گیاهی مناسب را در اختیار کلنی قرار دهند تا با تقویت سمانۀ ایمنی در بهبود سلامتی و بهداشت کلنی‌ها مؤثر واقع شود.

REFERENCES

1. Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. & Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 5(6), 562-566.
2. Calderone, N. W. (1999). Use of essential oils for the control of Varroa jacobsoni Oud. in honey bee colonies.
3. Cornman, R. S., Tarpy, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D. & Pettis, J. S. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PloS One*, 4(7), 555-562.
4. Currier, N.L. & Miller, S.C. (2001). Echinacea purpurea and melatonin augment natural-killer cells in leukemic mice and prolong life span. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 5(7), 241-51.
5. Evans, J., Aronstein, K., Chen, Y., Hetru, C., Imler, J. L. & Jiang, H. (2006).Immune pathways and defence mechanisms in honey bees Apis mellifera. *Insect Molecular Biology*, 9(15), 645-56.
6. Ghaemi, A., FarshbafMoghadam, M. & Yazdani, N. (2007). Evaluation of antiviral activity of aerial part of Echinacea purpurea extract against herpes simplex virus type 1. 9(4), 59-64. (in Farsi)
7. Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V. & Dively, G. (2013). Miscellaneous standard methods for Apis mellifera research. *Journal of Apicultural Research*, 7(4), 52-58
8. Ismail, AE-HM., Ghoniemy, H. A. & Owayss, A. A. (2006). Combatting honeybee Varroa mites by plant oils alone or in an IPM program. In: Proceeding of *the 2nd conference of farm integrated pest management*, (2), 221-227.
9. Korner, P. & Schmid-Hempel, P. (2004). In vivo dynamics of an immune response in the bumble bee. Bombus terrestris *Journal of Invertebrate Pathology*, 17(87), 59-66.
10. Laughton, A. M. & Siva-Jothy, M. T. (2010). A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, Apis mellifera. *Apidologie*, 4(1), 65-81.
11. Omidbeigi, R. (2005). *Processing of medicinal herbs*. Astan ghods razavi, 1191. (in Farsi)
12. Pohorecka, K. (2004). Effect of standardized plant herb extracts on general condition of the honey bee. *Bull Vet Inst Pulawy*, (48), 415-9.
13. Poncea-Andronescu, B. & Curcă, D. (2009). American Foulbrood in honey bees. *Revista Română de Medicină Veterinară*, 19(3), 31-47.
14. Williams, C. A. & Lamprecht, E. D. (2008). Some commonly fed herbs and other functional foods in equine nutrition: a review. *The Veterinary Journal*, (178), 21-31.
15. Zakaria, M. & Allam, S. F. (2007). Effect of some aromatic oils and chemical acaricides on the mechanical defense behavior of honey bees against Varroa invasion and relationship with sensation responses. Journal of *Applied Sciences Research*, 9(3), 653-658.