

ارزیابی رفتارهای بهداشتی زنبورعسل و ارتباط آن با میزان آلودگی کلنی‌ها به کنه واروآ *Varroa destructor* در زنبورعسل نژاد ایرانی *Apis mellifera meda*

غلامحسین طهماسبی^{۱*}، سید بانو حسینی^۲، مرادپاشا اسکندری نسب^۳

۱- نویسنده مسوول: استاد پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی
(hosein_tahmasbi@hotmail.com)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه زنجان

۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه زنجان

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۱

چکیده

رفتار بهداشتی عبارت است از یک نوع دفاع طبیعی زنبورهای عسل در برابر بیماری‌ها و آفات نظیر لوک آمریکایی، لارو گچی و کنه واروآ و این موضوع تحت کنترل غرایز ژنتیکی و عوامل محیطی است که شامل سه مرحله شناسایی، درپوش برداری و تخلیه نوزادان آلوده یا مرده از سلول‌ها و خروج از کندوها می‌باشد. در این تحقیق رفتارهای بهداشتی و میزان آلودگی کلنی‌های زنبورعسل نژاد ایرانی *Apis mellifera meda skonikov* به کنه واروآ *Varroa destructor* مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده کلنی‌های مورد آزمون، تنوع فنوتیپی قابل توجهی را از نظر رفتارهای بهداشتی نشان دادند. در مرحله اول (بهار) ۲۱ درصد از کلنی‌ها و در مرحله دوم (تابستان) ۱۸ درصد از کلنی‌ها رفتار بهداشتی مطلوب بروز دادند. رفتارهای بهداشتی در سه روز متوالی همبستگی بالایی با یکدیگر نشان دادند ($P < 0.01$). نرخ درپوش برداری در هر روز همبستگی قابل ملاحظه‌ای با نرخ تخلیه در همان روز داشت ($P < 0.01$). جمعیت کنه واروآ در کلنی‌های زنبورعسل نژاد ایرانی در سه مرحله بهار، تابستان و پاییز مورد ارزیابی قرار گرفت. در فصل پاییز آلودگی به کنه واروآ در ۲۱ درصد از کلنی‌ها مشاهده شد و درجه رفتار بهداشتی در کلنی‌ها در سطح پایینی توصیف گردید. درجه رفتار بهداشتی تخلیه با میزان آلودگی به کنه همبستگی معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در واقع نتایج این تحقیق نشان داد که در کلنی‌های بهداشتی آلودگی به کنه واروآ به طور معنی‌داری کمتر از کلنی‌های غیر بهداشتی بود. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که سهم رفتارهای بهداشتی در کنترل جمعیت کنه واروآ ۲۶ درصد است. کلنی‌های مقاوم و پایدار در پایان سال برای ادامه طرح اصلاح نژاد زنبورعسل انتخاب شدند. با توجه به همبستگی رفتار بهداشتی با صفات عملکردی، به نظر می‌رسد در راستای سیاست‌های اصلاح نژادی، انتخاب کلنی‌های بهداشتی در جهت مقاومت زنبور عسل به کنه واروآ نتایج رضایت‌بخشی را در آینده به همراه داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: رفتار بهداشتی، زنبورعسل، کنه واروآ، ایران

مقدمه

امروزه از مهم‌ترین دلایل پرورش زنبورعسل در سطح دنیا توانایی شکرک‌افشانی و افزایش محصولات کشاورزی است. از نظر اقتصادی ارزش گرده‌افشانی محصولات به وسیله زنبورعسل ۱۰۰ برابر بیشتر از ارزش تولید عسل آنها است. با این حال، گرده‌افشانی و تولید عسل بطور نامطلوبی به وسیله عوامل بیماری‌زا و انگل‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرند (Tu et al., 2010). چالش عمده زنبورداری امروز بیماری‌ها و آفات زنبورعسل و از آن جمله کنه واروآ و یافتن راه‌حلهایی برای مقاومت به این انگل است (Coby, 2009). کنه واروآ پارازیت نوزادان و بالغین زنبورها عسل است. کنه‌های فورتیک روی زنبورهای بالغ، کلنی‌های جدید را ضمن اتصال به زنبورها غارتگر و گم شده آلوده می‌کنند و از همولنف زنبورها بالغ و نوزاد تغذیه می‌کنند. زنبورهایی که در طول دگردیسی خود به چندین کنه آلوده شده‌اند، نهایتاً دارای بدن‌هایی چرب فاسد شده، غدد هیپوفارینژال توسعه نیافته و طول عمر کوتاه خواهند داشت. همچنین عفونت‌های ثانویه (ویروس و باکتری) و گاز گرفتن، علت اصلی مرگ و میر زنبورها در کلنی‌های با آلودگی شدید است (Boecking and Spivak, 1999). کنه واروآ ظرفیت ایمنی بدن زنبورها را کاهش داده، باعث گسترش ویروس‌هایی نظیر ویروس تغییر شکل بال^۱ (DWV) در زنبورها می‌شود. فزونی جمعیت کنه واروآ در کندوها ممکن است باعث آسیب سلولی در زنبورها شود (Yang et al., 2005). علامت بارز زنبورهای آلوده به کنه واروآ بد شکل شدن آنها است و اغلب دارای جثه کوچک با بال‌ها و پاهای ناقص و تغییر شکل یافته می‌شوند (Navajas et al., 2008).

افزایش هزینه‌های درمان شیمیایی، افزایش مقاومت کنه به این داروها به علت استفاده طولانی‌مدت، همراه با تلفات بسیار زنبورها، اثرات سوء باقیمانده سموم و داروهای مصرفی بر فرآورده‌های زنبور از جمله عسل و بسیاری مشکلات دیگر لازمه پژوهش بیشتر در زمینه ساز و کارهای مقاومت زنبورها به این انگل و لزوم استفاده از نژادها یا لاین‌های برتر با قابلیت رفتار دفاعی ارثی در برابر این آفت است (Spivak and Reuter, 2001). در میان ساز و کارهای دفاعی زنبورعسل در برابر کنه واروآ، رفتار بهداشتی^۲ به دلیل داشتن پایه ژنتیکی از اهمیت و جایگاه فوق‌العاده‌ای برخوردار است. این رفتار به وسیله زنبورهای کارگر کلنی جهت دفاع در برابر انواع بیماری‌ها نظیر باکتری، قارچ و کنه واروآ انجام می‌گیرد. رفتار بهداشتی شامل تشخیص نوزادان مرده، آلوده و یا غیر طبیعی درون سلول نوزاد و به دنبال آن درپوش برداری^۳ و تخلیه محتویات سلول آلوده^۴ است. کلنی‌هایی که بیش از ۹۵ درصد نوزاد مرده، آلوده یا غیر طبیعی را در کمتر از ۴۸ ساعت از کندو حذف نمایند کلنی‌های بسیار بهداشتی محسوب می‌شوند (Perez-Sato et al., 2009).

تحقیقات نشان می‌دهد که رفتار بهداشتی تحت کنترل عوامل ژنتیکی است. Park (1936) توانست زنبورها عسلی را انتخاب کند که به بیماری لوک آمریکایی مقاوم‌تر بود و گزارش کرد که این صفت تا حدی با سطوح بالاتر رفتارهای بهداشتی همراه بود. دو دهه بعد و پس از انجام مطالعاتی که توسط Rothenbuhler (1964a) انجام گرفت ماهیت ژنتیکی رفتار بهداشتی نشان داده شد. Rothenbuhler (1964b) نشان داد که این رفتار به وسیله آلل‌های مغلوب در دو ژن تحت تاثیر قرار می‌گیرد. وی مدل دو جایگاهی مندلی را برای بروز آن پیشنهاد کرد که

² Hygienic behavior

³ Uncapping

⁴ Removing.

¹ Deformed wing virus

جمعیت‌های طبیعی را شامل می‌شوند (Waite et al., 2003). این نسبت می‌تواند از طریق انتخاب مصنوعی افزایش یابد. این عمل به وسیله غربالگری تعداد زیادی از کلنی‌هایی که بیشترین رفتار بهداشتی را دارند (بهداشتی - ترین کلنی‌ها)، آغاز می‌شود و از آن‌ها ملکه‌ها و نرها پرورش داده می‌شوند. سپس یک لاین بهداشتی از کلنی‌ها پس از حداقل چهار نسل به وسیله جفت‌گیری نرها و ملکه‌های دختر از بهداشتی‌ترین کلنی‌ها با استفاده از تلقیح مصنوعی یا جفت‌گیری طبیعی به دست می‌آید. لاین‌های اصلاح شده بهداشتی به درمان کمتری نسبت به لاین‌های غیر بهداشتی نیاز دارند. هر گونه کاهش در استفاده از سموم و داروهای شیمیایی در داخل کلنی‌ها منجر به کاهش خطر آلودگی در عسل و فرآورده‌های کندو و کاهش هزینه‌های عملیاتی برای زنبورداری تجاری می‌شود (Spivak and Reuter, 2001).

جمعیت فعلی کنه واروآ در دنیا بیانگر مقاومت این کنه در برابر کنه‌کش‌های متداول مانند فلووالینات^۲، فلومتترین^۳، کومافوس^۴، برومو پروپیلات^۵، آمیتراز^۶ و کلوردیمفورم^۷ می‌باشد. در مورد کنه واروآ استفاده از دز کنه‌کش بالا باعث می‌شود جمعیت کنه خالص‌تر شده و میزان بالانتری از هموزیگوتی را نشان دهد. بنابراین دز کنه‌کش بالا برای کنترل کنه واروآ مناسب نیست. خودداری از استفاده بیش از حد کنه‌کش‌ها از توسعه و رشد کنه‌های مقاوم جلوگیری می‌کند. راه حل دراز مدت برای کاهش جمعیت کنه یا کاهش اثر عوامل بیماری‌زای ثانویه همراه با عفونت کنه، توسعه مقاومت ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل به این انگل بوده و پژوهش بیشتر در این زمینه

یک جایگاه منجر به درپوش برداری (u) و جایگاه دیگر منجر به تخلیه حجره حاوی لارو مرده (r) می‌شود (Rothenbuhler, 1964a; Wilkes and Oldroyd, 2002). Moritz (1988) یک مدل سه جایگاهی (r₂, r₁, u) را برای رفتار بهداشتی پیشنهاد نمود. یک جایگاه منجر به درپوش برداری (u) و دو جایگاه دیگر منجر به تخلیه حجره (r₁, r₂) می‌شود (Park, 1936). Keryn et al. (2002) از طریق ژنتیک مولکولی و نقشه لینکاژ جایگاه صفات کمی^۱ (QTL)، ۷ جایگاه صفت کمی را برای رفتار بهداشتی پیشنهاد کردند که هر یک تنها ۹ تا ۱۵ درصد واریانس فوتوتپی مشاهده شده در جمعیت را کنترل می‌کنند.

بنا بر گزارش Navajas et al. (2008) کنه واروآ باعث تغییراتی در بیان ژن مرتبط با رشد جنینی، متابولیسم سلول و ایمنی شد. تحمل زنبورها به واروآ به طور عمده به وسیله تفاوت‌هایی در بیان ژن‌های تنظیم‌کننده رشد عصبی، حساسیت عصبی و بویایی مشخص می‌شود. Arathi and Spivak (2001) نشان دادند که عملکرد رفتار بهداشتی به نسبت زنبورهای بهداشتی در کلنی بستگی دارد و ترکیب ژنوتیپی کلنی بر عملکرد و جزءبندی رفتار بهداشتی موثر است.

شواهد اخیر از ژنوم زنبورعسل نشان داده است که تنوع ژنتیکی زمینه‌ای برای توانایی زنبورهای عسل به افزایش پاسخ ایمنی است که احتمالاً این تنوع در حشرات با زندگی انفرادی کمتر است. فرضیه‌های زیادی برای توضیح مزایای چند شوهری در سیستم جفت‌گیری ملکه‌های زنبورها عسل از جمله کاهش حساسیت به بیماری از طریق افزایش تنوع ژنتیکی در جمعیت کلنی و بهبود کار در آن مورد توجه قرار گرفته است (Wilson-Rich, et al., 2009). کلنی‌های بسیار بهداشتی بطور معمول تنها حدود ۱۰ تا ۱۲ درصد

² Fluvalinate

³ Flumethrin

⁴ Coumaphos

⁵ Bromopropylate

⁶ Amitraz

⁷ Chlordimeform

¹ Quantitative trait loci

خطی تاثیر رفتار بهداشتی بر میزان آلودگی بررسی شد و معادله خط رگرسیون برای این رابطه برازش گردید.

ارزیابی جمعیت کنه در زنبورهای بالغ و نوزادان

نمونه گیری به طور تصادفی ۳ نوبت در سال (بهار، تابستان و پاییز) انجام گرفت. در هر نوبت ۱۵۰ تا ۲۰۰ زنبور از قاب‌های کناری هر کندو جمع آوری و داخل بطری حاوی آب و مایع ظرف شویی برای تعیین درصد آلودگی کنه روی زنبورهای بالغ قرار گرفت. برای تعیین میزان آلودگی کنه در نوزادان یک نمونه شامل ۱۰۰ حجره نوزاد کارگر و ۵۰ حجره نوزاد نر درپوش برداری شدند و تعداد کنه موجود روی نوزادان و داخل حجره شمارش شد.

ارزیابی صفات رفتارهای بهداشتی (درپوش- برداری و تخلیه شفیره مرده)

در این تحقیق به منظور بررسی صفات درپوش برداری و تخلیه نوزاد مرده از ازاوت مایع جهت کشتن شفیره ها استفاده شد. برای اینکه در زمان دادن ازت تمام کلنی‌های مورد نظر، شفیره های هم سن داشته باشند قبل از انجام آزمایش ابتدا تک تک کلنی‌ها بازدید شدند، و هم زمان به هر کدام از کلنی‌ها یک شان بافته شده و یا پوکه کد گذاری شده داده شد. برای تحریک ملکه‌ها به تخم ریزی نیز هم زمان همه کلنی‌ها به مدت ۳ روز با شربت شکر تغذیه مصنوعی شدند. طی مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از دادن پوکه مجدداً کلنی‌ها بازدید و زمان تخم ریزی ملکه‌ها ثبت شد. منطقه تخم ریزی ملکه در هر کلنی در شان‌های مورد آزمایش علامت گذاری شد. سپس در فاصله ۱۴ روز بعد از تخم ریزی ملکه‌ها، یعنی در سن ۵ روزگی شفیره‌ها، آزمایش ازت انجام شد. یک روز قبل از دادن ازت برای اطمینان از وجود شفیره‌ها تمام کلنی‌ها بازدید شدند.

در انجام بررسی فوق از دو استوانه تو خالی از جنس کالوانیزه به قطر ۶ سانتی متر و ارتفاع ۱۵ سانتی متر استفاده

مورد نیاز است (Tu et al., 2010). در این تحقیق تلاش شد ضمن مطالعه رفتار بهداشتی کلنی‌ها، همبستگی آن با آلودگی کلنی‌ها به کنه واروآ مورد بررسی قرار گیرد تا نتایج حاصل، مسیر تحقیقات آتی در مورد مقاومت کلنی‌های زنبورعسل به کنه واروآ را هموارتر سازد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از شهریور ۱۳۹۲ تا مهر ۱۳۹۳ به مدت یکسال در زنبورستان پشتیبان طرح جامع اصلاح نژاد استان- های مرکزی در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام گرفت. ارزیابی صفات رفتارهای بهداشتی و درصد آلودگی کنه واروآ طی دو مرحله روی ۱۰۰ کلنی از کلنی‌های پشتیبان نسل دوازدهم انجام گرفت. کلنی‌ها ابتدا از نظر جمعیت یکسان‌سازی شده (۶ تا ۷ قاب جمعیت بالغین) و در طول سال ۱۳۹۲ تا پایان آزمایش هیچ نوع دارویی برای کنترل کنه واروآ دریافت نکردند. کلنی‌های مقاوم و پایدار در پایان سال برای ادامه طرح اصلاح نژاد زنبورعسل انتخاب شدند.

برای ارزیابی رفتار بهداشتی، حجره‌های درپوش برداری شده و تخلیه شده طی سه روز متوالی شمارش و ثبت شدند. ولی با توجه به تعریف، ملاک رفتار بهداشتی مطلوب، انجام عمل تخلیه بیش از ۹۵ درصد در مدت ۴۸ ساعت بود که در این طرح نیز کلنی‌های بهداشتی با همین ملاک انتخاب شدند.

در تحقیق حاضر ارزیابی جمعیت کنه در کلنی‌ها طی ۳ مرحله در بهار، تابستان و پاییز انجام گرفت. کلنی‌ها از نظر قدرت رفتار بهداشتی به ۴ گروه تقسیم شدند. این ۴ گروه از نظر میزان آلودگی به کنه واروآ با روش تجزیه واریانس یک طرفه تحلیل و میانگین‌هایی آنها با روش دانکن مقایسه شدند. همچنین با روش همبستگی و رگرسیون

نتایج و بحث

صفات رفتارهای بهداشتی طی دو مرحله در بهار و تابستان مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه داده های جمع-آوری شده در هر دو مرحله تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است. از مجموع ۱۰۰ کلنی ارزیابی شده، در مرحله اول ۲۱ درصد و در مرحله دوم ۱۸ درصد کلنی ها رفتار بهداشتی مطلوب بروز دادند. نتایج تجزیه و تحلیل داده های جمع آوری شده نشان داد که بین رفتارهای بهداشتی در سه روز متوالی همبستگی مثبت بالایی وجود داشت ($P < 0.01$). نرخ درپوش برداری در هر روز همبستگی قابل ملاحظه ای با نرخ تخلیه در همان روز داشت ($P < 0.01$).

در این تحقیق در مرحله اول آزمایش (فصل بهار) درمقایسه با مرحله دوم (فصل تابستان) رفتارهای بهداشتی بیشتری در کلنی ها بروز یافت، اما این تفاوت معنی دار نبود ($P = 0.345$). خصوصیات رفتاری زنبورهای بهداشتی به وسیله عوامل مختلفی از جمله ژنتیک، سیستم های عصبی، اجتماعی و شرایط محیطی تحت تاثیر قرار می گیرد (Gramacho and Gonçalves, 2009) که این عوامل می توانند در تفاوت کلنی ها در دو مرحله موثر باشند. بنابر گزارش Boecking and Spivak (1999) زنبورهای عسل قادر به تشخیص حتی تک حجره حاوی شفیره یا لارو مرده، بیمار یا غیر طبیعی درون حجره نوزاد می باشند.

در تحقیق حاضر تنوع زیادی در رفتارهای بهداشتی زنبورها عسل دیده شد. به طوری که بعضی کلنی ها رفتار بهداشتی را با ایجاد سوراخ ریزی بر روی درپوش حجره نوزاد شفیره آغاز کردند. همچنین برخی کلنی ها شفیره ها را به جای تخلیه کامل به صورت جزء به جزء حذف می کردند که نشانه ای از همخواری است.

شد. برای هر کلنی حدود ۳۰۰ میلی لیتر ازت مایع جهت کشتن حدود ۱۶۰ حجره نوزاد (تعداد حجره های قرار گرفته داخل استوانه) مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که بر روی شفیره ی از قبل انتخاب شده بر روی شان به وسیله استوانه، یک دایره به قطر ۶ سانتی متر ایجاد کرده و استوانه را به آرامی چرخانیده تا به سیم وسط داخل شان رسید. به طوریکه استوانه کاملا داخل شان قرار گرفت. سپس تعداد حجره های خالی داخل استوانه شمارش و ثبت گردید و مقدار مورد نظر ازت مایع را داخل استوانه ریخته و منتظر ماندیم تا ازت کاملا تبخیر و حجره های شفیره کشته شوند. سپس شان های شفیره به کلنی مورد نظر برگشت داده شد. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از ریختن ازت مایع از طریق بازدید کلنی ها تعداد حجره های شفیره ی مرده ای که درپوش برداری و تخلیه شدند به طور مجزا شمارش و ثبت شد. کلنی هایی که ظرف ۴۸ ساعت پس از ریختن ازت مایع بیش از ۹۵ درصد شفیره های مرده را درپوش برداری و تخلیه نمودند، به عنوان کلنی های بهداشتی در نظر گرفته شدند. رفتار بهداشتی کل زنبور عسل با فرمول زیر محاسبه شد:

$$THB = \frac{X - Y - Z}{X} \times 100 \text{ (Palacio et al., 2005)}$$

^۱ THB: رفتار بهداشتی کل (درصد تخلیه نوزادان)

X: تعداد حجره های در بسته نوزاد مورد آزمایش (شامل

۱۶۰ حجره در پوشیده نوزاد) که کشته شدند.

Y: تعداد حجره های نوزاد مرده درپوش برداری نشده بعد از ۲۴ ساعت

Z: تعداد حجره های درپوش برداری شده بدون تخلیه بعد از ۲۴ ساعت

¹ Total Hygienic Behavior

جدول ۱- آمار توصیفی صفات رفتارهای بهداشتی کلنی‌های زنبورعسل ایرانی *Apis mellifera meda*Table 1. Descriptive statistics of hygienic behaviors in Iranian honey bee *Apis mellifera meda*

Parameter Variable	Standard deviation		Maximum		Minimum	
	Summer	Spring	Summer	Spring	Summer	Spring
Percentage of uncapping after 24 hours	83.98±14.86	86.96±14.13	100	100	40.77	50
Percentage of uncapping after 48 hours	95.66±6.68	96.03±8.83	100	100	80	50.97
Percentage of uncapping after 72 hours	99.19±2.39	98.22±8.45	100	100	87.93	50.97
Percentage of removing after 24 hours	72.31±19.27	74.58±19.06	100	98.47	25.33	26
Percentage of removing after 48 hours	80.08±15.46	82.1±17.59	100	99.31	43.33	41.54
Percentage of removing after 72 hours	95.6±8.22	87.34±15.04	100	100	56	44.74

واروآ و لوک آمریکایی شده‌اند (Ibrahim et al., 2007). در ایران در راستای مقاومت به آفات و بیماری‌های مهم زنبورعسل در بعضی مناطق و به شکل محدود انتخاب انجام گرفته است (Najafgholian et al., 2011 a). Spivak and Reuter (1998) میانگین کل رفتارهای بهداشتی را در یک گروه از کلنی‌های اصلاح شده استارلاین و یک گروه از کلنی‌های معمولی ایتالیایی بعد از ۳ بار نمونه‌گیری به ترتیب ۸۳ و ۵۹ درصد برآورد نمودند و میزان رفتارهای بهداشتی درپوش برداری و تخلیه شفیره‌ها در حد مطلوب در ۲۶ درصد از کلنی‌ها مشاهده شد. بنا بر گزارش Spivak and Gray (1998) لاین غیر بهداشتی و بهداشتی به ترتیب ۵۰ و ۹۵ درصد از شفیره‌های کشته شده به روش انجماد را ۴۸ ساعت پس از معرفی به کندو تخلیه نمودند. Oldroyd and Oxley (2008) با استفاده از

بنابر گزارش Gramacho and Spivak (2003) شروع رفتارهای بهداشتی به حساسیت بویایی زنبور و شدت محرک از نوزاد غیر طبیعی بستگی دارد. بنا بر گزارش Gramacho and Gonçalves (2009) شایع‌ترین توالی از مراحل رفتار بهداشتی به وسیله سوراخ کردن حجره در پوشیده نوزاد و ایجاد سوراخ‌های کوچک روی آن‌ها آغاز می‌شود و به دنبال آن درپوش برداری و حذف حجره نوزاد انجام می‌گیرد.

در بررسی‌های انجام شده روی رفتارهای بهداشتی کلنی‌های زنبورعسل در کشورهای مختلف دنیا نتایج متفاوتی به دست آمده است. در برخی کشورها مانند ایالات متحده آمریکا برنامه‌های اصلاح نژادی جهت ایجاد لاین‌های مقاوم به کنه واروآ با پیشرفت‌های زیادی همراه بوده است و موفق به ایجاد لاین‌های مقاوم در برابر کنه

رفتارهای بهداشتی بر جمعیت کنه کلنی‌ها در جدول ۲ و تجزیه واریانس رگرسیون در جدول ۳ خلاصه شده است. در مرحله اول و دوم هیچ سطح آلودگی در بالغین و نوزادان مشاهده نشد. اما در فصل پاییز در بالغین، آلودگی در سطح ۳/۳۳ درصد دیده شد، اما سطح آلودگی در نوزادان صفر بود. نکته جالب توجه این بود که در ۲۱ درصد از کلنی‌ها آلودگی کنه واروآ رویت شد که همگی از کلنی‌هایی با رفتار بهداشتی پایین بودند. در واقع نتایج این تحقیق نشان داد که در کلنی‌های که بهداشتی آلودگی به کنه واروآ به طور معنی‌داری کمتر از کلنی‌های غیر بهداشتی بود.

روش ازت مایع، رفتارهای بهداشتی را در زنبورها کارنیولان استرالیایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که ۲۰ درصد از کلنی‌های استرالیایی بهداشتی بودند. براساس تحقیق Najafgholian et al. (2011a) که روی رفتار بهداشتی زنبورها عسل ایرانی انجام گرفت، ۳۵ درصد از زنبورها عسل ایرانی بهداشتی بوده و با استفاده از تکنیک ازت مایع بیش از ۹۵ درصد شفیره‌های مرده را ظرف ۴۸ ساعت تخلیه نمودند. نتایج آزمون دانکن نشان داد که میزان آلودگی در گروه با رفتار تخلیه‌ای زنبورها کمتر از ۴۰ درصد به طور معنی‌داری از سه گروه دیگر بالاتر بود. بررسی تاثیر سطوح

جدول ۲- تاثیر رفتارهای بهداشتی بر میزان جمعیت کنه *Varroa destructor* در کلنی‌های زنبور عسل نژاد ایرانی *Apis mellifera meda*

Table 2. Effects of hygienic behaviors on *Varroa destructor* mite populations in Iranian honey bee *Apis mellifera meda*

Group	Percentage of Removing	Replication (Colony)	Infestation rate
G1	<40%	5	3.12±0.09a
G2	40-59%	6	0.73±0.04b
G3	60-79%	6	0.83±0.03b
G4	≥ 80%	6	0±0

جدول ۳- تحلیل رگرسیون رفتار بهداشتی (درپوش برداری و تخلیه شفیره مرده) با استفاده از آزمون F در کلنی‌های زنبور عسل

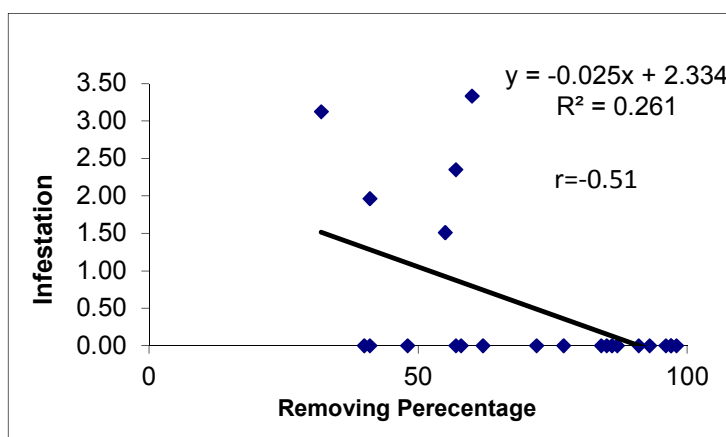
Table 3. Regression describing of hygienic behavior using F- test in honeybee colonies

Sources of Variations	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F
Regression	1	6.776693	6.776693	7.433291*
Regression Deviation	21	19.14503	0.911668	
Total	22	25.92172		

* Significant at 5% level

بهداشتی بوده است. در واقع نقش رفتارهای بهداشتی در کنترل جمعیت کنه واروآ ۲۶ درصد بوده است. بقیه واریانس موجود ممکن است تحت تاثیر سایر ساز و کارهای دفاعی زنبور عسل در برابر کنه واروآ و یا عوامل دیگر باشد. که با بررسی و تحقیق بیشتر روی سایر ساز و کارهای دفاعی زنبور عسل در برابر کنه واروآ، سهم هر یک در کنترل جمعیت کنه روشن خواهد شد. تصویر ۱ تابعیت میزان آلودگی از رفتار تخلیه را نشان می دهد.

بین میزان آلودگی به کنه واروآ و درصد تخلیه، آزمون‌های همبستگی و رگرسیون انجام شد. طبق نتایج جدول ۳ آزمون در سطح کمتر از ۵ درصد معنی دار شد ($p=0.012$). نتایج این تحقیق نشان داد که همبستگی معنی داری بین میزان آلودگی و رفتار بهداشتی درصد تخلیه وجود داشت ($P<0.05$). بر اساس نتایج حاصل از تجربه و تحلیل اطلاعات بدست آمده میزان ضریب تبیین رگرسیون، ۲۶ درصد بود، که نشان می‌دهد ۲۶ درصد از کاهش آلودگی در کلنی‌های زنبور عسل به علت رفتارهای



شکل ۱- تابعیت میزان آلودگی از رفتار بهداشتی تخلیه شفیره‌های آلوده زنبور عسل ایرانی *Apis mellifera meda*
Figure 1. Dependence of infestation rates of hygienic behavior of removing infested pupae in Iranian honey bee *Apis mellifera meda*

مطالعات انجام شده در خصوص ساز و کارهای مقاومتی زنبور عسل به روشنی نشان می‌دهد که این ساز و کارها در تمامی نژادها و جمعیت‌ها یکسان نبوده و یک ساز و کار مقاومتی یکسان و مشابه در زنبورهای عسل به عنوان عامل اصلی مقاومت ژنتیکی در برابر کنه واروآ مطرح نباشد. به عبارت دیگر ممکن است در یک جمعیت، رفتار نظافت‌گری و رفتارهای بهداشتی یکی از دلایل اصلی مقاومت زنبورها در برابر کنه واروآ محسوب شود و در

بر اساس مطالعه‌ای که توسط Mondragon et al. (2005) با هدف بررسی رشد جمعیت کنه واروآ و برآورد سهم نسبی سه ساز و کار مقاومتی رفتار بهداشتی، رفتار نظافت‌گری و جلوگیری از تولید مثل کنه در زنبورها عسل معمولی در مکزیک انجام گرفت، رفتار جلوگیری از تولید مثل کنه با ۵۰/۶ درصد بیشترین نقش را در کنترل جمعیت کنه واروآ داشت. اما بین رفتار بهداشتی و تعداد کل جمعیت کنه همبستگی معنی‌داری جزئی دیده شد.

بالغین و نوزادان بودند و تولید عسل در این کلنی‌ها بیشتر بود. نتایج حاضر تا حدودی با نتایج محققین فوق مطابقت دارد.

نتایج بررسی‌های انجام شده در ایران در مقایسه با نتایج تحقیقات سایر محققین نشان می‌دهد که زنبورها عسل ایرانی رفتارهای بهداشتی بالاتری در مقابله با کنه واروآ و بیماری‌های زنبور نشان می‌دهند. لذا می‌توان چنین استنباط نمود که اکثر کلنی‌های ایرانی با وجود اینکه تا کنون هیچ کار اصلاح نژادی برای رفتار بهداشتی روی آنها صورت نگرفته است از نظر رفتارهای بهداشتی از نژادهای مهم زنبور عسل اروپایی برتر هستند. سرمایه‌گذاری برای افزایش مقاومت ژنتیکی توده‌های اصلاحی، تنها راه حل مناسب و جدی جهت رفع نگرانی در خصوص معطل جهانی کنه واروآ و باقیمانده داروهای ضد کنه در تولیدات کلنی‌های زنبور عسل است.

نتیجه‌گیری

با وجود اینکه تا کنون به طور مستقیم در مورد رفتار بهداشتی در زنبور عسل ایرانی انتخابی صورت نگرفته است، از نظر این رفتار، زنبورهای عسل نژاد ایرانی از نژادهای مهم زنبور عسل اروپایی برتر هستند. با توجه به مدل رگرسیونی رابطه رفتار بهداشتی و درصد آلودگی در زنبور عسل ایرانی نقش رفتارهای بهداشتی در کنترل جمعیت کنه واروآ ۲۶ درصد بود (تصویر ۱). از این رو بررسی و تحقیق بیشتر روی دیگر ساز و کارهای مقاومت زنبور در کنار رفتارهای بهداشتی به عنوان یکی از صفات نشانگر مقاومت به کنه واروآ برای تعیین استراتژی اصلاح نژادی به منظور ایجاد لاین‌های مقاوم و انتخاب کلنی‌های برتر از نظر این صفات ضرورت می‌یابد.

جمعیت‌های دیگر جلوگیری از تولید مثل کنه و یا میزان جذابیت کمتر لاروها، علل مقاومت زنبورها عسل در برابر کنه واروآ باشد.

بنابر نتایج تحقیق Harris et al. (2003) کاهش میزان تولید مثل کنه می‌تواند به علت کاهش میزان رشد در طول دوره‌های هوای گرم و خشک باشد و همچنین ممکن است بعضی تغییرات در عوامل محیطی داخلی و خارجی بر کلنی‌های زنبور عسل تاثیر داشته باشد. یکی از خصوصیات بارز زنبور عسل نژاد ایرانی کاهش پرورش نوزاد در اواخر تابستان است (Ebadi, 1988)، که در نتیجه آن، جمعیت بالغین نیز به طور قابل ملاحظه‌ای در پاییز کاهش می‌یابد. در اواسط تابستان با افزایش دما تولید مثل کنه واروآ کاهش و در اواخر تابستان با کاهش دما مجدداً افزایش می‌یابد. بنابراین کاهش در جمعیت زنبورها با پیشرفت سریع جمعیت کنه همراه است (Gramacho and Goncalves, 2009). در تحقیق حاضر میزان جمعیت کنه در سال تحقیق نسبت به سال‌های قبل بسیار پایین بود که عوامل زیادی می‌تواند در آن دخیل باشد. شاید افزایش بی سابقه دما در سال‌های اخیر در کاهش میزان رشد و نمو و تولید مثل کنه‌ها موثر بوده است.

بنابر گزارش Spivak and Gary (1998) کلنی‌های با ملکه بهداشتی نرخ تخلیه نوزاد منجمد بیشتری نسبت به ملکه‌های لاین‌های تجاری داشتند. همچنین بیماری لوک آمریکایی و نوزاد گچی کمتر و تولید عسل بیشتری نیز در این کلنی‌ها مشاهده شد. آن‌ها همچنین نشان دادند که لاین‌های بهداشتی دارای کنه واروآی کمتر بر روی بدن خود و عملکرد بهتر در طی یک سال آزمایش بدون مصرف دارو بودند. بنابر گزارش Ibrahim et al., (2007) کلنی‌های اصلاح شده برای رفتار بهداشتی در مقایسه با لاین‌های اصلاح نشده، دارای کنه کمتر بر روی

REFERENCES

- Arathi, H. S., and Spivak, M. 2001. Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behaviour in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Animal Behaviour*, 62: 57–66.
- Boecking, O., and Spivak, M. 1999. Behavioral defenses of honey bee against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apidologie*, 30: 141-158.
- Coby, S. 2009. The new world carniolan program. *Journal of the Beekeepers Quarterly*, 2: 1-6.
- Ebadi, R. 1988. Evaluation of five honey bee (*Apis mellifera* L.) races and hybrids in comparison with the native Iranian race in Isfahan region. *Iranian Journal of Agriculture*, 3(19): 11-22.
- Gramacho, K. P., and Gonçalves, L. S. 2009. Comparative study of the hygienic behavior of Carniolan and Africanized honey bees directed towards grouped versus isolated dead brood cells. *Journal of Genetics and Molecular Research*, 8 (2): 744-750.
- Gramacho, K. P., and Spivak, M. 2003. Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Journal of Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54: 472-479.
- Harris, J. W., Harbo, J. R. Villa J. D., and Danka R. G. 2003. Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in colonies of honeybees (Hymenoptera: Apidae) during 10 year period. *Environmental Entomology*, 32: 1305–1312.
- Ibrahim, A., Gary S., and Spivak, M. 2007. Field trail of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*. *Journal of Apidologie*, 38: 67-76.
- Keryn, L., Oldroyd, B. P., and Spivak, M. 2002. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Journal of Naturwissenschaften*, 89: 565–568.
- Mondragon, L., Spivak, M., and Andame, R. 2005. A multifactorial study of resistance of honey bees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Journal of EDP Sciences*, 36: 345-358.
- Moritz, R. F. A. 1988. Heritability of the postcapping stage in *Apis mellifera* and its relation to varroaosis resistance. *Journal of Heredity*, 76: 267-270.
- Najafgholian, J., Thahmasbi, G., Pakdel, A., and Nehzati, G. 2011. Effect of population size on the expression of hygienic behavior in the Iranian honey bee (*Apis Mellifera meda*). *Journal of Biotechnology Resources*, 2(4): 364-373.

Navajas, M., Migeon, A., Alaux, C., Martin-Magniette, M. L., Robinson, G. E., Evans, J. D., Cros-Arteil, S., Crauser, D., and Le Conte, Y. 2008. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *Journal of BMC Genomics*, 9: 301.

Oxley, P. R., Spivak, M. and Oldroyd, B. P., 2010. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 19(7): 1452-1461.

Park, O. W. 1936. Disease resistance and American foulbrood. *American Bee Journal*, 74: 12-14.

Palacio, M.A., Flores, J.M., Figini, E., Ruffinengo, S., Escande, A., Bedascarrasbure, E., Rodriguez, E., and Gonçalves, L.S., 2005. Evaluation of the time of uncapping and removing dead brood from cells by hygienic and non-hygienic honey bees. *Genetic and Molecular Research*, 4(1): 105-114.

Perez-Sato, J. A., Chaline, N., Martin, S. J., Hughes, W. H. O., and Ratnieks, F. L. W. 2009. Multi-level selection for hygienic behaviour in Honey bees *Heredity*. *Journal of Heredity*, 102: 609-615.

Rothenbuhler, W. C. 1964a. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Journal of Animal Behaviour*, 12: 578-583.

Rothenbuhler, W. C. 1964b. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Journal of American Zoologist*, 4: 111-123.

Spivak, M., and Gary, S. 1998. Performance of hygienic honey bee colonies in commercial apiary. *Journal of Apidologie*, 29: 291-302.

Spivak, M., and Reuter, G. S. 1998. Honey bee hygienic behaviour. *Journal of American Bee*, 138: 283-286.

Spivak, M., and Reuter, G. S. 2001. *Varroa jacobsoni* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology*, 94: 326-331.

Tu, S., Qiu, X., Cao, L., Han, R., Zhang, Y., and Liu, X. 2010. Expression and characterization of the chitinases from *Serratiamarcescens*? GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(2): 75-82.

Waite, R., Brown, M., and Thompson, H. 2003. Hygienic behaviour in honey bees in the UK: a preliminary study. *Journal of Bee World*, 84: 19-26.

Wilkes, K., and Oldroyd, B. 2002. Breeding hygienic disease resistant bees. Journal of RIRDC project no, US-39A.

Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N. H., and Starks, P.T. 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. Annual Review of Entomology, 54: 405–23.

Yang, X., and Cox-Foster, D. L. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. Journal of Proceeding National Academy Sciences United States of American, 102(11): 7470-7475.

Evaluation of hygienic behaviors in Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) colonies and their relationship with infestation rate to *Varroa destructor* mite

Gh. Tahmasbi^{1*}, B. Hoseini² and M. Eskandari nasab³

1. *Corresponding Author: Research Professor, Department of Animal Science Research Institute of Iran, Karaj, Iran (hosein_tahmasbi@hotmail.com)
2. Graduated Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran
3. Associate Professor, Department of Animal Science, University of Zanjan, Iran

Received: 31 December 2016

Accepted: 14 May 2018

Abstract

Background and Objectives

Honey bees hygienic behavior is the primary natural defense against *Varroa* mite, American foul brood and chalk brood disease and are controlled by genetic and environmental factors. Hygienic behavior includes of three stages of detecting, uncapping and removing of infected or dead brood from the colony. However, this behavior is quite rare, with only 10% of unselected colonies showing high levels of hygiene. Beekeepers can potentially increase this by screening colonies for hygiene and breeding from the best.

Materials & Methods

In this study hygienic behaviors and infestation rates of *Varroa* mite is evaluated in bee colonies. The study was accomplished on 100 honey bee colonies. The rate of uncapping and removal of dead broods was determined in resistant and control colonies. To determine the hygienic behavior, liquid Nitrogen was used to kill pupae. The number of uncapped and discharged cells were counted in the three periods of 24, 48 and 72 hours after the pouring of liquid nitrogen.

Results

According to results the examined colonies exhibited noticeable phenotypic variation for Hygienic behavior. At the first stage (spring) %21 and in the second stage (summer) %18 of colonies showed good hygienic behavior. Uncapping rates in days showed significant correlation with removing rates in the same recording day ($P < 0.01$). *Varroa* mite population was evaluated in in three stages of spring, summer and autumn. The result demonstrated that the colonies with high level of hygienic behavior had the lowest infestation rates of *Varroa* mite ($P < 0.05$). Moreover, the results showed that the contribution of hygienic behavior in the control of *Varroa* mite populations was %26.

Discussion

The results of this research and other studies conducted by other Iranian researchers show that Iranian honeybee has shown higher hygienic behavior against *Varroa* mite. In this study resistant and stable colonies were selected for bee breeding projects at the end of the year. By selecting and implementing good breeding programs, it is possible to increase the rate of these behaviors in order to create *Varroa* mite-resistant populations. It seems that hygienic colonies selecting for resistance to *Varroa* mite will have satisfactory results in the future.

Keywords: Hygienic behavior, Honeybee, *Varroa* mite