University of Tehran Press

Iaranian Journal of Animal Science

Online ISSN: 2423-7949

Homepage: https://ijas.ut.ac.ir/

Determining the amount of changes in the main components of honey bee venom in three seasons and several geographical areas of Iran

Mahdieh Mobarak[1] | Fatemeh Ghaziani[2]✉ | Gholam Ali Nehzati Paghale[3] | Mohsen Farhadpour[4]

1. Department of Animal Science Faculty of Agricultural Engineering, Karaj, Iran. E-mail: mahdiehmobarak@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Animal Science Faculty of Agricultural Engineering, Karaj, Iran. E-mail: ghaziani@ut.ac.ir
3. Department of Animal Science Faculty of Agricultural Engineering, Karaj, Iran. E-mail: nehzati@ut.ac.ir
4. Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran. E-mail: m-farhadpour@nigeb.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: March 23, 2023
Received in revised form: September 11, 2022
Accepted: November 12, 2022
Published online: April 15, 2023

Keywords:
Apamine,
Geographic area,
Honeybee venom,
Melittin,
Phospholipase A_2,
Season.

ABSTRACT

Honey bees are small insects with many useful products. Venom is one of these products with therapeutic benefits and high commercial value. Many factors affect the bee venom and its main components, namely Melittin, Apamine and Phospholipase A_2. This study investigates the effect of seasonal and geographical location on the venom composition in 8 cities, during three seasons of spring, summer and autumn, in a completely randomized design with 4 replications(hives). Analysis of venom samples from the target areas in different seasons by HPLC showed that the mentioned components, other than apamine (correlation=0.339), had no correlation with temperature. The mean amount of Protein, Melittin and Phospholipase A_2 of the treatments did not differ significantly during the 3 seasons ($p>0.05$). The mean percentage of melittin (63.15 %) and phospholipase A_2 (8.19 %) in spring; apamine (4.03 %) and protein (48.89 µg/100mg) were maximum in summer. The highest amount of Protein and Apamin in the venom was related to karaj (50.28% and 4.33% respectively), the highest amount of Melittin in khoramabad city and the highest Phospholipase A_2 was in birjand city. The effects of season have on venom components through temperature can be in addition to the direct effect on honey bees and venom production glands, through the effect on vegetation of area or the presence of seasonal changes in the venom components in addition to the effect of geographical location, a reflection of the difference in vegetation.

Cite this article: Mobarak, M., Ghaziani, F., Nehzati Paghale, Gh. A., & Farhadpor, M. (2023). Determining the amount of changes in the main components of honey bee venom in three seasons and several geographical areas of Iran. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (1), 47-59. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.339985.653877

© The Author(s).
Publisher: University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.339985.653877

Extended Abstract

Introduction:

Honey bees are small insects with many useful products. Venom is one of these products with therapeutic benefits and high commercial value. Honeybee venom is a clear liquid, odourless, a bitter taste, and a hydrolytic mixture of

University of Tehran Press

Iaranian Journal of Animal Science

Online ISSN: 2423-7949

Homepage: https://ijas.ut.ac.ir/

proteins with pH 4.5 to 5.5. Venom dries up easily at room temperature, and used by bees for defense. It is a mixture of proteins, peptides including melittin, phospholipase A2, apamin, adolapin, and mast cell-degranulating peptide (MCDP), amino acids, sugars, biogenic amines, volatile compounds and pheromones. Among these compounds, melittin, a small linear peptide consisting of 26 amino acids, is the major component of bee venom. This study investigates the effect of seasonal and geographical location on three major components of venom in 8 cities, during three seasons of spring, summer and autumn, in a completely randomized design with 4 replications (hives).

Materials and Methods:

The samples were collected by stimulating the bees with electric current pulses and stored. The honeybee venom solutions were prepared by diluting 2 mg of dried powdered product in 1.5 ml 0.1 % TFA in water. All prepared solutions were subjected to sonication by ultrasonic bath for 5 min and then filtered through a 0.45 µm membrane filters. The impurities were removed by using a micro filter 0.45. The experiments were carried out on an HPLC model Advanced Scientific Instruments (Knauer, Germany) equipped with a UV, set at 220 nm and controlled by the ChromGate 3.3.2 software. Flow rate of mobile phase 1.5 ml/min, separation temperature 30 ℃ ; chromatographic separation was performed using the following eluents: eluent A – 0.1% TFA in water, B – 0.1 % TFA in the solution, acetonitrile: water (80:20). Venom compounds were identified using UV detector at 220 nm wavelength. Conditions for linear gradient elution: 0%B- 45% B for 60 min. The separated components and their degree of purification were then compared with standard reagents. Apamin, PLA2, and melittin standard reagents were prepared at concentrations of 0.1 mg/mL.

Discussion:

Analysis of venom samples from the target areas in different seasons showed that the mentioned components, other than apamine (correlation= 0.339), had no correlation with temperature. The mean amount of Protein, Melittin and Phospholipase A_2 of the treatments did not differ significantly during the 3 seasons ($p>0.05$). The mean percentage of melittin (63.15 %) and phospholipase A_2(8.19 %) in spring; apamine (4.03 %) and protein (48.89 µg/100mg) were maximum in summer. The highest amount of Protein and Apamin in the venom was related to karaj (50/28% and 4/33% respectively), the highest amount of Melittin in khoramabad city and the highest Phospholipase A_2 was in birjand city. Seasonal variations may have an influence on bee venom content, since the seasons affect flowers and fruits, and thus honeybee feeding and venom production glands through the effect on vegetation of area. The presence of seasonal changes in the venom components in addition to the effect of geographical location, a reflection of the difference in vegetation.

Keywords: Apamine, Geographic area, Honeybee venom, Melittin, Phospholipase A_2, Season.

انتشارات دانشگاه تهران

علوم دامی ایران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: https://ijas.ut.ac.ir/

تعیین میزان تغییرات اجزای اصلی زهر زنبورعسل در سه فصل و چند منطقه جغرافیایی ایران

مهدیه مبارک[۱] | فاطمه غازیانی[۲]✉ | غلامعلی نهضتی پاقلعه[۳] | محسن فرهادپور[۴]

۱. گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: abcdef@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: abcdef@ut.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: abcdef@ut.ac.ir

۴. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، مؤسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (NIGEB)، تهران، ایران. رایانامه: abcdef@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۰۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶

کلیدواژه‌ها:
آپامین،
زهر زنبورعسل،
فصل،
فسفولیپاز A_2،
ملیتین،
منطقه جغرافیایی.

چکیده

زنبورعسل حشره‌ای کوچک با محصولات پرفایده‌ی بسیاری است. زهر یکی از این محصولات بوده که فواید درمانی و ارزش تجاری بالایی دارد. عوامل بسیاری بر زهر زنبور و اجزاء اصلی آن یعنی ملیتین، آپامین و فسفولیپاز A_2 تاثیر گذارند. در این پژوهش اثر فصل و موقعیت جغرافیایی بر اجزاء اصلی زهر، طی سه فصل بهار، تابستان و پاییز در ۸ شهر، در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار (کندو) بررسی شده است. آنالیز نمونه‌های زهر مناطق مختلف با دستگاه HPLC نشان داد که اجزاء نامبرده زهر به غیر از آپامین (۰/۳۳۹= میزان همبستگی)، همبستگی با فصل نداشتند. میانگین پروتئین، ملیتین و فسفولیپاز A_2 نمونه‌ها، در طول ۳ فصل تفاوت معنی‌داری نداشت($p>۰/۰۵$). حداکثر میانگین درصد ملیتین (۶۳/۱۵ ٪) و فسفولیپاز A_2 (۸/۱۹٪) در بهار، و آپامین (۴/۰۳٪) و پروتئین (۴۸/۸۹ میکروگرم بر ۱۰۰ میلیگرم) در تابستان بود. بیشترین میزان پروتئین و آپامین زهر مربوط به شهر کرج (به ترتیب ۵۰/۲۸٪ و ۴/۳۳٪)، بیشترین میزان ملیتین شهر خرم آباد (۶۶/۸۲٪) و بیشترین میزان فسفولیپازA_2 مربوط به شهر بیرجند (۸/۸۵٪) بود. تاثیراتی که فصل از طریق دما بر روی ترکیبات زهر می‌گذارد می‌تواند علاوه بر تاثیر مستقیم بر زنبورعسل و غدد تولید زهر، از طریق تاثیر بر پوشش گیاهی منطقه و یا وجود تغییرات فصلی در ترکیبات زهر در کنار تاثیر موقعیت جغرافیایی بازتابی از تفاوت پوشش گیاهی باشد.

استناد: مبارک، م.، غازیانی، ف.، نهضتی پاقلعه، غ. و فرهادپور، م (۱۴۰۲). تعیین میزان تغییرات اجزای اصلی زهر زنبورعسل در سه فصل و چند منطقه جغرافیایی ایران. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۱)، ۴۷-۵۹. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.339985.653877

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

۱. مقدمه

زهر زنبورعسل یا آپیتوکسین (Apitoxin)، مایعی شفاف، با طعم تلخ، دارای بوی تند و بی رنگ است. این مایع هیدرولیتیک دارای pH پایه ۵-۴/۵ بوده (Hossen *et al*., 2016; Noyer, 2016; Pak, 2017) و اجزاء اصلی آن شامل یک پپتید کاتیونی به نام ملیتین است که ۴۰-۶۰ درصد، آپامین حدود ۳-۲ درصد و آنزیم فسفولیپاز A_2 که ۱۲-۱۰ درصد از وزن زهر خشک را تشکیل می‌دهد (Raghuraman & Chattopadhyay, 2007; Moreno & Giralt, 2015; Chen *et al*., 2016). ملیتین ترکیب شیمیایی است که دارای خواص آبدوست (قطبی) و چربی دوست است و این خاصیت ملیتین را به یک پپتید با اثرات متعدد، از جمله اثر ضد التهابی (Rached, 2010)، ضد باکتریایی (Asthana, 2004)، ضد ویروسی (Falco, 2013) و ضد توموری (Gajski, 2013) تبدیل می‌کند. زهر زنبورعسل در آب محلول و در الکل و سولفات آمونیوم نامحلول بوده و به راحتی در دمای اتاق خشک می‌شود. تماس آن با هوا باعث ایجاد بلورهایی به رنگ سفید مایل به خاکستری شده و رنگ آن زرد روشن است. برخی از نمونه‌های تجاری آن به رنگ قهوه‌ایست که ممکن است به دلیل اکسید شدن پروتئین‌های آن باشد (Eze *et al*., 2016). زهر زنبور عسل حاوی ۸۸ درصد آب است. گلوکز، فروکتوز و فسفولیپید موجود در زهر مشابه خون زنبور عسل است (Bogdanov, 2016).

عوامل مختلفی بر روی میزان زهر تولیدی و ترکیبات موجود در زهر مؤثر است. این احتمال که اثرات فصل، در شیمی زهر زنبورعسل مهم باشد، ابتدا در سال ۱۹۸۲ با اندازه‌گیری دوپامین مطرح شد. پس از آن در سال ۱۹۸۷ آزمایشی بر روی اثر فصل و سن زنبورها بر روی میزان ۵-هیدروکسی تریپتامین (سروتونین) موجود در زهر، صورت گرفت. مشاهده شد که سن زنبورعسل تاثیر چشمگیری بر ترکیبات زهر دارد به طوری که مقدار این ماده در زنبورهای جوان در دو هفته اول زندگی آن‌ها بسیار کم و در زنبورهای مسن‌تر بیشتر است (Bachmayer *et al*., 1972). تحقیقات نشان داده است که مقادیر زهر تولیدی در تابستان و در تمام سنین توسط زنبوران کارگر نسبت به فصل زمستان بیشتر است (Abreu *et al*., 2000). در حالیکه سن یکی از عوامل موثر برترکیبات زهر است، زمان و فصل جمع آوری زهر نیز اهمیت دارد (Owen & Sloley; 1988). Neumann *et al*. (1953)، Habermann (1972)، Owen *et al*. (1990)، Owen & Pfaff (1995) تاثیر تغذیه، سن، فصل و سال جمع آوری بر زهر را بررسی کرده‌اند.

اهمیت فصل در شیمی زهر به طور دقیق مشخص نیست. در حالیکه کنترل این تغییرات ممکن است از متغیرهای آب و هوایی حاصل شود، اما به نظر می‌رسد این تغییرات در واقع منعکس‌کننده تغییرات منابع گرده‌ای باشد که توسط زنبوران مصرف می‌شود. اگر این فرض صحیح باشد، مطالعات شیمی زهر زنبورعسل را پیچیده‌تر می‌کند زیرا نشان می‌دهد که ممکن است اختلافاتی بین مناطق مختلف و حتی در همان منطقه در سال‌های مختلف وجود داشته باشد (Owen & Sloley; 1988).

تفاوت‌هایی در مقدار زهر تولیدی و مقدار زهر تخلیه شده در طی نیش زدن در بین گونه‌ها و نژادهای مختلف زنبورها دیده شده است (Anwar, 2000; Nasser, 2013; El-Bahnasy *et al*., 2017; El feel, 2017). همچنین تفاوت در ترکیبات زهر در زمان‌های مختلف می‌تواند به دلیل تغییرات اقلیمی، فصلی و تغذیه‌ای باشد، که این تغییرات هم کیفی و هم کمی است (Ferreira *et al*., 2010). گزارش شده که مقدار زهر زنبورعسل تحت تاثیر ماه و فصل جمع آوری آن است، به طوری که بیشترین مقدار زهر به ترتیب در فصل تابستان، بهار، پاییز و سپس زمستان است. هرچند تاثیر منطقه‌ی جغرافیایی نیاز به بررسی‌های بیش‌تر دارد، زیرا در برخی مناطق در فصل تابستان و در برخی مناطق دیگر فصل بهار بیشترین مقدار زهر تولیدی را به همراه داشته است (Kucinschi & Rafiroin, 1978; Anwar, 2000; El-Ashhab, 2001; Nenchev, 2001; El-Shaarawy *et al*., 2007; Sanand & Mohanny., 2013; Haggag *et al*., 2015; Elhosseny, 2016).

عامل دیگر موثر بر مقدار و ترکیب زهر منطقه‌ی جغرافیایی است، به طوری که در مناطق مختلف حداکثر زهر تولیدی در ماه‌های متفاوتی رخ می‌دهد و این تفاوت به پوشش گیاهی نسبت داده شده است. زیرا همانطور که تحقیقات نشان داده است افزایش کیفیت غذای مصرفی توسط زنبورها موجب افزایش زهر تولیدی و بهبود کیفیت آن می‌گردد (Abusabbah *et al*., 2016; El-Bahnasy *et al*., 2017; Hussein *et al*., 2019).

Hussein *et al*. (2019) نشان دادند که مقدار زهر تولیدی در دو شهر مورد بررسی تفاوت معنی‌داری داشت. حتی در هر دو شهر حداکثر مقدار زهر تولید شده نیز در دو ماه متفاوت بود (شهر نصر در اردیبهشت و منطقه موتوبس در اوایل خرداد). همچنین مطالعات اخیر نشان داد که نه تنها مقدار زهر تولید شده بلکه ترکیب زهر و اجزاء اصلی آن همچون ملیتین، آپامین، فسفولیپاز A_2 و پروفایل پروتئینی زهر در ۵ منطقه جغرافیایی مورد بررسی متفاوت بود (Scaccabarozzi *et al*., 2021).

با توجه به خصوصیات بیولوژیکی زهر زنبورعسل جذابیت تجاری آن رو به افزایش است (Ionete *et al*., 2013). بخش عمده تاثیرات کارآمد و درمانی زهر مربوط به اجزاء اصلی آن یعنی: ملیتین، فسفولیپاز A_2، آپامین و برخی پپتیدهاست. غلظت این اجزاء در زهر به عوامل مختلفی از جمله: نژاد زنبور، سن زنبور، قدرت کلنی، منبع تغذیه، روش جمع‌آوری زهر و فصل جمع‌آوری بستگی دارد (Noyer, 2016). این پژوهش به بررسی اثر فصل و مناطق جغرافیایی ایران بر ترکیبات اصلی زهر زنبورعسل می‌پردازد. با بررسی اثر اقلیم‌های مختلف و فصل‌های سال بر روی زهر، می‌توان با تعیین فصل و منطقه‌ی مناسب، مقدار زهر بیشتر با مقادیر بالاتری از ملیتین و سایر ترکیبات مفید دیگر آن، برداشت کرد.

۲. مواد و روش‌ها

این مطالعه در سه فصل بهار، تابستان و پاییز ۱۴۰۰ انجام گرفت. نمونه‌های زهر از ۸ منطقه: ارومیه، چوبر، بیرجند، قم، کرج، خرم آباد، بروجن و آوج جمع‌آوری گردید. زهرگیری در هر منطقه و در هر فصل از ۴ کندو به صورت تصادفی در اواسط هر فصل (یکسان برای تمام شهرها) و با توجه به فعالیت زنبورها انجام شد. نمونه‌گیری طبق شرایط یکسان (زمان زهرگیری ۶ عصر، روش زهرگیری، دستگاه زهرگیر و وضعیت یکسان کندوها) انجام گردید. زهرگیری از زنبورها توسط دستگاه زهرگیر فرکانسی از طریق روش شوک الکتریکی، با ولتاژ ۱۲ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. زهر استحصال شده بر روی صفحه شیشه‌ای قرار گرفته و به سرعت در معرض هوا خشک شد. با خراشیدن صفحات شیشه‌ای، زهر به صورت پودر خشک سفید رنگ جمع‌آوری گردید و به فریزر با دمای ۱۷- درجه سانتی‌گراد، منتقل گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۸ تیمار و ۴ تکرار (کندو) انجام شد. داده‌های حاصل از این طرح با استفاده از نرم افزار آماری SAS و Proc GLM آنالیز شدند. مدل آماری مورد استفاده جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها به شرح زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + S_j + e_{ij}$$

که در آن Y_{ij}= صفت مورد اندازه‌گیری، μ= میانگین کل، G_i= اثر منطقه‌ی جغرافیایی، S_j= اثر فصل و e_{ij}= خطای کل است.

به منظور آنالیز اجزاء موجود در زهر از دستگاه کروماتوکرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) موجود در آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشگاه تهران مدل ADVANCED SCIENTIFIC INSTRUMENTS ساخت شرکت KNAUER آلمان استفاده شد. ستون دستگاه C18، با طول ۲۵ سانتی متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر بود. دمای دستگاه در حین آنالیز ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت جریان فاز متحرک ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج آشکارساز UV ۲۲۰ نانومتر انتخاب شد.

جدول ۱. موقعیت جغرافیایی مناطق جمع آوری نمونه های زهر

منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	اقلیم
ارومیه	۴۵/۰۲	۳۷/۳۲	۱۳۴۸	سرد کوهستانی
آوج	۴۹/۲۲	۳۵/۵۷	۱۹۶۵	معتدل کوهستانی
قم	۵۰/۸۷	۳۴/۶۴	۹۳۶	خشک و بیابانی
کرج	۵۰/۹۷	۳۵/۸۴	۱۳۱۲	خشک و بیابانی
خرم آباد	۴۸/۳۳	۳۳/۴۶	۱۱۸۸	معتدل کوهستانی
بیرجند	۵۹/۲۱	۳۲/۸۷	۱۴۵۴	خشک و بیابانی
بروجن	۵۱/۲۹	۳۱/۹۷	۲۲۲۴	معتدل کوهستانی
چوبر	۴۸/۸۹	۳۸/۱۸	-۱۸	هیرکانی

۲. ۱. آماده سازی نمونه‌ها جهت تزریق

مقدار ۲ میلی‌گرم از پودر زهر خشک را وزن کرده، سپس ۱/۵ میلی لیتر محلول شامل ۰/۱ درصد تری فلوئورواستیک اسید (TFA) در آب افزوده و خوب مخلوط شد. پس از آن نمونه از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شده و پس از صاف‌شدن، میزان ۴۰ میکرولیتر از نمونه به دستگاه HPLC تزریق شد. معادله رگرسیون خطی برای استاندارد ملیتین $y=13.127x + 0.0308$ و ضریب همبستگی (R^2) به دست آمده ۰/۹۹۴۲ بود، که نشان دهنده‌ی رابطه خطی قوی بین جذب و غلظت ملیتین بود.

۲. ۲. اندازه‌گیری پروتئین زهر

اندازه‌گیری پروتئین کل نمونه‌های زهر زنبورعسل با روش برادفورد و با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل ۲۱۰۰ شرکت شیمادزو ژاپن انجام گردید (Bradford, 1976). در این روش از اتصال معرف رنگی کوماسی بلو جی -۲۵۰ به پروتئین و اندازه گیری شدت رنگ ایجاد شده این کمپلکس استفاده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون برای استاندارد سرم آلبومین گاوی و خطی بودن جذب محلول‌های استاندارد، ۲ میلی گرم از نمونه‌های زهر در ۱/۵ میلی لیتر محلول شامل ۰/۱ درصد تری فلوئورواستیک اسید (TFA) در آب حل شد، از هر نمونه مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته، ۲/۵ میلی لیتر معرف کوماسی بلو جی – ۲۵۰ به آن افزوده شده و مخلوط، به خوبی هم زده شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها خوانده شد. با استفاده از شیب منحنی استاندارد مقدار غلظت پروتئین نمونه‌ها بر اساس معادله بیر-لمبرت $A=\varepsilon*c*b$ تعیین شده و مقدار پروتئین زهر محاسبه شد.

۳. نتایج و بحث

۳. ۱. پروتئین کل نمونه‌های زهر

اختلاف میانگین پروتئین کل نمونه‌های زهر(جدول ۲) در طول ۳ فصل معنی‌دار نبود ($p>0/05$). بیشترین میانگین پروتئین مربوط به شهر کرج (۵۰/۲۸ میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم) و کمترین مقدار شهر آوج (۴۲/۷۱ میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم) بود. همچنین اختلاف میانگین پروتئین کل در فصل‌های مورد بررسی نیز تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). بیشترین مقدار میانگین پروتئین مربوط به فصل تابستان و سپس پاییز بود (جدول ۳).

مقایسه جهانی منحنی‌های الکتروفورتیک زهر ۲۵ گونه مختلف راسته بال غشاییان نشان داد که الگوهای پروتئین زهر به شدت از یک گونه به گونه‌ی دیگر متفاوت است (Leluk *et al*., 1989). با توجه به اینکه زنبورهای بومی ایران با سایر نژادها ترکیب شده و هیبریدهای جدیدی را ایجاد کرده‌اند، این موضوع می‌تواند بخشی از علت تفاوت به‌دست‌آمده

در ترکیبات زهر را توجیه کند، همانطور که با مقایسه‌ی زهر زنبور کارنیولان و ایتالیایی با زهر زنبور عسل آفریقایی توسط Ferreira *et al*. (2013)، ترکیب پروتئین هم از نظر حضور و هم از نظر فراوانی متفاوت بود (Ferreira *et al*., 2013). پژوهش‌ها تغییرات پروتئین زهر را با تغییرات فصلی سالانه مرتبط دانسته‌اند (Owen *et al*., 1990; Owen and Pfaff,1995).

جدول ۲. مقایسه میانگین اجزاء زهر در کل دوره

نمونه ها	پروتئین (µg/100mg)		ملیتین (٪)		فسفولیپاز A_2 (٪)		آپامین (٪)	
	میانگین	SE	میانگین	SE	میانگین	SE	میانگین	SE
ارومیه	۴۶/۳۹[a]	۴/۶۴	۶۳/۱۰[a]	۳/۶۵	۷/۷۲[a]	۰/۷۴	۳/۲۹[ab]	۰/۸
آوج	۴۲/۷۱[a]	۱/۸۶	۵۷/۵۴[a]	۱/۴۶	۸/۲۷[a]	۰/۲۹	۳/۶۷[ab]	۰/۳۲
قم	۴۹/۸۴[a]	۳/۷۲	۶۳/۰۸[a]	۲/۹۲	۷/۸۰[a]	۰/۵۹	۳/۱۶[ab]	۰/۶۴
کرج	۵۰/۲۸[a]	۱/۸۶	۶۰/۷۷[a]	۱/۴۶	۷/۷۱[a]	۰/۲۹	۴/۳۳[a]	۰/۳۲
خرم آباد	۴۵/۶۰[a]	۴/۶۴	۶۶/۸۲[a]	۳/۶۵	۷/۷۷[a]	۰/۷۴	۱/۷۸[b]	۰/۸
بیرجند	۴۵/۲۳[a]	۴/۶۴	۶۳/۳۳[a]	۳/۶۵	۸/۸۵[a]	۰/۷۴	۳/۴۶[ab]	۰/۸
بروجن	۴۸/۵۶[a]	۴/۶۴	۶۳/۵۲[a]	۳/۶۵	۷/۸۱[a]	۰/۷۴	۳/۸۰[ab]	۰/۸
چوبر	۴۸/۵۸[a]	۲/۴۴	۶۳/۹۱[a]	۱/۹۲	۸/۳۵[a]	۰/۳۹	۳/۰۱[ab]	۰/۴۲

ab حروف غیر مشابه برای هر نمونه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد.

جدول ۳. مقایسه میانگین اجزاء زهر در فصول سال

	پروتئین (µg/100mg)		ملیتین (٪)		فسفولیپازA_2 (٪)		آپامین (٪)	
	میانگین	SE	میانگین	SE	میانگین	SE	میانگین	SE
بهار	۴۴/۸۱	۱/۷۴	۶۳/۱۵	۱/۳۶	۸/۱۹	۰/۳۰	۳/۰۸[b]	۰/۳
تابستان	۴۸/۸۹	۱/۷۴	۶۰/۳۰	۱/۳۶	۸/۱۵	۰/۳۰	۴/۰۳[a]	۰/۳
پاییز	۴۸/۰۸	۲/۶۴	۵۹/۸۶	۲/۰۸	۷/۶۰	۰/۴۵	۳/۷۱[ab]	۰/۴۵

ab حروف غیر مشابه برای هر نمونه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد.

نتایج به دست آمده در این مطالعه با یافته‌های Scaccabarozzi *et al*. (2021) مطابقت داشت که عامل دما و مکان را در درجه‌ی اول موثر بر تغییرات ترکیب پروتئین زهر دانستند. آن‌ها محرک اصلی تغییرات وزن زهر را دما، و عامل تفاوت در اجزا زهر بین مکان‌های مورد بررسی را منطقه و عرض جغرافیایی دانسته و بیان داشتند که محدوده‌ی جغرافیایی تا حدی تفاوت موجود در ترکیب پروتئین زهر را توضیح می‌دهد. همانگونه که طبق داده‌های به دست آمده در پژوهش حاضر شهرهای با عرض جغرافیایی یکسان و مشابه، از نظر میزان پروتئین زهر نیز مشابه بودند(شهر کرج در بهار، چوبر در تابستان و قم در پاییز بیشترین میانگین پروتئین را داشته و طول و عرض جغرافیایی مشابه داشتند) همچنین Scaccabarozzi *et al*. (۲۰۲۱) بر تاثیر پوشش گیاهی بر مقدار پروتئین زهر تاکید کردند. نتایج این مطالعه با نتایج آن‌ها همسو بوده و شواهد واضحی از تغییرات پروتئین ناشی از موقعیت جغرافیایی را نشان داد، که این ظاهرا ناهمگونی پوشش گیاهان موجود در منطقه و تفاوت در نوع پوشش گیاهی را نشان می‌دهد (Scaccabarozzi *et al*., 2021). به این صورت که با وجود تفاوت در اقلیم ۳ شهر ذکر شده، پوشش گیاهی مناسب در هر فصل متناسب با نیاز زنبوران بوده و توانسته بر زهر تولیدی اثر گذار باشد. هرچند این مسئله نیازمند بررسی دقیق تر است.

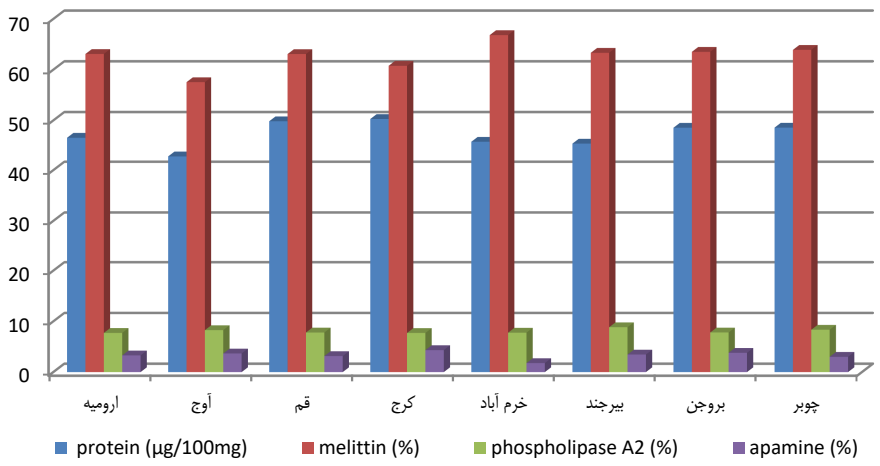
۳. ۲. ملیتین نمونه‌های زهر

اختلاف مقدار میانگین ملیتین نمونه‌ها در کل سه فصل معنی دار نبود (p>۰/۰۵). مقایسه‌ی میانگین ملیتین در بین

نمونه‌ها (جدول ۲) نشان داد که بیشترین میانگین ملیتین در طول ۳ فصل مربوط به شهر خرم آباد(۶۶/۸۲ ٪) و کمترین مقدار مربوط به شهر آوج (۵۷/۵۴ ٪) بود. تفاوت میانگین ملیتین در بین ۳ فصل نیز معنی‌دار نبود(p>۰/۰۵). مقایسه‌ی میانگین ملیتین در ۳ فصل مورد بررسی نشان داد (جدول ۳)، که فصل بهار بیشترین و فصل پاییز کمترین میانگین ملیتین را داشت.

تولید ملیتین به عنوان تابعی از سن زنبور و فصل سال توسط Owen & Pfaff (1995) با استفاده از ارزیابی فعالیت همولیتیک این پپتید بررسی شد. طبق نتایج این محققین مقدار ملیتین تولیدی، در زنبورهای با سن بالاتر از ۱ هفته در اواسط ماه آگوست کمتر از زنبورهای همسن در اوایل ماه ژوئن است (Owen and Pfaff, 1995). مطالعات نشان داده‌اند که برای تولید این پپتید علاوه بر تنوع بین گونه‌ای تنوع درون گونه‌ای نیز وجود دارد، به طوری که درصد نسبی ملیتین بین ملکه و کارگر، کارگران جوان‌تر و مسن‌تر و حتی زنبورهای نگهبان و زنبوران چراگر یا مزرعه رو متفاوت است. به این صورت که در سن ۱ سالگی، زهر ملکه نصف ملیتین کارگرهاست (Schmidt, 1995).

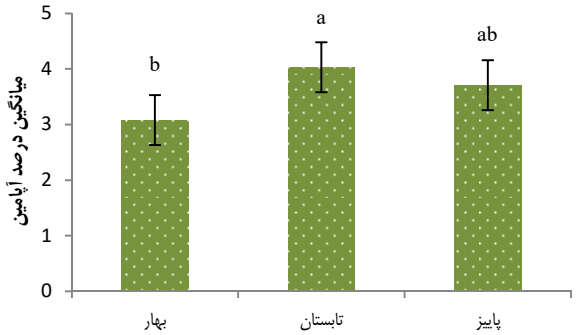
نتایج این مطالعه با بررسی‌های Ferreira *et al.* (2010) مطابقت داشت. آن‌ها تنوع درون گونه‌ای ملیتین را با توجه به عوامل اقلیمی و فصلی بررسی کردند. بیشترین میزان ملیتین را با ۵۵/۲ درصد در ماه اکتبر (۹مهر–۹آبان) و سپس ۵۴/۲ درصد در ماه می (۱۰ اردیبهشت–۱۰ خرداد) ثبت کردند. کمترین درصد نیز ۲۳/۶ درصد در ماه ژانویه و در زمستان بود. همچنین مقایسه نتایج مشابه با پژوهش حاضر، برای فصل بهار بیشترین میانگین درصد ملیتین، سپس پاییز و برای تابستان کمترین میزان را گزارش کردند. Ferreira . *et al* (2010) همچنین به تجزیه و تحلیل تولید ملیتین به عنوان تابعی از اقلیم (دمای هوا و رطوبت نسبی) پرداختند، نتایج آن‌ها با نتایج این مطالعه همسو بود که نشان داد تولید ملیتین با پارامترهای آب و هوایی هم بستگی ندارد، زیرا تغییرات ملیتین با فرکانس‌های آب و هوایی محاسبه شده همگام نبود (Ferreira *et al*., 2010). از طرفی پارامترهای اقلیمی محاسبه شده‌ی آن‌ها نشان داد که در بهار و پاییز رطوبت نسبی تقریبا مشابه بوده (۶۱/۲ درصد در بهار، ۶۳/۴ درصد در پاییز) و تابستان کمترین میزن رطوبت نسبی (۵۲/۴ درصد) را دارا بود. هر چند میزان بارش در پاییز بسیار زیاد بود (میانگین ۱۴۵/۱ میلی‌متر) اما تاثیر چندانی بر زهر نداشته و تاثیر رطوبت نسبی بر ترکیبات زهر قابل توجه است. همانطور که شهر خرم آباد با داشتن رطوبت نسبی سالیانه مناسب (۴۶/۰۸ ٪) در فصل بهار و تابستان بیشترین میانگین ملیتین را داشت (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه میانگین اجزاء زهر در کل دوره

۳. ۳. آپامین نمونه‌های زهر

بر اساس آنالیز داده‌ها تفاوت در مقدار میانگین آپامین نمونه‌ها در طول سه فصل معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) (نمودار ۲). مقایسه‌ی میانگین مقدار آپامین نشان داد که بیشترین میانگین آپامین مربوط به شهر بیرجند (۴/۴۶٪)، و کمترین مربوط به شهر خرم آباد (۱/۷۸٪) بود، که بین این دو شهر با سایر شهرها تفاوت معنی‌داری وجود داشت.



نمودار ۲. میانگین مقدار آپامین زهر بر اساس فصل

در بین سه فصل مورد بررسی نیز تفاوت معنی‌داری در مقدار میانگین آپامین در بین نمونه‌ها وجود داشت(p<۰/۰۵). بیشترین میانگین آپامین در فصل تابستان و کمترین مقدار آن در فصل بهار بود (جدول ۲). آنالیز آماری داده‌ها وجود همبستگی مثبت بین آپامین و دما (p<۰/۰۳) را نشان داد که مشخصا در فصل تابستان بیشترین میانگین برای آپامین به دست آمد.

درصد نسبی آپامین بین ملکه و انواع مختلف زنبورهای کارگر متفاوت است (Baracchi and Turillazzi, 2010). مطالعات اخیر تاثیر فصل و دما بر محتوای پروتئین زهر را نشان داده است (Abreu *et al*., 2000; Ferreira *et al*., 2010; Scaccabarozzi *et al*., 2021). در زنبورها چرخه‌ای برای کل محتوای پروتئین در غدد زهر رخ می‌دهد که این چرخه در زنبورهای تابستانی و زمستانی متفاوت است. نشانه‌هایی وجود دارد که بیش از یک چرخه در زنبورهای زمستانی رخ می‌دهد، به طوری که محتوای پروتئین زهر تا سن ۲۱ روزگی افزایش یافته، سپس کاهش می‌یابد و مجددا در ۴۰ روزگی افزایش می‌یابد. از طرف دیگر این واقعیت که محتوای پروتئین در غدد زهر کارگران زمستانی نسبت به کارگران تابستانی در تمام سنین کمتر است، نشان دهنده‌ی فعالیت فیزیولوژیکی کمتر زنبورهای زمستانی و همسو با نتایج این مطالعه است، که نشان داد مقدار آپامین تولیدی در فصل بهار کمترین بوده و بیشترین مقدار مربوط به فصل تابستان است که حاصل ازافزایش ترشحات غده‌ی زهر است (Abreu *et al*., 2000).

نتایج مطالعه حاضر با نتایج Scaccabarozzi *et al*. (2021) همخوانی داشت، طبق یافته‌های آنان در بین متغیرهای اکولوژیکی، ترکیب پروتئین عمدتا تحت تاثیر موقعیت جغرافیایی و دما بود. شهر کرج، بروجن و آوج با بیشترین میانگین آپامین، عرض جغرافیایی ۳۱ و ۳۵ درجه‌ی شرقی و رطوبت نسبی سالیانه‌ی مشابه (۵۱–۵۲ درصد) داشتند که این موضوع بیانگر تاثیر رطوبت نسبی بر ترکیبات زهر، در کنار فصل و منطقه‌ی جغرافیایی است.

۳. ۴. فسفولیپاز A_2 نمونه‌های زهر

نتایج حاصل، نشان از معنی‌دار نبودن اختلاف میانگین فسفولیپاز A_2 در بین نمونه‌ها، در طول ۳ فصل داشت (p>۰/۰۵). مقایسه میانگین نمونه‌ها نشان داد که بیشترین میانگین فسفولیپازA_2 مربوط به شهر بیرجند و کمترین مقدار میانگین مربوط به شهر کرج بود که در جدول۲ آمده است.

اختلاف مقدار میانگین فسفولیپازA_2 در بین ۳ فصل نیز معنی‌دارنبود($p>۰/۰۵$). بیشترین میانگین فسفولیپازA_2 مربوط به فصل بهار و کمترین در فصل پاییز بود (جدول ۳). طبق گزارش Dong *et al.* (2015) انتظار می‌رود اجزاء اصلی زهر مانند فسفولیپاز$A2$ به عنوان تابعی از فصل تغییر کند (Dong *et al.*, 2015). همچنین تنوع درون گونه‌ای فسفولیپاز$A2$ در زهر توسط Ferreira *et al.* (2010) با عوامل اقلیمی و فصلی مرتبط بوده و طبق یافته‌های آنان بیشترین مقدار فسفولیپاز$A2$ مربوط به ماه اکتبر (۹ مهر–۹ آبان) با مقدار ۱۸/۵٪ و کمترین مقدار آن مربوط به ماه ژانویه (۱۱ دی–۱۱بهمن) ۸/۴٪ بوده است. در رابطه با میانگین درصد فصول مختلف نیز ابتدا تابستان، سپس بهار و بعد پاییز بود (Ferreira *et al.*, 2010). فسفولیپاز A_2 عمدتا با پیروی از یک الگوی فصلی در زهر ترشح می‌شود به گونه‌ای که بیشترین مقدار آن در زهر در طول فصل زمستان رخ می‌دهد (Hossen *et al.*, 2016). بر خلاف ملیتین و پروتئین کل زهر که عمدتا در شهرهای با اقلیم معتدل‌تر و پربارش‌تر دارای بیشترین میانگین بودند، فسفولیپاز A_2 در شهر آوج و بیرجند به ترتیب با اقلیم معتدل کوهستانی و خشک و بیابانی بیشترین میانگین را داشت. این می‌تواند احتمال تاثیر دما بر فسفولیپازA_2 باشد، به نحوی که تاثیر فصل زمستان بر افزایش این جزء در زهر طبق گفته Hossen *et al.* (2016)، عمدتا به دلیل دمای پایین‌تر بوده و ترشح این جزء زهر در دمای پایین‌تر افزایش می‌یابد.

با توجه به مغایرت در نتایج Ferreira *et al.* (2010) و مطالعه‌ی حاضر با نتایج Hossen *et al.* (2016)، قطعا عواملی به غیر از دما بر این جز از زهر اثر گذار هستند. شاید نوع پوشش گیاهی و تغذیه‌ی زنبورها در کنار دما بر کیفیت ماده تاثیر گذار است.

تنوعی که در طول سال و در بین اجزاء مختلف زهر ذکر شد، می‌تواند به دلیل تفاوت در دمای شهرهای مورد بررسی باشد. همچنین می‌توان در نظر داشت که دما و اقلیم تاثیر خود را از طریق پوشش گیاهی و در نتیجه منابع غذایی بر روی زنبورعسل اعمال می‌کنند.

۳. ۵. همبستگی بین اجزاء زهر در کل دوره

همبستگی بین اجزاء زهر در جدول ۳ نشان داده شده است. بین ملیتین و آپامین در کل دوره همبستگی معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و منفی وجود داشت. همبستگی بین ملیتین و پروتئین نیز مثبت و معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). همچنین نتایج به دست آمده وجود همبستگی مثبت بین فصل و آپامین را نشان داد($p<۰/۰۵$). بین سایر اجزاء زهر همبستگی معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ٤. همبستگی اجزاء زهر در کل دوره

اجزاء زهر	ملیتین	فصل
آپامین	-۰/۷۴۲	۰/۳۳۹
پروتئین	۰/۴۱۱	-

بین سایر اجزاء زهر با یکدیگر و با دما همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد که با نتایج مطالعات Ferreira *et al.* (2010) و Danneels *et al.* (2015) مطابقت داشت، آن‌ها دلایل فصلی تغییرات پروتئین را بررسی کرده و به تجزیه و تحلیل تولید ملیتین به عنوان تابعی از اقلیم (دمای هوا و رطوبت نسبی) پرداختند، اما هیچ رابطه‌ی خاصی با عوامل آب و هوایی مانند دما و رطوبت نسبی پیدا نکرده و اظهار داشتند که تولید ملیتین با پارامترهای آب و هوایی هم بستگی ندارد (Ferreira *et al.*, 2010; Daneels *et al.*, 2015).

عوامل اکولوژیکی بر روند زندگی زنبورعسل، تولید زهر و حتی ترکیبات زهر تولیدی تاثیر گذار است. نتایج این پژوهش نشان داد طول و عرض جغرافیایی محل استقرار کندوها بر کیفیت و ترکیبات زهر موثر است. اثر فصل بر روی تمام اجزاء زهر یکسان نبوده و مناطق با عرض جغرافیایی مشابه از نظر ترکیب زهر مشابه هستند. تاثیر فصل بر اجزاء زهر می‌تواند از طریق دما اعمال شود. دما با تاثیر مستقیم بر زنبورعسل و غدد زهر بر آن اثر گذاشته و یا با تاثیر بر پوشش گیاهی بر روی منابع تغذیه‌ای اثرگذار می‌باشد. همچنین می‌توان در نظر داشت که وجود تغییرات فصلی برای ترکیبات زهر بازتابی از فصل گلدهی گیاهان و پوشش گیاهی باشد. تحقیقات قبلی نشان داده است که میزان بارش، ارتفاع از سطح دریا، نوع پوشش گیاهی و عواملی همچون میزان باد و رطوبت نسبی سالیانه بر ترکیبات زهر موثر است به همین خاطر برای تحقیقات پیش رو بررسی‌های دقیق‌تر و ثبت پارامترهای اقلیمی و انواع پوشش گیاهی و گیاهان موجود هر منطقه پیش از شروع زهرگیری توصیه می‌گردد.

۴. سپاسگزاری

از صندوق حمایت از توسعه زنبورداری کشور و جناب آقای مهندس بهزاد بانکی پور و زنبورداران گرامی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۵. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

۶. منابع

Abreu, R. M. M., Silva de Moraes, R. L. M. & Malaspina, O. (2000). Histological aspects and protein content of Apis mellifer L. Worker venom glands: the effect of electrical shocks in summer and winter. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6 (1).

Abusabbah, M., Lau, W. H., Mahmoud, M. E., Salih, A. M. & Omar, D. (2016). Prospects of using carbohydrates as supplemented-diets and protein rich mixture as alternative-diet to improve the quality of venom produced by *Apis cerana* L. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(3), 23-26.

Anwar, A.E. (2000). *Further studies on bee venom extraction and its biological properties*. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture Menoufiya University, Egypt.

Asthana, N., Yadav, S.P., & Ghosh, J.K. (2004). Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin-a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. *J. Biol. Chem*., 279, 55042-55050.

Bachmayer, H., Krell, G. & Suchamec, E. (1972). Synthesis of promelittin and melittin in the venom gland of queen and worker bees: patterns observed during maturation. *Journal of insect Physiology*, 18(8), 1515-1521.

Baracchi, D. & Turillazzi, S. (2010). Differences in venom and cuticular peptides in individuals of Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. *Journal insect Physiology*, 56(4), 366-75.

Bogdanov, S. (2016). Bee Venom: production, composition and quality. In: The bee venom Book, Chapter 1, Muehlethurnen, Switzerland.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Chang, D., Olenzek, A. M. & Duda Jr, T. F. (2015). Effects of geographical heterogeneity in species interactions on the evolution of venom genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282: 20141984.

Chen, J., Guan, S., Sun, W. & Fu, H. (2016). Melittin, the major pain-producing substance of bee venom. *Journal of Neuroscience Bulletin*, 32, 265-272.

Daneels, E. L., Vaerenbergh, M. V., Debyser, G., Devreese, B. & De Graaf, D. C. (2015). Honeybee venom proteome profile of queen and winter bees as determined by a mass spectrometric approach. *Toxins*, 7(11), 4468-83.

Dong, J., Ying, B., Huang, S., Ma, S., Long, P., Tu, X., Yang, W., Wu, ZH., Chen, W. & Miao, X. (2015). High-performance liquid chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to analysis melittin in individual honeybee (*Apis mellifera*) venom sac. *Journal of Chromatography B*, 1002, 139-143.

El-Ashhab, K. (2001). *Studies on bee venom in honey bee colony*., M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Moshtohor, Zagazig University, Egypt.

El-Bahnasy, S. A., Mahfouz, H. M., El-Shibiny, A.A. & El-Bassiony, M.N. (2017). Effect of some factors on honey bee venom production from different strains. *SINAI Journal of Applied Sciences*, ISSN: 2314-6079, 6(1), 59-66.

El feel, M. A. (2017). *Improve of honey bee venom productivity in commercial apiaries*. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo university, Egypt, 135 pp.

Elhosseny E. Nowar, (2016). Venom glands parameters, venom production and composition of honeybee aps mellifera L. Affected by substitute feeding. *Middle east journal of agriculture research*, 5(4), 333-339.

El-Shaarawy, K.O., Zakariam, M.E., Azza Taufik, A. & El-Shemy, A.A.M. (2007). Effect of different bee venom collection periods using electrical shock device on some venom characteristic and honey bee colonies activities. *Mansoura University Journal of Agricultural Sciences*, 32(6), 4769-4775.

Eze, O. B. L., Nwodo, O. F. C., Ogugua, V. N., (2016). Therapeutic effect of honey bee venom, Journal of pharmaceutical,chemical and biological, Pages 48-53, ISSN: 2348-7658.

Falco, A., Barrajon-Catalan, E., Menendez-Gutierrez, M.P., Coll, J., Micol, V., & Estepa, A. (2013). Melittin-loaded immunoliposomes against viral surface proteins, a new approach to antiviral therapy, Antiviral Res., 97, 218-221.

Ferreira Junior, R. S. F., Sciani, J. M., Marques-Porto, R., Junior, A. L., O. Orsi, R., Barraviera, B. & Pimenta, D. C. (2010). Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, 56(3), 355-362.

Ferreira Resende, V. M., Vasilj, A., Santos, K. S., Palma, M. S. & Shevchenko, A. (2013). Proteome and phosphoproteome of Africanized and European honeybee venoms. *Proteomics*, 13(17), 2638-2648.

Gajski, G., & Garaj-Vrhovac,V. (2013). Melittin: a lytic peptide with anticancer properties, Environ. Toxicol. Pharmacol, 36, 697-705.

Habermann, E. (1972). Bee and wasp venoms. *Science*, 177(4046), 314-322.

Haggag, S. I., Abed Al-Fattah, M. A., Ewies, M. A. & El-feel, M. A. (2015). Effect of honeybee venom collection from different races on honey area. *Academic Journal of Entomology*, 8 (4), 190-192.

Hossein, MD. S., Shapla, U. M., Gan, S. H. & Khalil, MD. I. (2017). Impact of bee venom enzymes on diseases and immune responses. *Molecules*, 22(1), 25-41.

Hussein, A. E., El-Ansari, M. K. & Zahra, A. A. (2019). Effect of the honeybee hybrid and geographic region on the honey bee venom production, *Journal of plant protection and pathology*, 10(3), 171-176.

Ionete, R. E., Dinca, O. R., Tamaian, R. & Geana, E. I., (2013) Exploring apis mellifera venom compounds using highly efficient methods. *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation*, 16(2), 89-100.

Khalafallah, E.M.A. (2012). *Environmental conditions affecting bee venom production and quality at Qalyobia Govemorate*. M. Sc. Thesis, Institute of environmental studies & research, Ain shams university, Egypt, 142 pp.

Kucinschi, V. Rafiroin. (1978). More effect efficient devices and techniques for collecting bee venom. *Apiculcure in Romania*, 53(12), 16-19.

Leluk, J., Schmidt, J. & Jones, D. (1989). Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon*, 27(1), 105-114.

Moreno, M. & Giralt, E. (2015). Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, 7(4), 1126-1150.

Nasser, M.A. (2013). *Studied on some factors affecting bee venom production*. M. Sc. Thesis, Faculty of Environmental Agricultural Sciences, El-Arish, Suez Canal University, Egypt.

Nenchev, P. (2001). Bee venom yield from bee hive. Zhivotnov dni-Nauki, *Mir press*, 38(2), 122-124.

Neumann, W., Habermann, E. & Hansen, H. (1953). Differentiation of two hemolytic factors in bee venom. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur experimentelle Pathologie and Pharmakologie*, 217(2), 130-143.

Noyer, E. E., (2016). Venom glands parameters, venom production and composition of honeybee *Apis mellifera* L.Affected by substitute feeding. *Middle east journal of agriculture*, ISSN 2077-4605, 5(4), 596-603.

Nunez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B. Gutierrez, J. M. & Calvete, J. J. (2009). Snake venomics and antivenomics of *bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic varriation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *Journal of Proteomics*, 73(1), 57-78.

Owen, M. D. & Sloley, B. D., (1988). 5-Hydroxytryptamine in the venom of the honey bee (*Apis mellifera* L.): variation with season and with insect age, *Toxicon*, 26(6), 577-581.

Owen, M. D., Pfaff, L. A., Reisman, R. E. & Wypych, J. (1990). Phospholipase A_2 in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon*, 28(7), 813-820.

Owen, M. D. & Pfaff, L. A. (1995). Melittin synthesis in the venom system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Toxicon,* 33(9), 1181-1188.

Pak, S. C. (2017). Health benefits and uses in medicine of bee venom. *Bee Products-Chemical and biological properties*, pp 287-306 Springer Science.

Rached, I.C.F.S., Castro, F.M., Guzzo, M.L., & Verissimo de Mello, S.B. (2010) Anti-inflammatory effect of bee venom on antigen-induced arthritis in rabbits: influence of endogenous glucocorticoids. *J. Ethnopharmacol*, 130, 175-178.

Raghuraman, H. & Chattopadhyay, A. (2007). Melittin: a membrane-active peptide with diverse function. *Bioscience reports*, 27(4-5), 189-223.

Sanand, R.E. & Mohanny, K.M. (2013). The efficacy of a new modified apparatus for collecting bee venom in relation to some biological aspects. *Journal of american science*, 9(10), 177-182.

Scaccabarozzi, D., Dods, K., Le, T. T., Gummer, J. P. A., Lussu, M., Milne, L., Campbell, T., Wafujian, B. P. & Priddis, C. (2021). Factors driving compositional diversity of *Apis mellifera* bee venom from a *Corymbia calophylla* (marri) ecosystem, Southwestern Australia. *PlOS ONE* 16(6), e0253838. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253838.

Schmidt, J. O. (1995). Toxicology of venoms from the honeybee genus *Apis*. *Toxicon*, 33, 917-27.