The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

Increasing the gyne production ability in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) colony using pyriproxyfen

Seyed Ali Modarres Hasani [1], Ahmad Ashouri[2]✉, Alireza Bandani [3]

1. Department of plant protection, College of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Karaj, Iran. E-mail: alimodarres@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of plant protection, College of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Karaj, Iran. E-mail: ashouri@ut.ac.ir
3. Department of plant protection, College of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Karaj, Iran. E-mail: abandani@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 22 July 2023

Revised: 24 October 2023

Accepted: 30 October 2023

Published online: 19 March 2024

Keywords:

caste determination,

queen caste,

juvenile hormone analogue,

bumblebees.

ABSTRACT

Bumblebees are valuable assets in terms of pollination services in wild plants and greenhouses. The most well-studied species of bumblebees is *Bombus terrestris* which is commercially reared and sold on a large scale worldwide. Even though the artificial rearing of bumblebees started in the 1950s, there are still some problems in the mass-rearing process of them. One of the main problems is the low rate of gyne production in the late phase of the colony, to start the new colonies. So, the main objective of this study was to increase the number of produced gynes in the *B. terrestris* colonies by changing the caste of the larva from worker to queen. For this purpose, we used pyriproxyfen which is a juvenile hormone analogue compound. The first and early second-stage larvae were treated with 1,3 and 6 ppm of pyriproxyfen and the onset time of emergence, number, weight, mating succession, and diapause survival of new gynes were recorded. The results showed that the 3 ppm treatment had the highest number of the produced gynes, and also the shortest onset time of emergence. There was no difference in mating succession and diapause survival among the treatments. Based on the experiment results, we concluded that using a 3 ppm concentration of pyriproxyfen compound on young larvae of *B. terrestris* can induce the juvenile hormone effect and increase the number of produced gynes in the colony. We suggest that pyriproxyfen as a juvenile hormone analogue, regarding the concentration, type, and time of application on the young larvae, can be used to increase the number of produced gynes in the bees' colony.

Cite this article: Modarres Hsani, S. A., Ashouri, A. & Bandani, A. (2024). Increasing the gyne production ability in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) colony using pyriproxyfen. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54 (2), 285-299. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2023.361360.1007034

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2023.361360.1007034

Extended Abstract

Introduction

Farmers worldwide are using commercial pollinators to increase their product amount and quality. Many greenhouse products pollinated with the help of commercial colonies of bumblebees especially *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). Even though the laboratory-rearing of these bees started in the 1950s, there are still problems in its mass production process. One of the most important limitations in the mass rearing of bumblebees is the number of newly produced gynes to start new colonies. There are two female castes in a bumblebee's colony; queen and worker, which are genetically the same. It is shown that caste determination in *B. terrestris* happens in the early days of larval stage and juvenile hormone plays an important role in it. The juvenile hormone is a gonadotropin that regulates many pathways of reproduction, domination hierarchy, and caste determination. It could be suggested that manipulating the juvenile hormone titer in a diploid (female) larva could lead to producing a gyne instead of a worker. However, the use of juvenile hormone is limited due to its instability and the need to keep it continuously at -18 Celsius, as well as being expensive. Therefore, to measure our goal in this research, we decided to introduce a synthetic compound into the experiments equivalent to this hormone in the form of a juvenile hormone analogue with the chemical name pyriproxyfen.

Pyriproxyfen is one of the juvenile hormone analogues, which is currently used in Europe as an insecticide and is also reported as a safe compound for *B. terrestris* since there is no mortality reported due to its application on bumblebees. So, the main objective of this research is to find a way to produce more gynes in a *B. terrestris* colony by manipulating the juvenile hormone.

Materials and Methods

In this study, we used 12 naturally reared queen right colonies at the 10-workers stage, We used 1,3 and 6 ppm of pyriproxyfen as treatments and applied it to the first and early second larval stage in the queen-right colonies. In the first experiment, the onset time of emergence, number, and weight of new gynes were recorded. In the second experiment, we tested the mating succession and diapause survival of the new gynes. All the experiments were performed in the red light and the colonies were at the same age.

Results and Discussion

The results showed that using 3 ppm of pyriproxyfen on the first and early second larval stage of *B. terrestris* mimics the juvenile hormone role since the 3 ppm treatment had the shortest onset time of gyne emergence and also the highest number of produced gynes. Although the produced gynes in the 3 ppm pyriproxyfen treatment had lower weight than the control, there was no significant difference in mating succession and diapause survival among the treatments. We observed no difference between the results of the 1 ppm treatment and control in this experiment, however, the 6 ppm treatment showed some differences in onset time of emergence, weight, and number of produced gynes. This finding confirms that juvenile hormone titer in the larval stage is crucial in caste determination of *B. terrestris* and also shows that manipulating the JH with pyriproxyfen as a juvenile hormone analogue is a possible and concentration-sensitive process.

Conclusion

Based on the results, we concluded that pyriproxyfen as a juvenile hormone analogue, regarding the concentration, type, and time of application on the young larvae in the queen right colonies of *B. terrestris*, can be used to reduce the onset time of emergence and increase the number of produced gynes in these bees' colonies.

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۴، شماره ۲

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

انتشارات دانشگاه تهران

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

افزایش توان ملکه زایی زنبور مخملی *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) *terrestris* به کمک ترکیب پیری پروکسی فن

سید علی مدرس حسنی [۱] | احمد عاشوری [۲]✉ | علیرضا بندانی [۳]

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: alimodarres@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ashouri@ut.ac.ir

۳. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: abandani@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۲/۲۹

کلیدواژه‌ها:

تعیین کاست، کاست ملکه، آنالوگ هورمون جوانی، زنبور مخملی.

چکیده

زنبورهای مخملی اهمیت زیادی در گرده‌افشانی گیاهان وحشی، محصولات کشاورزی و گلخانه‌ای دارند. معروف‌ترین گونه از زنبورهای مخملی، *Bombus terrestris* است که کلنی‌های آن به‌صورت تجاری در سراسر جهان به فروش می‌رسد. با وجود این‌که تجاری‌سازی این زنبورها از دهه ۱۹۵۰ میلادی شروع شده، اما همچنان مشکلاتی در راه تولید انبوه آن‌ها وجود دارد. یکی از مشکل‌های اساسی، پایین‌بودن راندمان تولید ملکه برای راه‌اندازی کلنی‌های جدید در این حشرات است. ازاین رو هدف اصلی این پژوهش، افزایش تعداد ملکه تولید شده در کلنی‌های زنبور *B. terrestris* از طریق افزایش نسبت تبدیل لارو کاست کارگر به لارو کاست ملکه در کلنی‌های این زنبور تعیین شد. برای این منظور از ترکیب پیری پروکسی فن که یک آنالوگ هورمون جوانی است، استفاده شد. در این آزمایش، سنین اول و ابتدای دوم لاروی زنبور با سه غلظت ۱، ۳ و ۶ میلی‌گرم ماده مؤثره بر لیتر از ترکیب پیری پروکسی فن تیمار شدند و پنج شاخص زمان ظهور ، تعداد ، وزن ، موفقیت در جفت‌گیری و زنده‌مانی پس از دیاپوز ملکه‌های تولید شده در کلنی‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد ملکه در تیمار ۳ میلی‌گرم بر لیتر تولید شد و همچنین کمترین مدت‌زمان ظهور کاست ملکه در کلنی نیز برای این تیمار ثبت شد و بین تیمارها و گواه از لحاظ موفقیت در جفت‌گیری و زنده‌مانی پس از دیاپوز، اختلافی دیده نشد. باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان این‌طور بیان کرد که غلظت ۳ پی‌پی‌ام از ترکیب پیری پروکسی فن بر روی سنین اول و ابتدای دوم لاروی زنبور *B. terrestris* القاکننده اثر هورمون جوانی بوده و می‌تواند باعث افزایش تولید تعداد ملکه در کلنی این زنبور شود؛ بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که ترکیب پیری پروکسی فن به‌عنوان یک آنالوگ هورمون جوانی را با در نظر گرفتن غلظت، زمان و نحوه استفاده بر روی لاروهای جوان، می‌توان برای افزایش تعداد ملکه تولید شده در کلنی این زنبور پیشنهاد نمود.

استناد: مدرس حسنی، سیدعلی؛ عاشوری، احمد و بندانی، علیرضا (۱۴۰۲). افزایش توان ملکه زایی زنبور مخملی (Hymenoptera: Apidae) *Bombus terrestris* به کمک ترکیب پیری پروکسی فن. *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۴ (۲)، ۲۹۹-۲۸۵. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2023.361360.1007034

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2023.361360.1007034

مقدمه

زنبورهای مخملی، گروه نسبتاً بزرگی از زنبورهای نیش‌دار هستند که همراه با زنبورهای عسل، متعلق به راسته Hymenoptera، بالا خانواده Apoidea و خانواده Apidae هستند (Triplehorn & Johnson, 2005).

زنبورهای مخملی کلنی‌های سالانه و اجتماعی را تشکیل می‌دهند که با یک ملکه در بهار شروع می‌شود. ملکه بارور زنبورهای مخملی، یک دوره زمستان‌گذرانی (دیاپوز) دارند که بین ۶ تا ۹ ماه به طول می‌انجامد و در اوایل فصل بهار از دیاپوز خارج شده و پناهگاه زمستانی خود را ترک کرده و شروع به تغذیه از شهد و گرده گل‌ها و شکوفه‌هایی می‌کند که در آن زمان در طبیعت موجود هستند (Beekman et al.,1998).

این ملکه پس از جستجو و انتخاب لانه، اندکی دانه گرده را به‌وسیله بزاق خود به شکل یک توده خمیری درآورده و سپس روی این توده گرده چند تخم گذاشته (فاز تأسیس[1]) و روی آن‌ها را با موم می‌پوشاند. دوره جنینی تخم‌ها یک هفته طول می کشد و پس از دوره جنینی، ملکه با ایجاد سوراخ‌هایی در دیواره مومی لاروی، به تغذیه و نگهداری از لاروها می‌پردازد (Heinrich, 1974; Goulson, 2003; Goulson, 2010). پس از این‌که رشد لاروها کامل شد، آن‌ها به‌دور خود یک پیله ضخیم تنیده و درون آن به شفیره تبدیل می‌شوند. لاروها در این مرحله همگی دیپلوییید (ماده) هستند و به کاست کارگر تبدیل می‌شوند. پس از ظهور کارگرها تمام وظایف کلنی مانند جمع‌آوری غذا[2]، نظافت کلنی، تنظیم حرارت[3] کلنی و تغذیه نوزادان برعهده آن‌ها خواهد بود و ملکه فقط به تخم‌ریزی می‌پردازد. دومین سری تخم‌های ملکه نیز همانند گروه اول، دیپلوییید بوده و به زنبورهای کاست کارگر تبدیل می‌شوند (Goulson, 2003). پس از دو مرحله تخم‌ریزی و رسیدن کلنی به یک جمعیت معین، تغییراتی در کلنی اتفاق می‌افتد و ملکه پس از گذاشتن آخرین تخم‌های دیپلوییید یا هم‌زمان با آن، از طریق بکرزایی شروع به تولید نتاج نر می‌کند (نقطه تغییر[4]). پس از این‌که اولین تخم هاپلوییید (نر) توسط ملکه گذاشته شد، تخمدان در بعضی از کارگرها فعال شده و این کارگرها در تولید نتاج نر با ملکه به رقابت می‌پردازند که به این مرحله از چرخه زندگی کلنی فاز رقابت[4] گفته شده و افراد جنسی یعنی مَلکه‌های جدید و زنبورهای نر نیز در این دوره از عمر کلنی تولید می‌شوند (Cameron, 1985; van Honk *et al*., 1980; Roseler *et al*,1984).

ملکه‌های جدید و زنبورهای نر ممکن است در ورودی لانه مادری و یا بر روی گل‌ها جفت‌گیری کنند. ملکه‌های بارور نسل جدید پس از تغذیه کافی و ذخیره مواد غذایی در بافت چربی خود، در اواخر تابستان، سوراخی به نام هیبرناکولا[5] در عمق چند سانتی‌متری خاک ایجاد می‌کنند. این ملکه‌ها تمام طول پاییز و زمستان و حتی اوایل بهار را در این سوراخ به‌صورت دیاپوز سپری می‌کنند. کلنی مادری نیز با تمامی زنبورهای خود، در اواخر تابستان در مدت‌زمان چند روز، کاملاً نابود می‌گردد. در بهار سال بعد، ملکه‌های بارور پس از خروج از دیاپوز، از پناهگاه زمستانی خود خارج شده و چرخه زندگی خود را ادامه می‌دهند (Goulson, 2003).

زنبورهای مخملی از اولین حشراتی هستند که برای گرده‌افشانی در گلخانه‌ها، پرورش داده شدند و بیش از یک قرن است که در کشورهای با کشاورزی پیشرفته، مورد توجه هستند (Sladen, 2014; Velthuis & Van Doorn, 2006). اما در دهه‌های اخیر استفاده از کلنی‌های تجاری زنبورهای مخملی به‌ویژه زنبور *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) برای گرده‌افشانی محصولات، شدت گرفته است. ازاین‌رو، کشورهای مختلف به‌منظور افزایش تولید محصولات کشاورزی خود به‌ویژه محصولات گلخانه‌ای، اقدام به تهیه کلنی‌های تجاری این گرده‌افشان‌ها از کشورهای تولیدکننده می‌نمایند (Martin *et al*., 2019; Baur *et al*., 2019). از آن‌جایی که این کلنی‌ها توالی پیوسته نداشته و یک‌بارمصرف هستند (با توجه به

1initiation phase
2foraging
3switch point
4competition phase
5Hibernacula

دیاپوز اجباری ملکه و تک نسلی بودن در سال)، برای هر دوره گل‌دهی می‌بایست کلنی جدید سفارش داد که این امر سبب پیوستگی درخواست کلنی از شرکت‌های تولیدکننده می‌شود. از طرفی تولید کلنی برای مصرف چند هفتگی نیز سبب بالارفتن هزینه تولید می‌شود (Dafni *et al*., 2010). عمده هزینه تولید معطوف به تولید ملکه برای تأسیس کلنی است و بنابراین پیداکردن روشی برای تولید بیشتر ملکه می‌تواند در اقتصادی‌تر کردن تولید تجاری زنبور مخملی حایز اهمیت باشد که این امکان به زمان تخصیص و تفکیک کاست زنبور معطوف است.

زنبورهای ماده (دیپلوییید) در گونه‌های جنس Bombus مانند سایر زنبورها، دارای دو کاست ملکه و کارگر هستند که از نظر ژنتیکی کاملاً مشابه‌اند (Michener & Michener,1974). برخلاف زنبور عسل *Apis mellifera* (Hym.: Apidae)، هیچ فاکتور تغذیه‌ای در دوره لاروی بر روی فرایند تعیین کاست زنبور ماده در این زنبور اثر نمی‌گذارد و تفاوتی بین غذای لارو کاست ملکه و لارو کاست کارگر وجود ندارد (Pereboom *et al*., 2003). در این زنبور، تعیین کاست در سنین یک و دو لاروی رخ می‌دهد و بر اساس منابع علمی، هورمون جوانی در این فرایند نقش تعیین‌کننده‌ای دارد (Roseler, 1991; Cnaani *et al*., 2000; Cnaani *et al*., 1997).

هورمون جوانی در بسیاری از گونه‌های حشرات از اجسام آلاتا[1] ترشح شده و به‌عنوان یک هورمون گونادوتروپیک[2] عمل می‌کند (Riddiford, 2012). استفاده موضعی از هورمون جوانی بر روی زنبورهای بالغ ماده *B.terrestris* باعث افزایش در مصرف غذا، نرخ متابولیسم، جایگزینی پروتئین[3] و رشد تخمدان‌ها می‌شود (Shpigler *et al*., 2021). همچنین نشان‌داده‌شده است که استفاده از هورمون جوانی به‌صورت تماسی بر روی سنین اول و دوم لاروی زنبور *B.terrestris* می‌تواند باعث افزایش احتمال تولید کاست ملکه شود که این امر بستگی به میزان دوز هورمون جوانی استفاده شده دارد (Cnaani *et al*., 1997; Bortolotti *et al*., 2001).

بنابراین، فرض بر این است که با دست‌کاری هورمون جوانی بتوان نسبت تولید ملکه و کارگر را به نفع تولید ملکه بیشتر، تغییر داد. بااین‌حال، استفاده از هورمون جوانی به علت ناپایدار بودن و لازمه نگه‌داری پیوسته در دمای ۱۸- درجه سلسیوس و همچنین گران‌بودن، با محدودیت روبرو است. از این رو ما در این پژوهش بر آن شدیم تا با استفاده از یک ترکیب سنتتیک معادل این هورمون به شکل آنالوگ هورمون جوانی[4] و با نام شیمیایی پیری پروکسیفن[5] هدف خود را سنجش کنیم. پیژی پروکسی فن یکی از ترکیبات آنالوگ هورمون جوانی است که در حال حاضر در اروپا از آن به‌عنوان حشره‌کش بر علیه سفید بالک گلخانه (*Trialeurodes vaporiarum*) و سفید بالک پنبه (*Bemesia tabaci*) در گلخانه‌های گوجه‌فرنگی، بادمجان و مزارع پنبه استفاده می‌شود و همچنین به‌عنوان یک ترکیب ایمن برای زنبورهای مخملی گزارش شده است (EU, 2010).

روش‌شناسی پژوهش

ملکه‌های جوان زمستان گذران زنبور *B. terrestris* در میانه فصل بهار (هفته دوم تا چهارم اردیبهشت) از روستای وارنگه رود، بخش آسارا شهرستان کرج (**36°08'01"N 51°24'27"E**) جمع‌آوری شدند. شکار ملکه‌ها از روی شکوفه‌های آلبالو و گیلاس توسط تور حشره‌گیری انجام شد و هر کدام از ملکه‌ها با استفاده از یک فالکون ۵۰ سی‌سی درب‌دار به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، هر کدام از ملکه‌ها در داخل قفس‌هایی به ابعاد ۱۰*۱۵*۱۵ سانتی‌متر قرار داده شدند. این قفس‌ها در شرایط آزمایشگاهی مخصوص پرورش زنبور مخملی در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و تاریکی

1corpora allata
2gonadotropic
3protein turnover
4Juvenile Hormone Analogues (JHAs)
5pyriproxyfen

مطلق نگه‌داری شدند. اعمال تیمارها و داده‌برداری در نور قرمز (که برای زنبور قابل‌دیدن نیست) انجام شد. تغذیه زنبورها با گرده گل تازه و محلول آب شکر ۵۰ درصد و به‌صورت بیش از میزان نیاز مصرف انجام شد.[1]

این پژوهش در قالب دو آزمایش انجام شد.

آزمایش اول: آزمون اثر تیمار پیری پروکسی فن بر ملکه‌زایی

برای انجام این آزمایش، ۱۲ کلنی هم‌سن زنبور *B. terrestris* که در هر کدام، یک ملکه مادر، ۱۰ کارگر و ۱۵ فنجانک تخم (که همگی نتاج ملکه مادر همان کلنی بودند) وجود داشت، آماده شد. دلیل انتخاب این مرحله (مرحله دوم تخم‌ریزی ملکه مادر پس از ظهور اولین دسته کارگرها) از چرخه کلنی برای اعمال تیمار این بود که احتمال تولید کاست ملکه و همچنین تخم هاپلوئید (نر) در کلنی وجود ندارد و تمام تخم‌ها دیپلوئید بوده که به کاست کارگر تبدیل خواهند شد (Goulson, 2003). روزانه فنجانک‌های تخم در داخل هر کلنی تحت‌نظر گرفته شده و پس از گذشت شش تا هفت روز که تخم‌ها تفریخ شدند (پایان مرحله جنینی) و هنگامی که منافذ تغذیه‌ای برای تغذیه لاروهای سن یک[2] بر روی فنجانک‌ها ظاهر شدند، تیمارها اعمال شدند.

این آزمایش با سه تیمار شامل غلظت‌های یک، سه، و شش میلی‌گرم ماده مؤثره بر لیتر (ppm) از ترکیب پیری پروکسی فن (EC 10%) شرکت کریشی هند (Krishi) انجام شد. این غلظت‌ها باتوجه‌به غلظت‌های استفاده شده از هورمون جوانی بر روی لارو زنبور *B. terrestris* در مقاله Bortolotti *et al.*, 2001 تهیه شدند. از آب مقطر به‌عنوان حلال و همچنین گواه (شاهد) استفاده شد. میزان شش میکرولیتر از محلول تهیه شده به کمک سرنگ همیلتون از طریق منفذ تغذیه‌ای به داخل محفظه لاروی تزریق شد. لاروهای زنبور مخملی در ابتدای سنین لاروی (سن اول و دوم) هنوز در یک محفظه در کنار هم هستند و وارد حجره‌های مجزا نشده‌اند (Pendrel & Plowright, 1981)، بنابراین واردکردن یک حجم مشخص از محلول تیمار به منزله تیمار نمودن تمام لاروهای داخل محفظه قلمداد می‌گردد.

از آنجا که در داخل یک محفظه لاروی معمولاً بین سه تا ۱۰ لارو وجود دارد (Pendrel & Plowright, 1981)، به طور میانگین شش لارو در داخل هر محفظه فرض شد. شمارش دقیق تعداد لاروهای داخل هر محفظه ممکن نیست؛ زیرا باز شدن محفظه مومی لاروی در سنین پایین منجر به خارج‌شدن لارو شده و معمولاً این لاروها توسط کارگرها دور ریخته خواهند شد؛ بنابراین با استفاده از این روش، میزان خسارت وارده حاصل از دست‌کاری انسانی در داخل کلنی به حداقل[3] ممکن می‌رسد.

پس از اعمال تیمارها، به کلنی‌ها اجازه داده شد که به طور طبیعی به رشد خود ادامه دهند. پس از آنکه کلنی‌ها به فاز تولید ملکه رسیدند، زنبورهای ملکه جدید تولید شده به طور روزانه در هر کلنی شناسایی و تاریخ ظهور آن‌ها ثبت شد. سپس این زنبورهای جدید از کلنی جدا شده و وزن آن‌ها با ترازوی بادقت سه رقم اعشار توزین شد.

هر تیمار این آزمایش شامل سه تکرار بوده و اعمال همه تیمارها در یک روز انجام شد. داده‌برداری هر ۲۴ ساعت یک‌بار انجام شد.

آزمایش دوم: بررسی برخی ویژگی‌های زیستی ملکه‌های جدید تولید شده

ملکه‌های حاصل از آزمایش اول از کلنی جدا شده و برای جفت‌گیری به محفظه جفت‌گیری به ابعاد ۳۰*۳۰*۵۰ سانتی‌متر منتقل شدند. به‌ازای هر ملکه تعداد پنج زنبور نر ۱۰ روزه (که از کلنی‌های غیر مادری جمع‌آوری شدند) در محفظه رهاسازی شد؛ زیرا نشان‌داده‌شده است که ملکه‌ها از اولین روز ظهور، توانایی انجام جفت‌گیری را دارند، اما زنبورهای نر در سن ۱۰ روزگی

1ad libitum
2feeding holes
3manipulation

دارای بیش‌ترین فعالیت جفت‌گیری هستند (Velthuis & Van Doorn, 2006). هر ملکه به مدت سه ساعت زیر نظر گرفته شد و موفقیت یا عدم موفقیت آن در جفت‌گیری ثبت شد (هر ملکه یک‌بار جفت‌گیری می‌کند). سپس ملکه‌های جفت‌گیری کرده به‌منظور انجام دیاپوز، به مدت ۶۰ روز در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از این دوره، ملکه‌ها را از یخچال خارج کرده و زنده‌مانی آن‌ها در دمای محیط ثبت شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از برنامه SPSS ver. 22 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹,۳,۱ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده آزمون توکی در سطح پنج درصد محاسبه شد.

یافته‌های پژوهش

آزمایش اول: آزمون اثر تیمار پیری پروکسی فن بر ملکه‌زایی

اعمال تیمار آنالوگ هورمون جوانی بر شاخص‌های: زمان ظهور، تعداد، و وزن ملکه‌های جدید زنبورهای *B.terrestris* اثر معنی‌دار گذاشت.

زمان ظهور زنبورهای ملکه جدید در تیمارهای مختلف با یکدیگر تفاوت داشتند و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0.0001, F(3,8) = 95.58$) (شکل ۱). این میزان در تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر دارای کمترین مقدار (با میانگین ۲۸,۶ روز) بود. بین تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر (با میانگین ۵۷,۶ روز) و گواه (با میانگین ۵۸,۶ روز) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. تیمار شش میلی‌گرم بر لیتر نیز در گروه آماری مجزا قرار گرفت و با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌دار نشان داد (با میانگین ۴۷,۳ روز).

تیمارهای آزمایش از نظر میانگین تعداد زنبور ملکه تولید شده در کلنی با هم اختلاف معنی‌دار آماری نشان دادند ($P<0.01, F(3,8) = 8.444$) (شکل ۲). بیشترین تعداد تولید شده کاست ملکه در هر کلنی مربوط به تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر (با میانگین ۱۲,۶ عدد) بود. پس از آن به ترتیب گواه (۹ عدد)، تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر (۷,۳ عدد) و تیمار شش میلی‌گرم بر لیتر (۶,۳ عدد) قرار گرفتند.

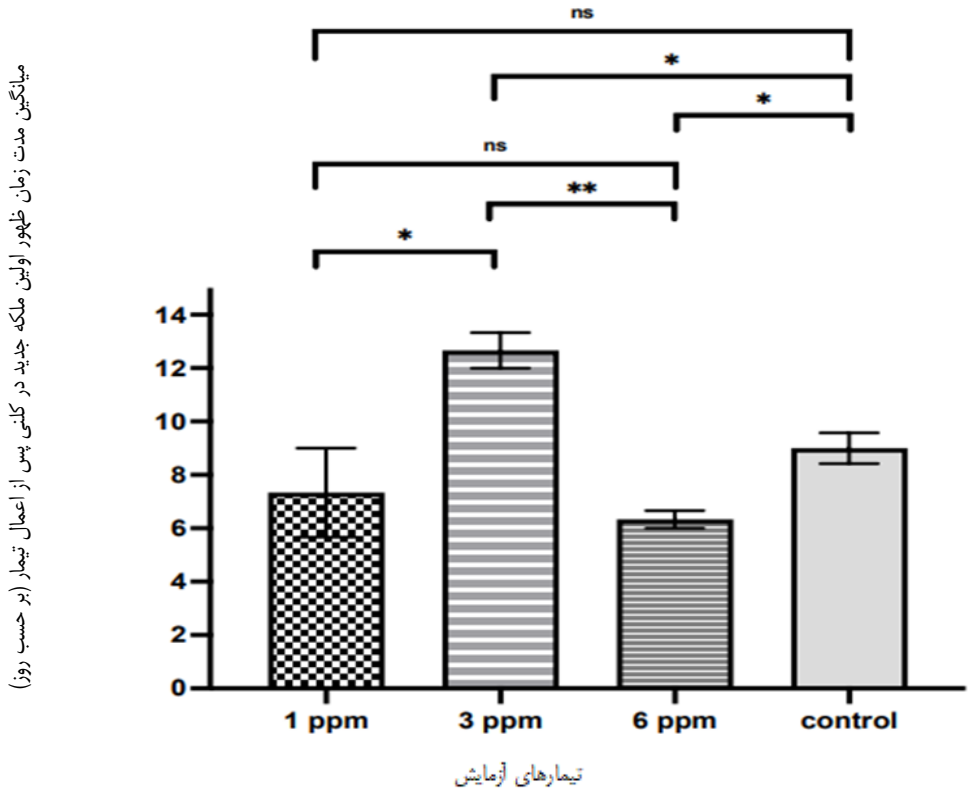
بین میانگین وزن زنبورهای ملکه تولید شده در تیمارهای مختلف آزمایش، اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0.0001, F(3,105) = 7.608$) (شکل ۳). این میزان به ترتیب از بیشترین به کمترین، در گواه (۰,۷۳۴ گرم)، تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر (۰,۶۸۸ گرم)، تیمار شش میلی‌گرم بر لیتر (۰,۶۵۱ گرم) و تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر (۰,۶۱۹ گرم) مشاهده شد.

آزمایش دوم: بررسی ویژگی‌های زیستی ملکه‌های جدید تولید شده

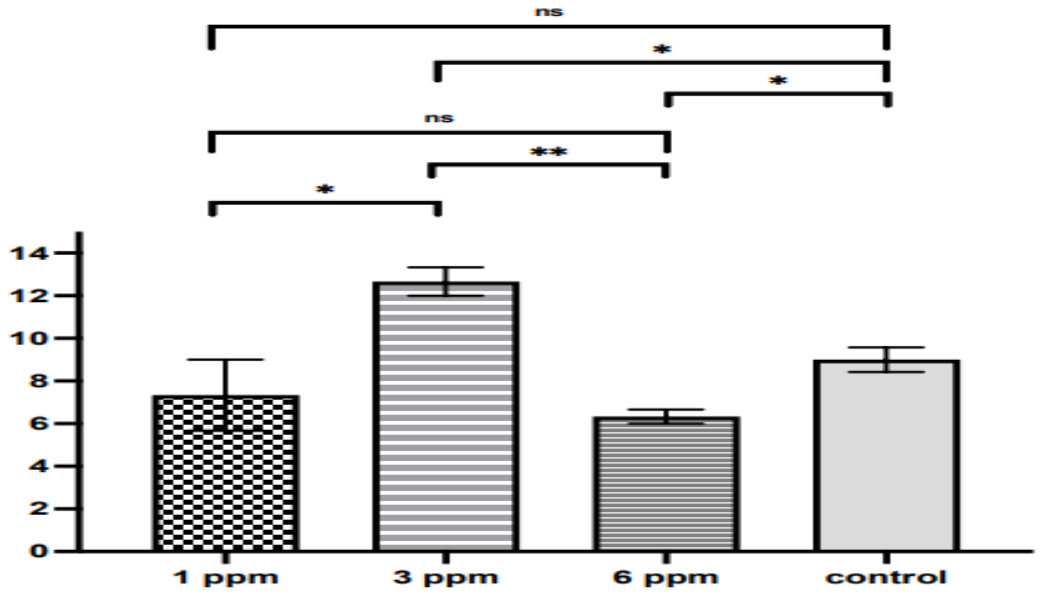
اعمال تیمار آنالوگ هورمون جوانی بر شاخص‌های موفقیت در جفت‌گیری و زنده‌مانی پس از زمستان‌گذرانی ملکه‌های جدید زنبورهای B. terrestris اثر معنی‌دار نداشت.

بین درصد موفقیت جفت‌گیری ملکه‌های جدید تولید شده در هر یک از تیمارها از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($P=0.8969, F(3,8)= 0.1950$) (شکل ۴).

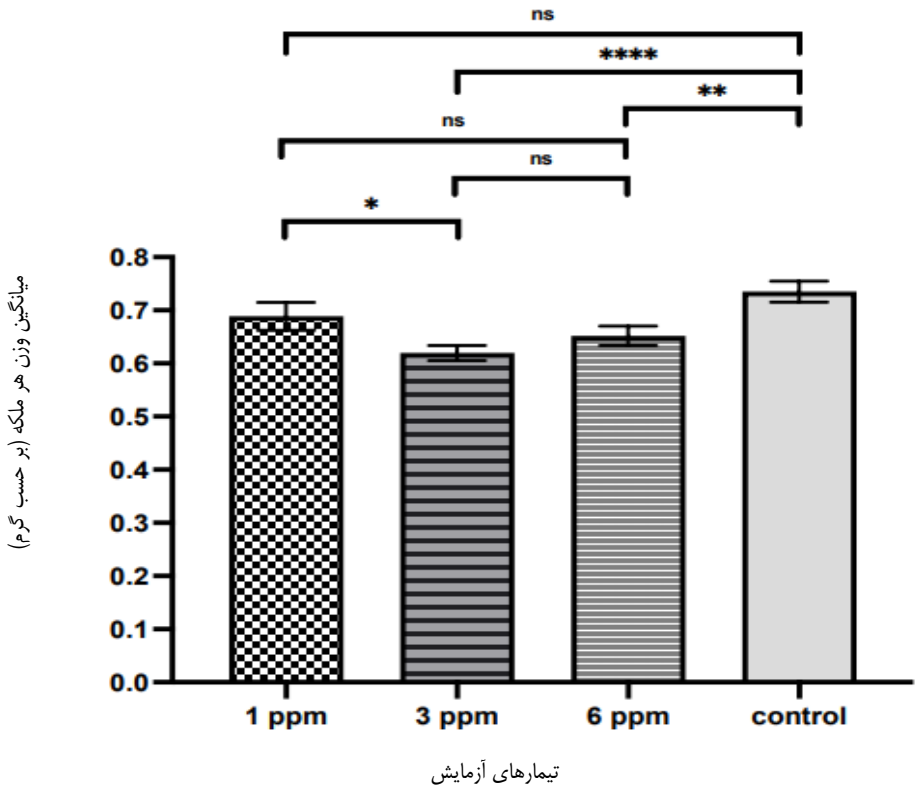
همچنین از نظر درصد زنده‌مانی پس از دوره زمستان‌گذرانی ۶۰ روزه، بین ملکه‌های جفت‌گیری کرده جدید حاصل از تیمارهای آزمایش، اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P=0.1385, F(3,8)= 2.447$) (شکل ۵).



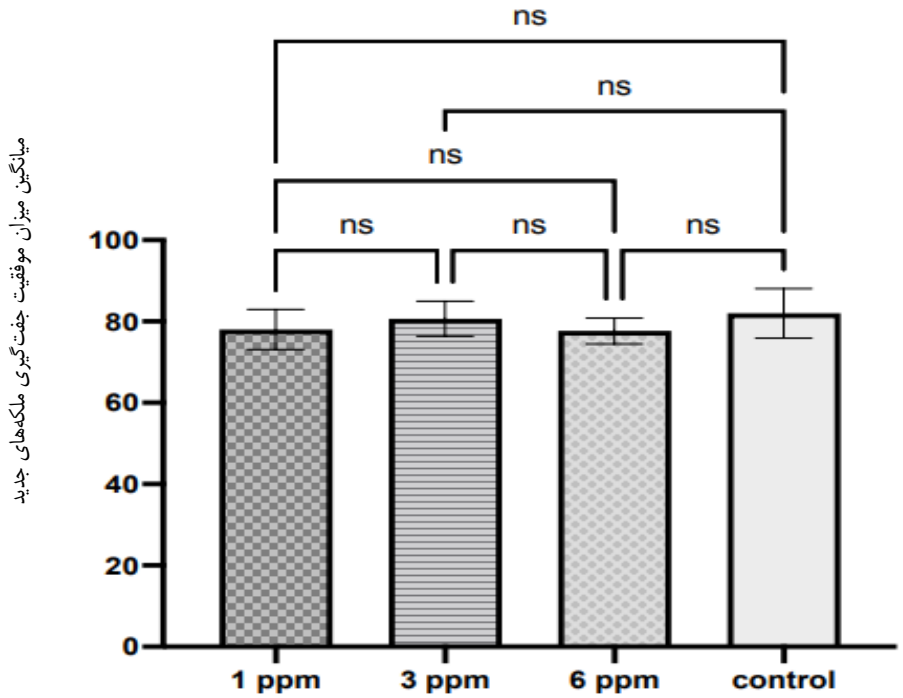
شکل ۱. مقایسه میانگین مدت‌زمان ظهور اولین زنبور ملکه (بر حسب روز) در کلنی زنبور مخملی **B. terrestris** پس از اعمال غلظت‌های مختلف پیری پروکسی فن. وجود علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار و حروف **ns** نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشد (P<0.0001, F(3,8)= 95.58).



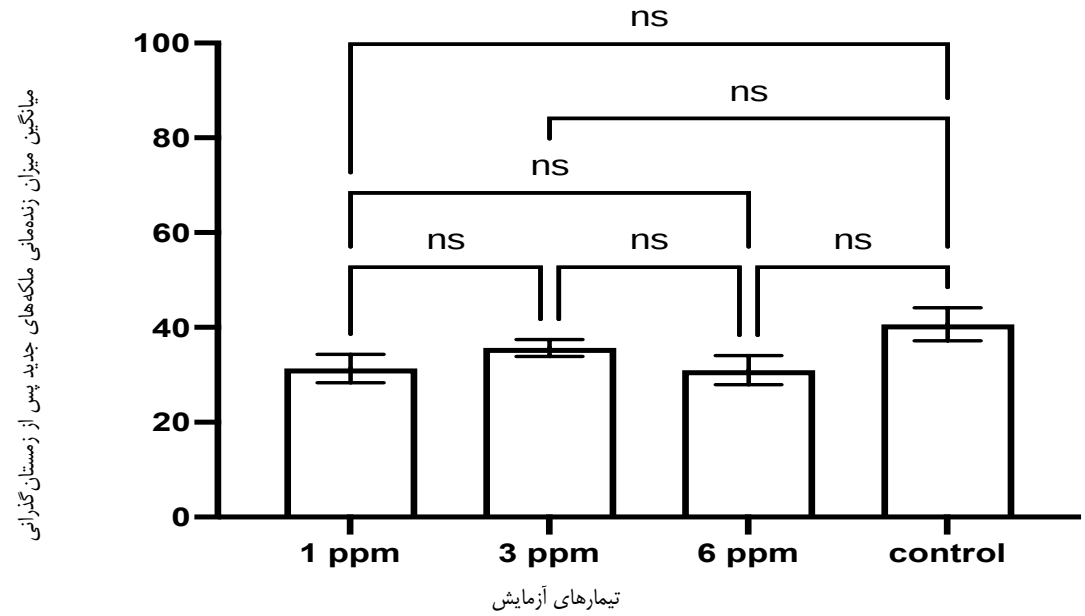
شکل ۲. مقایسه میانگین تعداد ملکه‌های تولید شده در هر کلنی زنبور مخملی *B. terrestris* پس از اعمال غلظت‌های مختلف پیری پروکسی فن. وجود علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار و حروف ns نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشد (P<0.01, F(3,8) = 8.444).



شکل ۳. مقایسه میانگین وزن ملکه‌های تولید شده زنبور مخملی *B. terrestris* پس از اعمال غلظت‌های مختلف پیری پروکسی فن. وجود علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار و حروف ns نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشد (P<0.0001, F(3,105) = 7.608).



شکل ۴. مقایسه میانگین میزان موفقیت جفت‌گیری ملکه‌های جدید تولید شده زنبور مخملی *B. terrestris* پس از اعمال غلظت‌های مختلف پیری پروکسی فن. حروف ns نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشد (P=0.8969, F(3,8) = 0.1950).



شکل ۵. مقایسه میانگین میزان زنده‌مانی ملکه‌های جفت‌گیری کرده جدید زنبور مخملی *B. terrestris* پس از دوره زمستان‌گذرانی. حروف ns نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشد (P=0.1385, F(3,8) = 2.447).

بحث

واردات زنبورهای مخملی دارای مشکلات فراوانی است که علاوه بر گران‌بودن قیمت کلنی‌ها و مشکلات اقتصادی، به محدودیت ثبت سفارش و زمان تحویل کندوها نیز می‌توان اشاره کرد؛ بنابراین فرایند بومی‌سازی و پرورش مصنوعی زنبورهای مخملی به‌عنوان راه‌حل در پیش گرفته شد. هرچند که پرورش مصنوعی این زنبورها در دنیا از دهه ۵۰ میلادی شروع شده، اما همچنان مشکلاتی در راه پرورش انبوه آن‌ها وجود دارد که یکی از این مشکلات، در اختیار نداشتن تعداد بالای ملکه در انسکتاریوم و آزمایشگاه برای راه‌اندازی کلنی‌های جدید است (Sharma *et al*., 2021). همان‌طور که گفته شد، زنبورهای ماده (دیپلوییید) در گونه‌های جنس Bombus مانند سایر زنبورها، دارای دو کاست: ملکه و کارگر هستند که از نظر ژنتیکی کاملاً مشابه‌اند (Michener & Michener,1974) و هورمون جوانی نقش تعیین‌کننده در فرایند تعیین کاست دارد (Bortolotti *et al*., 2001; Alaux *et al*., 2006).

هورمون جوانی عامل اساسی تغییر وضعیت در زنبور بالغ ماده *B. terrestris* ، از حالت ذخیره انرژی به مصرف انرژی و اختصاص‌دادن آن به فرایند تولیدمثل و رشد تخمدان‌ها است (Shpigler *et al*., 2021). این هورمون، اهمیت ویژه‌ای در تولیدمثل و همچنین بروز رفتار غالبیت[1] (رفتار سلطه‌جویانه یک زنبور نسبت به زنبور دیگر) *B. terrestris* دارد (Bloch *et al*., 2000; Amsalem *et al*., 2014; Shpigler *et al*.,2014; Pandy *et al*., 2020) و فرایندهای تولیدمثلی دیگری مانند ترشح موم[2] و ساخت شانه[3] و همچنین بیان[4] پروتئین زرده در همولنف را نیز تنظیم می‌کند (Shpigler *et al*., 2014).

1dominance
2wax secretion
3comb construction
4yolk protein

نشان داده شده که لارو ملکه زنبورعسل *A. mellifera* تیتر هورمون جوانی بیشتری نسبت به لارو کارگر دارد (Czoppelt *et al*., 1992) و در سنین چهارم و پنجم لاروی، یک افزایش ناگهانی در ترشح هورمون جوانی از اجسام آلاتا رخ می‌دهد (Rachinsky & Hartfelder, 1990) و استفاده از هورمون جوانی در این سنین بر روی لارو زنبورعسل باعث القای تولید ملکه می‌شود (Asencot & Lensky, 1988). همچنین استفاده تماسی از هورمون جوانی روی سن آخر لاروی *B. hypnorum* باعث بالارفتن میزان تولید کاست ملکه شده است (Roseler & Roseler,1978).

در گونه *B. terrestris* (گونه مورد آزمون ما در این پژوهش) نشان داده شده که هورمون جوانی در لارو ملکه و در سنین اول و ابتدای دوم لاروی، یک افزایش ناگهانی ترشح دارد (Cnaani *et al*., 1997) و یک‌بار تیمارکردن لاروها در این سن با استفاده از هورمون جوانی باعث افزایش احتمال تولید کاست ملکه می‌شود (Bortolotti *et al*., 2001). در پژوهش حاضر نیز از ترکیب پیری پروکسی فن که یک آنالوگ هورمون جوانی است بر روی سن یک لاروی زنبور *B. terrestris* استفاده شد. ترکیبات آنالوگ هورمون جوانی، حشره‌کش‌های متعلق به گروه تنظیم‌کننده رشد حشرات هستند که با تقلید از اثر هورمون جوانی باعث ایجاد اختلال در متابولیسم حشره می‌شوند (Dhadialla *et al*., 1998). این ترکیبات را با توجه به ساختار شیمیایی می‌توان به دو گروه طبقه‌بندی نمود: تریپنوییدها مانند متوپرن و کینوپرن و فنوکسی‌ها مانند فنوکسی کارب و پیرئی پروکسی فن (El-Sheikh *et al*., 2016). پیری پروکسی فن یکی از ترکیبات آنالوگ هورمون جوانی است که در حال حاضر در اروپا از آن به‌عنوان حشره‌کش بر علیه سفید بالک گلخانه و سفید بالک پنبه در گلخانه‌های گوجه‌فرنگی، بادمجان و مزارع پنبه استفاده می‌شود و به‌عنوان یک ترکیب ایمن برای زنبورهای مخملی گزارش شده است (EU, 2010). اخیراً طی یک پژوهش نشان داده که استفاده ترکیب پیری پروکسی فن حتی در غلظت‌های بیش از حد توصیه شده برای مزرعه نیز اثر کشندگی بر روی لارو زنبور *B. terrestris* ندارد و همچنین استفاده از آن بر روی کاست کارگر باعث بزرگ‌شدن اندازه اجسام آلاتا که محل ترشح هورمون جوانی است، شده است (Bortolotti *et al*., 2020).

نتایج پژوهش ما در قسمت زمان ظهور ملکه به‌وضوح نشان می‌دهد که تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر توانسته است اثر هورمون جوانی را در لارو زنبور القا کند. ازآنجایی‌که کلنی‌های مورد آزمایش قرار گرفته همگی دارای ملکه بوده و به طور طبیعی در حال گذراندن چرخه زندگی خود بوده‌اند و احتمال تولید کاست ملکه در کلنی‌ها وجود نداشته، با مقایسه میانگین مدت‌زمان ثبت شده برای ظهور ملکه بین تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر (با میانگین ۲۸٫۶ روز پس از اعمال تیمار) و گواه (با میانگین ۵۸٫۶ روز پس از اعمال تیمار) می‌توان این‌گونه استدلال نمود که ظهور اولین ملکه در تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر به دلیل اثر مستقیم تیمار بوده است، زیرا تولید ملکه در این تیمار ۳۰ روز زودتر از گواه اتفاق افتاده است.

مقایسه نتایج تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر با گواه نشان می‌دهد که این تیمار تغییری در کلنی ایجاد نکرده است، زیرا در فاکتورهای زمان ظهور، تعداد ملکه تولیدی و وزن ملکه‌ها با گواه تفاوت معنی‌دار از لحاظ آماری نداشت. این نتیجه را می‌توان این چنین تفسیر کرد که احتمالاً میزان غلظت استفاده شده بسیار کم بوده و نتوانسته تأثیری بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده بگذارد. مقایسه شاخص زمان ظهور اولین ملکه در تیمار شش میلی‌گرم بر لیتر و گواه نشان می‌دهد که زمان ظهور ملکه در این تیمار به طور معنی‌داری زودتر از گواه اتفاق افتاده است، اما این مدت‌زمان بیشتر از آن است که بتوانیم ظهور زودتر ملکه را اثر مستقیم اعمال تیمار بر روی لاروها در نظر بگیریم. می‌توان این‌گونه استدلال کرد که اعمال این تیمار تأثیرات دیگری

1peak
2Insect Growth Regulators (IGRs)
3terpenoid
4methoprene
5kinoprene
6phenoxy
7fenoxycarb
8Maximum Field Recommended Concentration (MFRC)

بر چرخه زندگی کلنی زنبور گذاشته است. به‌عنوان‌مثال نشان‌داده‌شده است که استفاده از پیری پروکسی فن بر روی کاست کارگر در کلنی‌های بدون ملکه زنبور *B. terrestris* می‌تواند باعث افزایش سطح هورمون جوانی شده و زنبورهای کاست کارگر را وارد فاز تخم‌گذاری کند (Bortolotti *et al*.,2020).

همان‌طور که گفته شد، ظهور ملکه‌های جدید در تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر زودتر از بقیه تیمارها اتفاق افتاد و همچنین این تیمار از لحاظ تعداد ملکه تولید شده، بیشترین تعداد ملکه به‌ازای هر کلنی (به طور میانگین) را تولید نمود. با مقایسه میانگین تعداد ملکه‌های تولید شده به‌ازای هر کلنی در تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر (۱۲٫۶ عدد) و گواه (۹ عدد)، مشخص است که تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر پیری پروکسی فن باعث افزایش ۲۸ درصدی تعداد ملکه‌های تولید شده به ازای هر کلنی شده است. همان‌طور که یک‌بار تیمارکردن لاروها در این سن با استفاده از هورمون جوانی باعث افزایش تولید کاست ملکه شد (Bortolotti *et al*., 2001).

اگر چه در کلنی‌های تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر ، ملکه‌های جدید سریع‌تر و با تعداد بیشتر تولید شدند اما از لحاظ میانگین وزن، ملکه‌های این تیمار نسبت به بقیه تیمارها دارای پایین‌ترین وزن (۰٫۶۱۹ گرم) بودند. در پاسخ به این نگرانی که آیا وزن پایین‌تر ملکه‌های تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر می‌تواند بر روی شایستگی ملکه‌ها تأثیر بگذارد، شاخص‌های درصد موفقیت جفت‌گیری (شکل ۴) و درصد میزان زنده‌مانی ملکه‌ها پس از دوره ۶۰ روزه دیاپوز (شکل ۵) نیز مورد بررسی قرار گرفت و همان‌طور که نشان داده شد اختلاف معنی‌داری بین هیچ‌کدام از تیمارهای آزمایش دیده نشد؛ بنابراین این ملکه‌ها از نظر موفقیت در جفت‌گیری و زنده‌مانی پس از دیاپوز با ملکه‌های تولید شده در کلنی‌های گواه تفاوتی ندارند. مطالعه Beekman *et al*., 1998 بر روی زنبور *B. terrestris* نیز نشان می‌دهد که درصورتی‌که وزن ملکه قبل از دیاپوز بالای ۰٫۶ گرم باشد، برای گذراندن دوره دیاپوز و همچنین تولیدمثل مشکلی نخواهد داشت که نتایج پژوهش حاضر نیز تأییدکننده این نتیجه است، ازآنجاکه میانگین وزن همه ملکه‌های تولید شده در کلنی‌های این آزمایش نیز بالای ۰٫۶ گرم است. بدیهی است که برای بحث ازدیاد جمعیت در نسل بعد توسط این ملکه‌ها آزمایش‌های تکمیلی مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش برای اولین بار در دنیا نشان داد که استفاده از یک آنالوگ هورمون جوانی (به شیوه‌ای که در روش‌شناسی پژوهش گفته شد) در فرایند تعیین کاست لاروهای دیپلوئید زنبور *B. terrestris*، در کلنی‌های دارای ملکه مادر،می‌تواند نسبت تولید ملکه و کارگر در نتاج دیپلوئید را به نفع تولید ملکه تغییر دهد. ازآنجایی‌که تنها در کلنی‌های مربوط به تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر از ترکیب پیری پروکسی فن، ملکه‌های جدید در زمان زودتر از ۳۰ روز پس از اعمال تیمار مشاهده شدند، می‌توان گفت که اعمال غلظت سه میلی‌گرم ماده مؤثره بر لیتر از این ترکیب بر روی سنین اول و ابتدای دوم لاروی زنبور *B. terrestris* می‌تواند القاکننده اثر هورمون جوانی باشد و این اثر القا کنندگی بر روی لارو دیپلوئید توانسته است باعث تغییر کاست کارگر به کاست ملکه شود. البته باید این نکته مهم را در نظر داشت که استفاده از این ترکیب در کلنی‌های دارای ملکه مادر، بسیار حساس به مقدار، غلظت و مرحله لاروی مورد استفاده است. غلظت‌های مختلف و یا زمان استفاده متفاوت، می‌تواند اثرات پیش‌بینی نشده‌ای بر چرخه زندگی این زنبور در کلنی بگذارد؛ همان‌طور که در این پژوهش غلظت بالاتر دارای اثرات متفاوت بود.

استفاده از این ترکیب علاوه بر افزایش تعداد ملکه‌های تولید شده، باعث زودتر ظاهرشدن ملکه‌های جدید در کلنی شد که با تکیه بر این نتایج؛ هدف اصلی این پژوهش یعنی تولید سریع‌تر و بیشتر ملکه‌های سالم که دارای توانایی جفت‌گیری مناسب و قدرت زمستان‌گذرانی کافی هستند، محقق شد.

لذا نتایج و روش انجام این پژوهش را می‌توان به عنوان یک دستاورد علمی در جهت کاهش زمان ظهور ملکه و همچنین افزایش تولید تعداد ملکه در کلنی‌های زنبور *B. terrestris* به حساب آورد و امید است که بتوان از این دستاورد در راه پرورش

انبوه این زنبور استفاده نمود و در نهایت هزینه‌های اقتصادی تامین کلنی‌های زنبور *B. terrestris* را از طریق کاهش وابستگی به کلنی‌های تجاری کاهش داد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه تهران و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور بابت حمایت مالی در انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع (Conflict of Interest)

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

Amsalem, E., Malka, O., Grozinger, C., & Hefetz, A. (2014). Exploring the role of juvenile hormone and vitellogenin in reproduction and social behavior in bumble bees. BMC *Evolutionary Biology*, 14, 1-13.

Asencot, M., & Lensky, Y. (1988). The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Insect Biochemistry*, 18(2), 127-133.

Baur, A., Strange, J. P., & Koch, J. B. (2019). Foraging economics of the Hunt bumble bee, a viable pollinator for commercial agriculture. *Environmental Entomology*, 48(4), 799-806.

Beekman, M., Van Stratum, P., & Lingeman, R. (1998). Diapause survival and post-diapause performance in bumblebee queens (*Bombus terrestris*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89(3), 207-214.

Bloch, G., Borst, D. W., Huang, Z. Y., Robinson, G. E., Cnaani, J., & Hefetz, A. (2000). Juvenile hormone titers, juvenile hormone biosynthesis, ovarian development and social environment in *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology*, 46(1), 47-57.

Bortolotti, L., Duchateau, M. J., & Sbrenna, G. (2001). Effect of juvenile hormone on caste determination and colony processes in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(2), 143-158.

Bortolotti, L., Pošćić, F., & Bogo, G. (2020). Comparison of Different Pollen Substitutes for the Feeding of Laboratory Reared Bumble Bee Colonies. *Journal of Apicultural Science*, 64(1), 91-104.

Cameron, S. A. (1985). Brood care by male bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(19), 6371-6373.

Cnaani, J., Borst, D. W., Huang, Z. Y., Robinson, G. E., & Hefetz, A. (1997). Caste determination in *Bombus terrestris*: differences in development and rates of JH biosynthesis between queen and worker larvae. *Journal of Insect Physiology*, 43(4), 373-381.

Cnaani, J., Robinson, G. E., & Hefetz, A. (2000). The critical period for caste determination in *Bombus terrestris* and its juvenile hormone correlates. *Journal of Comparative Physiology*, 186, 1089-1094.

Czoppelt, C., & Rembold, H. (1992). Effect of Fenoxycarb on juvenile hormone III titers of honey bee larvae, *Apis mellifera* L. grown in vitro. In *First European Congres of Social Insects, Leuven (Belgium)*, 19-22 Aug 1991. Leuven Univ. Press.

Dafni, A., Kevan, P., Gross, C. L., & Goka, K. (2010). *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology*, 45(1), 101-113.

Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., & Le, D. P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 545-569.

El-Sheikh, E. S. A., Kamita, S. G., & Hammock, B. D. (2016). Effects of juvenile hormone (JH)

analog insecticides on larval development and JH esterase activity in two spodopterans. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 128, 30-36.

EU, 2010, Review report for the active substance fenoxycarb finalized in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 14 March 2008 in view of the inclusion of pyriproxyfen in Annex I of Directive 91/414/EEC- European Commission, Health & Consumers Directorate General.

Goulson, D. (2003). Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 1-26.

Goulson, D. (2010). *Bumblebees: behaviour, ecology, and conservation*. Oxford University Press, 54-59.

Heinrich, B. (1974). Thermoregulation in Endothermic Insects: Body temperature is closely attuned to activity and energy supplies. *Science*, 185(4153), 747-756.

Kells, A. R., & Goulson, D. (2003). Preferred nesting sites of bumblebee queens (Hymenoptera: Apidae) in agroecosystems in the UK. *Biological Conservation*, 109(2), 165-174.

Martin, E. A., Dainese, M., Clough, Y., Báldi, A., Bommarco, R., Gagic & Steffan-Dewenter, I. (2019). The interplay of landscape composition and configuration: new pathways to manage functional biodiversity and agroecosystem services across Europe. *Ecology Letters*, 22(7), 1083-1094.

Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study*. Harvard University Press, 102-105.

Pandey, A., Motro, U., & Bloch, G. (2020). Juvenile hormone interacts with multiple factors to modulate aggression and dominance in groups of orphan bumble bee (*Bombus terrestris*) workers. *Hormones and Behavior*, 117, 104602.

Pendrel, B. A., & Plowright, R. C. (1981). Larval feeding by adult bumble bee workers (Hymenoptera: Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 8, 71-76.

Pereboom, J. J. M., Velthuis, H. H. W., & Duchateau, M. J. (2003). The organization of larval feeding in bumblebees (Hymenoptera, Apidae) and its significance to caste differentiation. *Insectes Sociaux*, 50, 127-133.

Rachinsky, A., & Hartfelder, K. (1990). *Corpora allata* activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *Journal of Insect Physiology*, 36(3), 189-194.

Röseler, P. F. (1991). Roles of morphogenetic hormones in caste polymorphism in bumble bees. *Paul Smeets and Marie José Duchateau*, 126.

Röseler, P. F., & Röseler, I. (1978). Studies on the regulation of the juvenile hormone titre in bumblebee workers, *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology*, 24(10-11), 707-713.

Röseler, P. F., Röseler, I., Strambi, A., & Augier, R. (1984). Influence of insect hormones on the establishment of dominance hierarchies among foundresses of the paper wasp, *Polistes gallicus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 15, 133-142.

Sharma, H. K., Kalia, L., Sharma, R., Thakur, M., Prasad, H., Devi, M., ... & Rana, K. (2021). Seasonal incidence, epidemiology, and establishment of different pests and disease in laboratory reared *Bombus haemorrhoidalis* Smith. *International Journal of Tropical Insect Science*, 1-10.

Shpigler, H., Amsalem, E., Huang, Z. Y., Cohen, M., Siegel, A. J., Hefetz, A., & Bloch, G. (2014). Gonadotropic and physiological functions of juvenile hormone in bumblebee (*Bombus terrestris*) workers. *PloS one*, 9(6), e100650.

Shpigler, H. Y., Cohen, T. M., Ben-Shimol, E., Ben-Betzalel, R., & Levin, E. (2021). Juvenile hormone functions as a metabolic rate accelerator in bumble bees (*Bombus terrestris*). *Hormones and Behavior*, 136, 105073.

Sladen, F. W. L. (2014). *The humble-bee*. Cambridge University Press, 15-16.

Triplehorn, C. A., & Johnson, N. F. (2005). Borror and Delongs. *Introduction to the Study of Insects*, 711-712.

Van Honk, C. G. J., Velthuis, H. H. W., Röseler, P. F., & Malotaux, M. E. (1980). The mandibular

glands of *Bombus terrestris* queens as a source of queen pheromones. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 28(2), 191-198.