Archive of SID

بررسی چندشکلی موجود در کلنی‌های زنبورعسل آذربایجان غربی با استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره

نعمت‌الله اسدی[۱]، صابر خدرزاده[۲]، سیروس امیری‌نیا[۳]

چکیده

به‌منظور بررسی تنوع موجود در کلنی‌های زنبورعسل استان آذربایجان غربی، پس از نمونه‌برداری از کندوهای سنتی و مدرن این استان، از ۹ نشانگر ریزماهواره زنبورعسل استفاده گردید. پس از تکثیر هرجایگاه به‌وسیلهٔ تکنیک PCR و تعیین ژنوتیپ هر آلل، توسط نرم‌افزارهای مربوطه، آنالیزهای درون‌جمعیتی انجام پذیرفت. در این پژوهش از میان جایگاه‌های مورد مطالعه، جایگاه A7 و B124 به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین آلل مشاهده‌شده و جایگاه‌های A14 و A24 نیز مونومورف بودند. بیشترین و کمترین مقدار محتوای چندشکلی جایگاه‌ها به‌ترتیب در جایگاه‌های A7 و A35 نمایان شد. بیشترین هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده و بیشترین هتروزایگوسیتی مورد انتظار نااُریب نی در جایگاه A107 (۱/۰۰۰ و ۰/۸۹۷) و کمترین هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار نااُریب نی نیز به‌ترتیب در جایگاه‌های B124 (۰/۰۰۰) و A35 (۰/۲۳۳) مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: زنبورعسل، چندشکلی، ریزماهواره

==========

۱- کارشناس‌ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد زنبورعسل، مؤسسهٔ تحقیقات علوم دامی کشور
۲- دانش‌آموختهٔ کارشناسی‌ارشد رشتهٔ ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین
۳- عضو هیات علمی بخش بیوتکنولوژی، مؤسسهٔ تحقیقات علوم دامی کشور

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زنبورعسل در تولید محصولات کشاورزی، بقاء و ادامه نسل بسیاری از گیاهان و احیاء محیط‌زیست، نقش بسیار تعیین کننده‌ای دارد، به‌طوری‌که سهم بزرگی از تولیدات مختلف گیاهی و حتی محصولات دامی به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به فعالیت این حشرهٔ مفید وابسته است (۳). متأسفانه صنعت زنبورداری ایران با چالش‌های متعددی روبرو می‌باشد که یکی از مشکلات موجود، ضعف در بخش اصلاح‌نژاد زنبورعسل است. اولین‌گام برای نیل به اصلاح‌نژاد هدفمند، مشخص‌نمودن ساختار ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها می‌باشد. پس از تعیین میزان تنوع موجود، می‌توان برای اصلاح‌نژاد جمعیت‌ها برنامه‌ریزی کرده و در طی برنامه‌های بلندمدت و هدف‌دار، صفات اقتصادی مورد نظر را انتخاب و صفات نامطلوب این جمعیت‌ها را حذف نمود (۲). در سال‌های اخیر، تکنیک‌های پیشرفتهٔ ژنتیک مولکولی به ابزار قابل‌اعتمادی به‌منظور شناسایی تفاوت بین افراد در سطح مولکول DNA تبدیل گردیده است. از ابزارهای ژنتیکی کارآمد که برای تعیین هویت حیوانات اهلی و غیراهلی، مشخص‌نمودن والدین آنها، روابط شجره‌ای بین افراد جمعیت، بررسی ساختار و تمایز جمعیت‌ها به‌کارگیری شده، می‌توان به نشانگرهای ریزماهواره اشاره نمود که پژوهشگران از چندشکلی بالای آنها به‌منظور آنالیز ژنتیکی و بررسی تفاوت‌های موجود در بین گونه‌ها، تعیین منشأ اجدادی و پیگیری روابط مورفولوژیک و رفتاری در سطوح مختلف جوامع، مطالعات شجره‌ای برای شناسایی پیوستگی ژنتیکی با ژن‌های عامل بیماری‌های خطرساز وراثتی و یا آنهایی‌که با صفات مطلوب حیوانات اهلی و گونه‌های گیاهی در رابطه‌اند، شناسایی اختلافات بین افراد مختلف یک جمعیت و شناخت اصول تکامل و انشعاب جوامع و غیره در حیوانات و گیاهان بهره می‌گیرند (۸ و ۹). به‌عنوان مثال از جمله مطالعاتی که بر روی DNA ژنومی و میتوکندریایی زنبورعسل صورت گرفته است می توان به مطالعات استاپ و همکاران (۱۹۹۵) اشاره نمود که با تحقیقی بر روی ۳ نژاد آفریقایی (اینترمیسا[۱]، اسکاتلاتا[۲] و کاپنسیس [۳]) و ٤ نژاد اروپایی (ملیفرا [٤]، لیگوستیکا[٥]، کارنیکا[٦] و سکروپیا[۷]) زنبورعسل، نشان دادند که میانگین هتروزایگوسیتی و میانگین تعداد آلل‌ها در زیرگونه‌های آفریقایی، به‌طور معنی‌داری بیشتر از زیرگونه‌های اروپایی است. فرانک و همکاران (۲۰۰۱) در رابطه با تعیین تنوع ژنتیکی زنبورعسل با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، نشان دادند که فراوانی آللی جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مربوط به هشت جمعیت زنبورعسل آفریقایی یکسان بوده و با هم اختلاف معنی‌داری ندارند. دلاروآ و همکاران (۲۰۰۳) در پژوهشی دیگر بر روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل جزیره بالیریک با استفاده از چندشکلی موجود در ۸ جایگاه ریزماهواره‌ای، نتیجه گرفتند که از لحاظ ساختار ژنتیکی، جمعیت‌های زنبورعسل این جزیره توسط ورود ملکه‌های بیگانه مورد تهدید قرار گرفته و جمعیت‌های موجود باید مورد حمایت نژادی قرار گیرند.

در این تحقیق نیز با توجه به عدم وجود اطلاعات از ساختار ژنتیکی جمعیت زنبورعسل استان آذربایجان غربی، چندشکلی موجود در این جمعیت، با استفاده از ۹ نشانگر ریزماهواره بررسی می‌گردد.

مواد و روش ها

در این پژوهش، زنبورستان‌های استان آذربایجان‌غربی برحسب ظرفیت و تعداد کلنی به‌صورت تصادفی انتخاب و از هر کلنی تعداد ۵ الی ۷ زنبور کارگر جوان به‌طور تصادفی نمونه‌گیری و در درون ظروف حاوی اتانول مطلق قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسهٔ تحقیقات علوم دامی کشور منتقل و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA

[۱] *Apis mellifera intermissa*
[۲] *Apis mellifera scutellata*
[۳] *Apis mellifera capensis*
[٤] *Apis mellifera mellifera*
[٥] *Apis mellifera ligustica*
[٦] *Apis mellifera carnica*
[۷] *Apis mellifera cecropia*

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری گردیدند. انتخاب مناطق، زنبورستان‌ها و نمونه‌گیری از کلنی‌های زنبورعسل متعلق به هر جمعیت به‌نحوی صورت پذیرفت که نمونه‌ها بتوانند اُلگوی مناسبی از آن جمعیت باشند.

سپس، DNA نمونه‌ها به روش اصلاح‌شدهٔ CTAB استخراج (۱) و پس از ارزیابی‌های کمی و کیفی، با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز۰/۸ درصد، نمونه‌های DNA به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شدند.

سپس برای بررسی تنوع موجود در داخل جمعیت، از ۹ نشانگر ریزماهوارهٔ مهم زنبورعسل (نشانگرهای مشترک مورد استفاده در اکثر تحقیقات) با نام‌های A88، A107، A7، B124، A113، A35، A14، A24 و A43 استفاده گردید که توالی آغازگرهای آن از مقالات معتبر (٦) و سایت NCBI اخذ شد و پس از بهینه‌سازی شرایط PCR حاکم بر هر نشانگر از لحاظ غلظت مواد شرکت‌کننده در واکنش (جدول ۱) و چرخه‌های حرارتی (جدول۲)، محصولات PCR هر کدام به‌طور مجزا بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد بارگیری و الکتروفورز گردیدند. کلیهٔ الکتروفورزها در طول شب (over night) انجام پذیرفت و دو چاهک هر ژل نیز به نشانگر وزن مولکولی اختصاص داده شد.

جدول ۱- غلظت اجزای واکنش PCR

اجزای واکنش	غلظت نهایی
بافر PCR	۱X
$MgCl_2$	۱/۵mM
آغازگرها	۰/۵µM
dNTPs	۲۰۰µM
آنزیم Taq پلی مراز	۰/۵unit/µl
الگو DNA	۱۰۰ng/µl
ddH_2O	متغیر

جدول ۲- دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

	مراحل PCR	درجه حرارت(°c)	زمان
۱	واسرشته‌سازی اولیه	۹٤°c	۹ دقیقه
۲	واسرشته‌سازی	۹٤°c	۳۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	۵۵-۵۸°c	۳۰ ثانیه
٤	بسط آغازگر	۷۲°c	۳۰ ثانیه
۵	تکرار مرحلهٔ ۲ الی ٤ (۳۵ مرتبه)	-	-
٦	بسط نهایی آغازگر	۷۲°c	۹ دقیقه
۷	نگهداری محصول در دستگاه PCR	٤°c	-

پس از رنگ‌آمیزی و اسکن‌نمودن ژل‌ها، با استفاده از برنامهٔ Gel-Pro Analyzer 3.1، طول آلل‌ها براساس جفت‌باز اندازه‌گیری و سپس ژنوتیپ افراد تعیین گردید (شکل۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در راستای تعیین فاکتورهایی همچون معیارهای چندشکلی، معیار PIC، هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار نااُریب نی، شاخص شانون و تعادل هاردی-وینبرگ (توسط آزمون مربع کای و نسبت درست‌نمایی) با استفاده از نرم‌افزارهای مختلفی همچون GenAIEx 6، POPGENE 1.31 و HET 1.8 برآورد گردید (۱۰، ۱۱ و ۱۲).

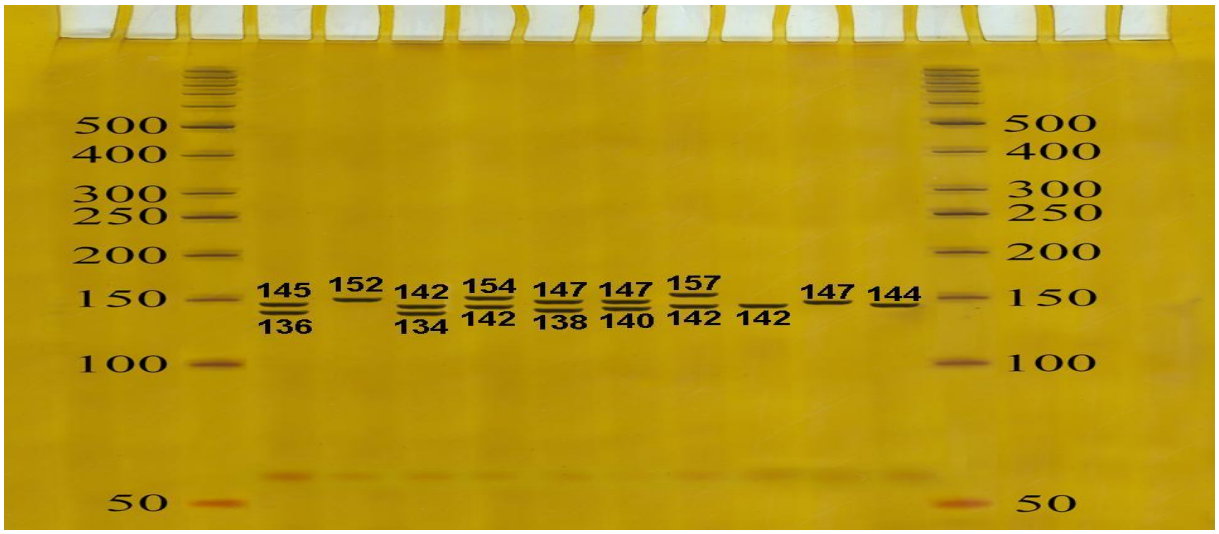
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

نتایج حاصله از جایگاه‌های مورد بررسی، بیانگر خصوصیات اختصاصی موجود در کلنی‌های زنبورعسل آذربایجان غربی بوده و نشان می‌دهد که این نشانگرها براساس استفاده آنها در تحقیقات مختلف (٤، ٥ و ٦)، دارای کاربرد بالایی در تفکیک گونه‌ها، نژادها، توده‌ها و جمعیت‌های مختلف می‌باشند. ارزیابی‌های کمی و کیفی DNA حاصله توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، نشان داد که جذب نوری نمونه‌های DNA بین ۲-۱/۸ است که نشان‌دهندهٔ عدم آلودگی پروتئینی و RNA نمونه‌ها بوده و مشاهدات بر روی ژل آگارز نیز، نتایج حاصله از فقدان آلودگی نمونه‌ها که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد را تأیید نمود.

در این تحقیق، ۸ جایگاه A88، A107، A7، B124، A113، A35، A14 و A24 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. جایگاه A43 علیرغم تغییرات مختلف در بهینه‌سازی شرایط PCR آن، تکثیر نگردید که این نتیجه با نتایج استاپ و همکاران (۱۹۹۵) مطابقت نداشت. تکثیر ایده‌آل جایگاه‌ها حاکی از بهینه‌بودن شرایط PCR از لحاظ غلظت اجزاء و چرخه‌های حرارتی (از نظر تعداد سیکل، دمای اتصال و زمان) است (شکل ۱) و عدم تکثیر در جایگاه A43 نشأت‌گرفته از اختلاف نژادی است.



شکل ۱- الگوی آللی مشاهده‌شده بر روی ژل آکریل آمید ۸ درصد (نشانگر وزن مولکولی ۱۳ شرکت Roche)

دامنهٔ آللی در جایگاه‌های تحت بررسی با وجود اختلافات اندکی، نزدیک به محدودهٔ آللی مطالعات انجام‌شده توسط استاپ و همکاران (۱۹۹۵) بود (جدول ۳).

جدول ۳- دامنهٔ آللی جایگاه‌ها

جایگاه / دامنهٔ آللی (bp)	A88	A107	A7	B124	A113	A35	A14	A24
دامنهٔ آللی مشاهده‌شده	۱۳٤-۱٦۸	۱۳۷-۲۱۰	۹۹-۱۸۸	۱۹۹-۲۷۱	۱۸٤-۲۳٦	۷۸-۱٤۸	۲۱٤-۲۱٦	۱۰۲-۱۰٤

در بین جایگاه‌های تحت مطالعه، جایگاه A7 دارای بیشترین تعداد آلل مشاهده‌شده و جایگاه B124 دارای کمترین تعداد آلل مشاهده‌شده (جدول ٤) و جایگاه‌های A14 و A24 مونومورف بودند. بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر نیز به‌ترتیب در جایگاه‌های A7 و A35 مشاهده شد (جدول ٤) و با نتایج سایر محققین مطابقت نداشت. در تحقیقات دلاروآ و همکاران (۲۰۰۲) بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده‌شده به‌ترتیب در جایگاه‌های A35 و A88 و در تحقیقات استاپ و همکاران (۱۹۹۵) نیز به‌ترتیب در جایگاه‌های A7 و A24 مشاهده شده است. اختلاف موجود در بین تعداد آلل مشاهده‌شده و آلل مؤثر این پژوهش با مطالعات صورت‌گرفته بر روی

www.SID.ir

Archive of SID

نژادهای مختلف زنبورعسل معمولی سایر کشورها نشأت‌گرفته از طبیعت تغییرپذیر و متنوع نشانگرهای ریزماهواره در نژادها و جمعیت‌های مختلف است.

بیشترین و کمترین میانگین ارزش PIC در جایگاه‌های A7 و A35 مشاهده گردید که با توجه به تعداد آلل مؤثر این جایگاه‌ها (جایگاه A7 ۱۱/۳ و جایگاه A35 ۱/۳)، این روند منطقی است (جدول ٤). بالابودن ارزش PIC خصوصاً در جایگاه‌های A7 و A107 و سپس به میزان کمتری در جایگاه‌های A113 و A88 دلیلی مشهود بر چندشکلی زیاد این جایگاه‌ها و از طرفی بیانگر کارآمدی بالای آنها در تمایز ژنوتیپ‌های موجود در جمعیت‌ها می‌باشد.

در جمعیت آذربایجان‌غربی، با آزمون مربع کای و با آزمون نسبت درست‌نمایی (سطح آماری P<۰/۰۰۵)، جایگاه‌های A107، A7 و A35 در تعادل هاردی–وینبرگ و جایگاه‌های A88، B124 و A113 انحراف معنی‌داری را از این تعادل نشان دادند. کوچ‌های مختلف کلنی‌ها، دارای نقش به‌سزایی در امر این انحرافات هستند و اشتراک نقاط مختلف کوچ و تأثیرپذیری از کندوهای موجود در مرز مشترک، عاملی در راستای عدم تعادل هاردی–وینبرگ در اکثر جایگاه‌ها می‌باشند.

بیشترین هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده در جایگاه A107 (۱/۰۰۰) و کمترین هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده در جایگاه B124 (۰/۰۰۰) بود که در تحقیقات دلاروآ و همکاران (۲۰۰۲) به‌ترتیب در جایگاه‌های A35 (۰/۸٦۷) و A88 (۰/۰٦۷) مشاهده گردیده است. هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده صفر در جایگاه B124 این تحقیق به‌دلیل وجود آلل‌های هموزایگوت متفاوت در کلیهٔ نمونه‌ها می‌باشد. بیشترین هتروزایگوسیتی مورد انتظار ناأریب نی (He) در جایگاه A107 (۰/۸۹۷) و کمترین هتروزایگوسیتی مورد انتظار ناأریب نی در جایگاه A35 (۰/۲۳۳) مشاهده گردید که به‌دلیل تفاوت نژادی، این نتیجه با نتایج سایر محققین مطابقت ندارد. در تحقیقات دلاروآ و همکاران (۲۰۰۲) بیشترین و کمترین هتروزایگوسیتی مورد انتظار ناأریب نی به‌ترتیب در جایگاه‌های A35 (۰/۸۱٦) و A88 (۰/۱۲۹) مشاهده شده است.

با درنظرگرفتن کلیهٔ جایگاه‌ها، بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه A7 و کمترین مقدار آن در جایگاه A35 مشاهده گردید که با توجه به وجود ۲۰ آلل در جایگاه A7، بیشترین مقدار شاخص شانون در این نشانگر کاملاً منطقی است. همانگونه که مشاهده می‌شود هتروزایگوسیتی موجود دارای دامنهٔ بالایی بوده و نمایانگر تنوع زیاد موجود در بین کلنی‌های این جمعیت می‌باشد و از طرفی با کاهش‌یافتن اثرات همخونی، بر اساس گزارشات سالانه تولید عسل کشور، شاهد تولید بالای عسل در این جمعیت می‌باشیم.

جدول٤- معیارهای آماری بررسی درون‌جمعیتی مربوط به هر جایگاه

	Na	Ne	PIC	I	Ho	He
A88	۹/۰۰۰	۳/۲۹۱	۰/٦٤۰	۱/٤٥۷	۰/۲۰٤	۰/٦۹٦
A107	۱٦/۰۰۰	۹/۷۰۹	۰/۸۸۰	۲/٤٤۳	۱/۰۰۰	۰/۸۹۷
A7	۲۰/۰۰۰	۱۱/۳٥۰	۰/۹۰۰	۲/٦٥۰	۰/۷۹۲	۰/۹۱۲
B124	۳/۰۰۰	۲/۰۰۰	۰/٤٤۰	۰/۸٦۸	۰/۰۰۰	۰/٥۰۰
A113	٦/۰۰۰	۳/٦۹٤	۰/٦۸۰	۱/٤٥٥	۰/۰۷۷	۰/۷۲۹
A35	٥/۰۰۰	۱/۳۰٤	۰/۲۲۰	۰/٥۳٥	۰/۱٤۹	۰/۲۳۳
SE±میانگین	۹/۸۳۳±٦/۷۳٥	٥/۲۲٤±٤/۲۳۰	۰/٦۲٦±۰/۲٦۱	۱/٥٦۷±۰/۸۳۸	۰/۳۷۰±۰/٤۱۸	۰/٦۷٦±۰/۲٥٦

Na: تعداد آلل مشاهده‌شده **Ne**: تعداد آلل مؤثر **PIC**: محتوای اطلاعات چندشکلی **I**: شاخص شانون **Ho**: هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده **He** : هتروزایگوسیتی مورد انتظار ناأریب نی

منابع

۱- اسدی، ن.، اسماعیل خانیان، س.، نجاتی‌جوارمی، ا.، قره‌داغی، ع. ا.، طهماسبی، غ. ح. و میرهادی، ا. ۱۳۸۲. استخراج DNA ژنوم زنبورعسل با استفاده از اصلاح تکنیک استاندارد در ایران. خلاصهٔ مقالات پنجمین سمینار پژوهشی زنبورعسل ایران، مؤسسهٔ تحقیقات علوم دامی کشور، ۱و ۲ بهمن ۱۳۸۲، صص .۱۳

www.SID.ir

Archive of SID

۲- طهماسبی، غ. ح. ۱۳۷۵. بررسی مورفولوژی و بیوشیمیایی توده‌های زنبورعسل ایران. پایان نامه دکتری حشره شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ۲۱۳ صفحه.

۳- عبادی، ر. ۱۳٦۷. مقایسه عملکرد پنج نژاد و هیبرید خارجی زنبورعسل با نژاد بومی ایران در منطقه اصفهان. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۱۹، شماره ۳: ۲۲ – ۱۱.

4- Delarua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R. F. A. 2002. Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain. Zoology, 40:164-168.

5- Delarua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R. F. A. 2003. Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. Genetics, 35:339-350.

6- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M. and Cornuet, J. 1995. Microsatellite variation in honeybee (*Apis mellifera*) population. Apidologie, 140:679-695.

7- Frank, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M. and Cornuet, J.-M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and Mitochondrial Data. Heredity, 86:420-430.

8- Gelfand, D. H. and White, T. J. 1990. PCR protocols: A Guide Methods and Applications. Academic, New York.

9- Hartel, D. L. 1999. A Primer of Population Genetics. USA Associates INC.

10- Ott, J. 2001. Program HET version 1.80, utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University. New York, NY, USA.

11- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excle. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Note, 6:288-295.

12- Yeh, F. C., Yang, R. and Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.31, Microsoft windows-based free ware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.

www.SID.ir